

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Maja S. Milošević

**Karakterizacija ektoenzima koji hidrolizuju
vanćelijski ATP i ADP u uterusu pacova i
in vitro uticaj kadmijuma, žive i bakra na
aktivnost enzima**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY**



Maja S. Milošević

**Characterization of ectoenzymes that
hydrolyze extracellular ATP and ADP in
rat uterus and *in vitro* effects of cadmium,
mercury and copper on enzyme activity**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentori:

dr Miroslav M. Vrvić, redovni profesor,
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Anica Horvat, naučni savetnik,
Institut za nuklearne nauke "Vinča"

Članovi komisije:

dr Mihajlo B. Spasić, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd

dr Milan R. Nikolić, docent,
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Natalija Đ. Polović, docent,
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____



Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke Vinča, Univerziteta u Beogradu.

Koristim ovu priliku da se zahvalim:

Prof dr Miroslavu Vrvicu, na posvećenom vremenu, strpljenju i korisnim savetima u samom finišu pripreme i pisanja ove disertacije.

Dr Anici Horvat, na izboru teme i posvećenom vremenu u izradi i pisanju ove teze.

Prof. dr Mihajlu Spasiću na ukazanoj časti za učešće u komisiji za ocenu i odbranu doktorske disertacije i dragocenim savetima.

Docentu dr Milanu Nikoliću na posvećenom vremenu i strpljenju tokom pisanja i završnog uobličavanja ove disertacije, a pre svega na podršci i prijateljstvu.

Docentu dr Nataliji Polović na ukazanoj časti za učešće u komisiji za ocenu i odbranu doktorske disertacije, kao i korisnim sugestijama tokom pisanja ove teze.

Prof. dr Ljubi Mandić na savetima i sugestijama tokom izrade ove disertacije.

Dr Snježani Petrović na znanju koje mi je prenela, kolegijalnosti i podršci u svim fazama realizacije ove doktorske disertacije.

Dr Miroslavu Demaju na pomoći tokom eksperimentalnog rada, na rečima ohrabrenja i ogromnoj pozitivnoj energiji.

Dr Suzani Veličković, na prijateljstvu i svesrdnoj pomoći. Posebno joj se zahvaljujem što me je ohrabivala i podržavala da se osamostalim kao istraživač.

Najtoplije se zahvaljujem svim kolegama/inicama iz Instituta za nuklearne nauke "Vinča", koji su mi na bilo koji način pomogli i pružili podršku u izradi ove disertacije.. Posebnu zahvalnost dugujem dr.vet.med. Mariji Ignjatović na nesebičnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada sa laboratorijskim životinjama.

Zahvaljujem se mojim prijateljima na podršci svih ovih godina.

Svojim najbližima, posebno majci.

Spisak radova

Ova doktorska disertacija zasnovana je na sledećim radovima:

Milošević M., Petrović S., Demajo M. and Horvat A.. Effects of metal ions on plasma membrane Mg^{2+} -ATPase in the rat uterus and ovaries. *Ann NY Acad Sci* (2005) 1048, 445-448

Horvat A., **Milošević M.**, Demajo M. Effects of metal ions on Mg^{2+} -ATPase activity in plasma membranes isolated from the rat uterus. *Environ Chem Lett*, (2009) 7: 41-4

Milošević M., Petrović S., Stanojević I., Drakulić D., Veličković N. and Horvat A. Effect of EDTA on copper-induced inhibition of rat myometrial ecto-ATPase activity. *Russ J Phys Chem A+*, (2009) 83 (9) 1592-1595.

Milošević M., Petrović S., Veličković N., Grković I., Ignjatović M., Horvat A. ATP and ADP hydrolysis in cell membranes from rat myometrium. *Mol Cell Biochem* (2012) 371(1-2):199-208

Karakterizacija ektoenzima koji hidrolizuju vanćelijski ATP i ADP u uterusu pacova i *in vitro* uticaj kadmijuma, žive i bakra na aktivnost enzima

IZVOD

ATP i drugi purinski nukleotidi su parakrini signalni molekuli koji vezivanjem za purinske receptore (P1 i P2) na ćelijskoj membrani učestvuju u kontroli kontrakcija i modulaciji imunog odgovora u uterusu sisara. Poremećaji kontraktilnosti uterusa mogu imati važnu ulogu u nastanku neplodnosti, dismenoreje i prevremenog porođaja. U ovom radu ispitano je prisustvo i kinetičke osobine ektoenzima koji hidrolizuju vanćelijski ATP i ADP u uterusu pacova (Wistar albino). Takođe, ispitan je *in vitro* uticaj teških metala (kadmijuma, žive i bakra) kao i zaštitni efekat EDTA i L-cisteina na aktivnost ektoenzima u prisustvu jona metala.

Rezultati ove studije pokazali su da hidrolizu vanćelijskog ATP i ADP u uterusu pacova katalizuju enzimi iz familije E-NTPDaza. To potvrđuju rezultati: neosetljivosti na inhibitore drugih membranskih ATPaza (oligomicin, ouabain, teofilin i levamisol); pH optimum za maksimalnu aktivnost enzima na alkalnom pH (8.0-8.5) za oba supstrata; zavisnost enzimske aktivnosti od dvovalentnih jona i inhibicija suraminom. Izmerana aktivnost E-NTPDaza u uterusu je veoma visoka u odnosu na ostala tkiva pacova, što se vidi iz dobijenih vrednosti kinetičkih parametara za hidrolizu ATP ($V_{\max}^{(app)}=3.973\pm 0.280 \mu\text{mol Pi/min/mg}$, $K_m^{(app)}=0.506\pm 0.062 \text{ mM}$), odnosno ADP ($V_{\max}^{(app)}=2.854\pm 0.080 \mu\text{mol Pi/min/mg}$, $K_m^{(app)}=0.639\pm 0.031 \text{ mM}$). Slične K_m vrednosti za hidrolizu ATP i ADP, odnos početnih brzina hidrolize ATP/ADP (1:0.57), Chevillard-ova kriva kompeticije ATP i ADP, kao i inhibicija milimolarnim koncentracijama natrijum-azida (5-10 mM) ukazuju da je E-NTPDaza 1 dominantni enzim koji hidrolizuje vanćelijske nukleotide u uterusu pacova. RT-PCR i Western blot analizom pokazana je genska i proteinska ekspresija NTPDaze 1 i 2 u uterusu pacova.

U daljem toku istraživanja ispitan je efekat i mehanizma delovanja dvovalentnih jona kadmijuma, žive(II) i bakra(II) na aktivnost E-NTPDaza iz uterusa pacova. Dobijeni rezultati pokazali su da se ispitivani joni ponašaju kao inhibitori aktivnosti E-NTPDaza, sa sledećim redosledom efikasnosti inhibicije:

$\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Hg}^{2+}$. Razlike u IC_{50} vrednostima, kooperativnim efektima i tipu inhibicije zabeležene su u prisustvu ATP u odnosu na ADP. ATPazna aktivnost enzima je osetljivija na prisustvo ispitivanih jona metala u odnosu na ADPaznu aktivnost. Za jone bakra(II) nađena je akompetitivna (ATP) i mešovita inhibicija (ADP); joni kadmijuma su mešoviti inhibitor u prisustvu oba supstrata a za živu(II) utvrđena je mešovita (ATP) i nekompetitivna inhibicija (ADP) aktivnosti E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova.

Rezultati ispitivanja protektivnog efekta 1 mM EDTA i 1 mM L-Cys na aktivnost E-NTPDaza u prisustvu jona teških metala pokazali su da je EDTA efikasniji od L-Cys u sprečavanju inhibicije i obnavljanju enzimske aktivnosti u prisustvu jona kadmijuma i bakra(II). U slučaju inhibicije jonima žive(II), efekat EDTA i L-Cys bio je približno isti. Oba jedinjenja su bila efikasnija u prevenciji i obnavljanju ATPazne u odnosu na ADPaznu aktivnost enzima. Aktivnost E-NTPDaza iz uterusa pacova je bila bolje zaštićena kada su EDTA ili L-Cys dodati u inkubacionu smešu sa jonima teških metala pre dodatka enzima (prevencija inhibicije). Ovakav rezultat je u skladu sa izračunatim koncentracije jona metala i kompleksa u inkubacionom medijumu i pokazuje da su EDTA i L-Cys, gradeći komplekse sa jonima teških metala, smanjili količinu slobodnih jona koji bi mogli da se vežu za enzim. Efekat EDTA i L-Cys na obnavljanje aktivnosti E-NTPDaza bio je takođe značajan, ali 3-15% manji u odnosu na efekat sprečavanja inhibicije enzimske aktivnosti.

Ključne reči: uterus pacova, vanćelijska hidroliza ATP i ADP, E-NTPDaze, teški metali (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+}), EDTA, L-cistein

Naučna oblast: prirodno-matematičke nauke

Uža naučna oblast: biohemija

UDK broj: 577

Characterization of ectoenzymes that hydrolyze extracellular ATP and ADP in rat uterus and *in vitro* effects of cadmium, mercury and copper on enzyme activity

ABSTRACT

ATP and other purine nucleotides are paracrine signaling molecules. Acting via purine receptors (P1 and P2) on the cell membrane, extracellular nucleotides participate in the control of contraction and modulation of the immune response in mammalian uterus. Disorder of uterine contractility may play an important role in the development of infertility, dysmenorrhea and premature labor. In this study, we examined the presence and kinetic properties of ectoenzymes that hydrolyze extracellular ATP and ADP in rat uterus (Wistar albino). Also, effects of heavy metal ions (cadmium, mercury, and copper) on the activity of ectoenzymes from rat uterus were studied *in vitro*, in the absence and presence of EDTA and L-cysteine.

This study showed that hydrolysis of extracellular ATP and ADP in rat uterus is catalyzed by enzymes classified as the E-NTPDase family. The following results confirmed common properties characteristic for E-NTPDases: insensitivity to inhibitors of other membrane ATPase (oligomycin, ouabain, theophylline and levamisole), an alkaline pH optimum for both substrates (8.0-8.5), divalent cations dependence and significant inhibition by suramine. E-NTPDase activity in rat uterus appeared to be very high compared to other rat tissues. The apparent K_m values were 0.506 ± 0.062 and 0.639 ± 0.031 mM, with a calculated $V_{max}^{(app)}$ of 3.973 ± 0.280 and 2.854 ± 0.080 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ for ATP and ADP, respectively. According to similar apparent K_m values for both substrates, the ATP/ADP hydrolysis ratio (1:0:57), Chevillard competition plot, and inhibition by high millimolar concentrations of sodium-azide (5-10 mM), E-NTPDase 1 is dominant ATP/ADP hydrolyzing enzyme in uterine cell membranes. RT-PCR and Western blot analysis revealed gene and protein expression of NTPDase 1 and 2 in rat uterus.

In the further course of research, the effects and mechanism of action of divalent ions (mercury, cadmium and copper) on the activity of E-NTPDases from rat uterus were examined. The results showed that the investigated ions act as inhibitors of E-NTPDase activity, with the following order of inhibition efficiency:

$\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Hg}^{2+}$. The differences in IC_{50} values, cooperative effects and type of inhibition are observed in the presence of ATP and ADP, respectively. The ATPase activity was more sensitive than ADPase activity in the presence of the tested metal ions. Kinetic analysis showed that copper (II) ions are a competitive (ATP) and mixed inhibitor (ADP); cadmium ions are mixed inhibitor in the presence of both substrates, while in the presence of mercury (II) ions were found mixed (ATP) and noncompetitive inhibition (ADP) of rat uterine E-NTPDases.

EDTA was more effective than L-Cys in prevention and recovery of E-NTPDase activity in the presence of cadmium and copper(II) ions. Effects of EDTA and L-Cys on enzyme inhibition by mercury (II) ions were approximately the same. Both compounds were more effective in the prevention and recovery of ATPase compared to ADPase activity. Activity of E-NTPDase from rat uterus was better protected when EDTA or L-Cys was added to the incubation mixture with the heavy metal ions, prior to the addition of the enzyme (prevention of inhibition). This result is in accordance with the calculated concentration of metal ions and complexes in the incubation medium. EDTA and L-Cys, by forming complexes with heavy metal ions, reduce the concentration of free metal ions that may bind to the enzyme. Recovery effects of EDTA and L-Cys on the E-NTPDase activity were also significant, but 3-15% lower than prevention effects.

Key words: rat uterus, extracellular ATP and ADP hydrolysis, E-NTPDase, heavy metals (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+}), EDTA, L-cysteine

Scientific area: natural sciences and mathematics

Scientific sub-area: biochemistry

UDK number: 577

SADRŽAJ

Izvod

Abstract

Lista skraćenica i akronima

1 UVOD	1
1.1 Purinergička signalizacija	1
1.1.1 Nukleotidi kao signalni molekuli	3
1.1.2 Purinski receptori	5
1.1.3 Ektonukleotidaze	7
1.1.3.1 Ekto-nukleotid 5'-trifosfat diphosfohidrolaze (E-NTPDaze)	9
1.1.3.2 Biohemijska svojstva E-NTPDaza	11
1.2 Uterus	13
1.2.1 Purinergička signalizacija u reproduktivnim organima	17
1.3 Teški metali i njihov uticaj na reproduktivne organe	23
1.3.1 Kadmijum	24
1.3.2 Živa	25
1.3.3 Bakar	26
1.4 Uticaja teških metala na komponente purinergičke signalizacije	28
2 PREDMET I CILJ RADA	31
3 REZULTATI	32
3.1 Enzimaska aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova	32
3.1.1 Efekat inhibitora različitih ATPaza na hidrolizu ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova	33
3.1.2 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od temperature	35
3.1.3 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od pH	36
3.1.4 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od količine proteina	37
3.1.5 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od dužine trajanja reakcije	38
3.1.6 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od koncentracije dvovalentnih jona	40
3.1.7 Aktivnost NTPDaza u zavisnosti od koncentracije ATP	41
3.1.8 Kriva kompeticije supstrata	45
3.2 RT-PCR analiza ekspresije E-NTPDaza u uterusu pacova	47

3.3 Elektroforetsko razdvajanje proteina iz ćelijskih membrana uterusu pacova i Western blot analiza	48
3.4 Uticaj teških i prelaznih metala na aktivnost E-NTPDaza	49
3.4.1 Uticaj jona kadmijuma na aktivnost E-NTPDaza	50
3.4.2 Uticaj jona žive na aktivnost E-NTPDaza	53
3.4.3 Uticaj jona bakra na aktivnost E-NTPDaza	56
3.5 Mehanizam delovanja jona teških i prelaznih metala na aktivnost E-NTPDaza	59
3.5.1 Mehanizam inhibicije E-NTPDaza pod uticajem jona kadmijuma	59
3.5.2 Mehanizam inhibicije E-NTPDaza pod uticajem jona žive	61
3.5.3 Mehanizam inhibicije E-NTPDaza pod uticajem jona bakra	63
3.6 Uticaj EDTA i L-Cys na inhibiciju E-NTPDaza jonima teških i prelaznih metala	65
3.6.1 Uticaj EDTA i L-Cys na inhibiciju E-NTPDaza jonima kadmijuma	66
3.6.2 Uticaj EDTA i L-Cys na inhibiciju E-NTPDaza jonima žive	68
3.6.3 Uticaj EDTA i L-Cys na inhibiciju E-NTPDaza jonima bakra	70
4 DISKUSIJA	73
5 ZAKLJUČCI	92
6 EKSPERIMENTALNI DEO	94
6.1 Hemikalije i reagensi	94
6.2 Instrumenti i oprema	98
3.3 Eksperimentalne životinje	99
6.4 Priprema tkiva	99
6.5 Izolovanje ćelijskih membrana iz uterusu pacova	99
6.6 Određivanje koncentracije proteina	100
6.7 Ispitivanje enzimske aktivnosti E-NTPDaze	101
6.7.1 Uticaj inhibitora različitih ATPaza na aktivnost E-NTPDaza	101
6.7.2 Uticaj jona teških i prelaznih metala na aktivnost E-NTPDaza	101
6.7.3 Određivanje kinetičkih parametara aktivnosti E-NTPDaza	103
3.7.3.1 Obrada rezultata uticaja teških metala na aktivnost E-NTPDaza	104
6.8 Određivanje koncentracije neorganskog fosfata	107
6.9 RT-PCR	107
6.9.1 Izolovanje i određivanje RNK	107

6.9.2 Reverzna transkripcija ukupnih RNK	108
6.9.3 Reakcija lančanog umnožavanja cDNK (PCR analiza)	109
6.10 Elektroforetsko razdvajanje proteina i Western blot analiza	111
6.10.1 Priprema uzoraka	111
6.10.2 Elektroforeza na SDS - poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	111
6.10.3 Western blot	111
6.11 Statistička obrada rezultata	113

7 LITERATURA	114
---------------------	------------

BIOGRAFIJA

PRILOZI

Prilog 1 – Publikovani radovi

Prilog 2 – Izjava o autorstvu

Prilog 3 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Prilog 4 – Izjava o korišćenju

LISTA SKRAĆENICA I AKRONIMA

- AA-bis** - akrilamid/bisakrilamid rastvor
- ACR** (*apyrase conserved regions*) - apirazni regioni
- ADP** - adenzin difosfat
- AMP** - adenzin monofosfat
- AP** (*alkaline phosphatase*) - alkalne fosfataze
- APS** - amonijum-persulfat
- ATP** - adenzin trifosfat
- BSA** (*bovine serum albumin*) - albumin goveđeg seruma
- cAMP** (*3'-5'-cyclic adenosine monophosphate*) - ciklični adenzin-monofosfat
- cDNK** - komplementarni lanac DNK
- Cys** - cistein
- DAB** - 3,3'-diaminobenzidin
- DEPC** (*diethyl pyrocarbonate*) - dietilpirokarbonat
- DNK** - dezoksiribonuklinska kiselina
- E2** - estradiol
- EDTA** (*ethylenediaminetetraacetic acid*) - etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina
- EGTA** (*ethyleneglycoltetraacetic acid*) - etilen-glikol-tetrasirćetna kiselina
- eN** (*ecto-5'-nucleotidase*) - ekto-5`-nukletidaze
- E-NPP** (*ecto-nucleotide phosphohydrolases/phosphodiesterase*) - ekto-nukleotid pirofosfataze / fosfodiesteraze
- E-NTPDaze** (*ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*) - ekto-nukleotid 5'-trifosfat difosfohidrolaze
- ERK** (*extracellular signal-regulated kinases*) - kinaze regulisane vanćelijskim signalima
- GSH** - glutation
- HRP** (*horseradish peroxidase*) - peroksidaza iz rena
- MAPK** (*mitogen-activated protein kinases*) - mitogenom aktivirane protein kinaze
- MES** - 2-(*N*-morfolino)etan sulfonska kiselina
- MMP** (*matrix metalloproteinases*) - matriks metaloproteinaze
- NAC** - *N*-acetil cistein

NFκB (*nuclear factor-κB*) - nuklearni faktor-κB

NO - azot-oksidi

P4 - progesteron

P2X - purinski jonotropni receptori

P2Y - purinski metabotropni receptori

PBS (*phosphate buffered saline*) - fosfatom puferisan fiziološki rastvor

PCA (*perchloric acid*) - perhlorna kiselina

PCR (*polymerase chain reaction*) - lančana reakcija polimeraze

Pi - neorganski fosfat

PKC (*protein kinase C*) - protein kinaza C

PLC (*phospholipase C*) - fosfolipaza C

PLD (*phospholipase D*) - fosfolipaza D

PPi - pirofosfat

PVDF - polivinil-difluorid

Ras (*rat sarcoma*) - mali GTP vezujući protein

Rho - mali GTP vezujući protein

RNK - ribonukleinska kiselina

ROS (*reactive oxygen species*) - reaktivne vrste kiseonika

SDS (*sodium dodecyl sulfate*) - natrijum-dodecil-sulfat

SDS-PAGE (*eng. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*) - elektroforeza na natrijum-dodecil-sulfatnom poliakrilamidnom gelu

TBE (*Tris-borate-EDTA*) - Tris-boratni EDTA pufer

TBS (*Tris buffered saline*) - Tris-om puferisan fiziološki rastvor

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

1 UVOD

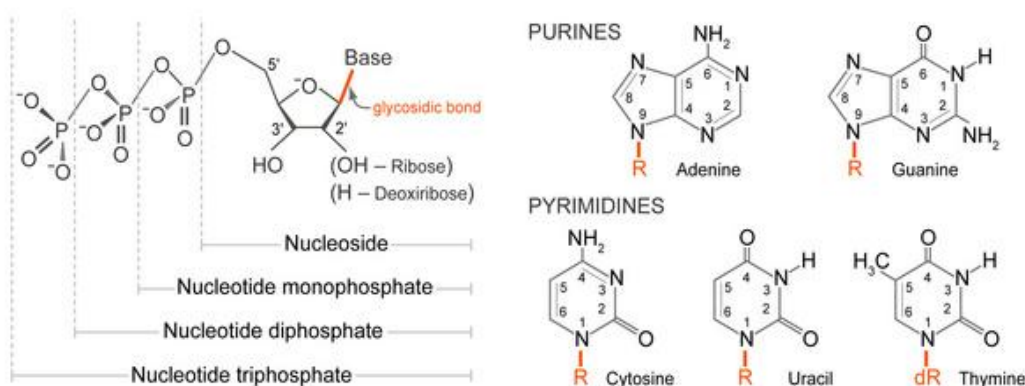
U ovom poglavlju biće kratko predstavljene najvažniji aspekti i komponente signalizacije posredovane purinskim nukleotidima, kao i uloga vanćelijskog ATP u regulaciji fizioloških funkcija uterus sisara. Takođe, biće dat kraći osvrt o uticaju teških metala na ženske reproduktivne funkcije, kao i efektu ovih zagađivača na ektonukleotidaze, enzime koji hidrolizuju vanćelijski ATP.

1.1 Purinergička signalizacija

Purini i pirimidini su aromatična, heterociklična organska jedinjenja koja imaju značajnu ulogu u živom svetu, pre svega kao komponente DNK i RNK molekula. Takođe, nalaze se u sastavu niza drugih biohemijskih jedinjenja, kao što su ATP (adenozin trifosfat), GTP (guanozin trifosfat), ciklični AMP (ciklični adenzin monofosfat), NADH (nikotinamid adenin dinukleotid), NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat), koenzim A i vitamin B1. Pirimidini su jedinjenja nalik piridinu, sadrže dva atoma azota u pozicijama 1 i 3 šestočlanog prstena. Tri nukleotidne baze, koje ulaze u sastav nukleinskih kiselina, citozin (2-hidroksi-6-aminopirimidin), timin (5-metiluracil) i uracil (2,6-dihidroksipirimidin), predstavljaju derivate pirimidina. Purini se sastoje od kondenzovanih prstenova pirimidina i imidazola. U ovu klasu jedinjenja ubrajaju se nukleotidne baze adenin (6-aminopurin) i guanin (2-amino-6-oksipurin). Ostali značajni purini su: ksantin (2,6-dioksipurin), hipoksantin (6-oksipurin) i mokraćna kiselina (2,6,8-trioksipurin), kao i metilovani ksantini biljnog porekla: teobromin (3,7-dimetilksantin), teofilin (1,3-dimetilksantin), kofein (1,3,7-trimetilksantin). Nukleozidi su derivati purina ili pirimidina i šećera, riboze ili dezoksiriboze, povezani preko beta-glikozidne veze. Fosforilacijom 5'-hidroksilne grupe šećera nastaju nukleotidi, osnovne jedinice nukleinskih kiselina i posrednici u prenosu energije u ćeliji (ATP).

Pored toga, nukleotidi i nukleozidi učestvuju u metabolizmu kao sastavni deo koenzima (NADH, NADPH, FAD, koenzim A) i kao intermedijeri u biosintezi šećera i lipida (UDP-glukoza, UDP-galaktoza, CDP-acilglicerol). Uloge koje nukleotidi obavljaju u regulaciji metabolizma uključuju ATP-zavisnu fosforilaciju proteina i alosterno regulisanje aktivnosti enzima. Ciklični nukleotidi (cAMP i cGMP) su sekundarni glasnici u hormonski regulisanim procesima, a GTP i GDP

igraju uloge u kaskadi događaja koji karakterišu prenos signala preko receptora spregnutih sa G-proteinima (Voet D., 1996).



Slika 1.1 Strukturne formule purinskih i pirimidinskih nukleobaza, nukleozida i nukleotida

Iako podaci o signalnoj funkciji vanćelijskih nukleotida postoje još od 20-ih godina prošlog veka (Drury and Szent-Gyorgyi, 1929), obimnije proučavanje purinskih signalnih puteva počinje tek 1970. godine, radovima Burnstock-a (Burnstock et al., 1970; Burnstock, 1972), kada je prvi put upotrebljen izraz «purinergična» signalizacija (*engl. purinergic signalling*). U protekle dve decenije signalna uloga ATP-a i drugih nukleotida pokazana je u različitim tkivima. U centralnom i perifernom nervnom sistemu (CNS i PNS) vanćelijski nukleotidi imaju ulogu u neurotransmisiji, interakciji neurona i glije, stvaranju osećaja bola, funkciji čula vida, sluha i mirisa. Takođe, pokazana je njihova uloga u kontroli rada srca, gastrointestinalnog trakta, jetre i bubrega, regulaciji odgovora epitelijalnih ćelija, imunom odgovoru i prelasku leukocita iz krvi u tkiva, aktivaciji i agregaciji trombocita, izlučivanju hormona iz endokrinih žlezda, formiranju kosti i hrskavice, kontrahovanju glatke muskulature, kao i u reproduktivnim funkcijama oba pola, oplodnji i trudnoći (Burnstock and Verkhratsky, 2009). Purinergična signalizacija obuhvata kaskadu događaja:

- (1) oslobađanje nukleotida iz ćelije (odjeljak 1.1.1),
- (2) aktivaciju jonotropnih i metabotropnih purinskih P2 receptora (odjeljak 1.1.2),
- (3) hidrolizu vanćelijskih nukleotida ektonukleotidazama (odjeljak 1.1.3),
- (4) aktivaciju purinskih P1 receptora adenozinom (odjeljak 1.1.2) i
- (5) preuzimanje vanćelijskog adenzina i njegovo recikliranje u tzv. spasonosnom (*engl. salvage*) putu sinteze nukleozida.

Efekat vanćelijskih nukleotida se donekle preklapa sa signalnim putevima koji se pokreću posredstvom vaskularnih faktora rasta, citokinima, adhezionim molekulima i azot-oksikom (NO). Sa faktorima rasta (faktor rasta trombocita-PDGF i bazni faktor rasta fibroblasta-bFGF) i insulinom, efekat vanćelijskih nukleotida može biti sinergistički, aktiviranjem signalnih puteva preko fosfolipaze C i D (PLC, PLD), diacilglicerola (DAG), protein kinaze C (PKC), kinaza regulisanih vanćelijskim signalima (ERK), fosfoinozitol 3 kinaze (PI3K), mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) i Rho (Robson et al., 2006). Iako vanćelijski nukleotidi uglavnom pokreću prenos signala koji regulišu brze i kratkotrajne reakcije, ima primera i dugotrajnog (trofičkog) odgovora ćelije. Brza signalizacija se dešava u procesima neurotransmisije i neuromodulacije, egzokrine i endokrine sekrecije, agregacije trombocita, vazodilatacije i stvaranja osećaja bola. Dugotrajni efekti nukleotida imaju ulogu u regulaciji deobe, rasta i apoptoze ćelija tokom embrionalnog razvića, zarastanja rana, formiranja kostiju, ateroskleroze i ishemije, kao i ćelijskog odgovora tokom inflamacije i neuroprotekcije (Burnstock, 2006a).

1.1.1 Nukleotidi kao signalni molekuli

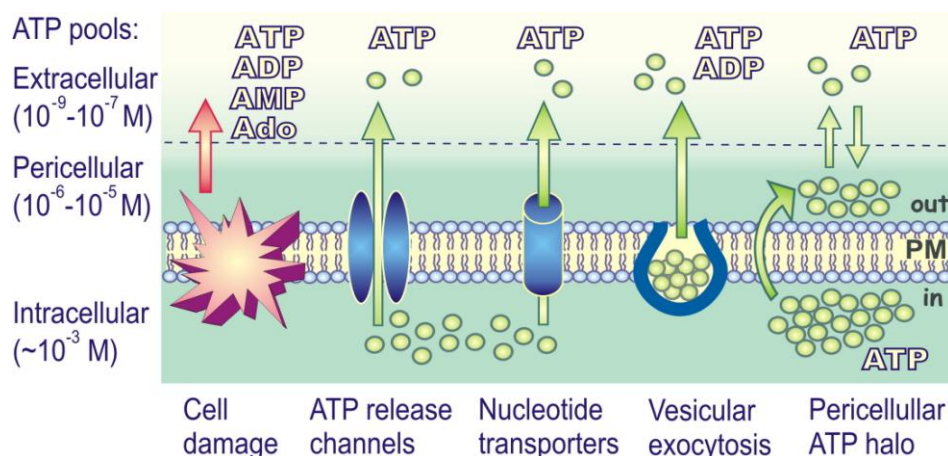
Unutar ćelije ATP je nosilac energije i igra ključnu ulogu u biosintezi, aktivnom transportu i procesima pokretljivosti ćelija. Izvan ćelije ATP je signalni molekul sa jedinstvenim karakteristikama. U vanćelijski prostor može dospeti na više različitih načina: egzocitozom, transmembranskim kanalima, transporterima ili slobodnom difuzijom kroz oštećenu ćelijsku membranu. Svoju signalnu ulogu ATP ostvaruje u praktično svim tkivima i organima regulacijom raznovrsnih bioloških procesa: neurotransmisije, osećaja bola, imunog odgovora, koagulacije krvi, vazodilatacije, kontrahovanja glatkih mišića itd. (Burnstock, 2006a). Navedena svojstva ATP-a kao primarnog glasnika čine ga najrasprostranjenijim, univerzalnim i sveprisutnim signalnim molekulom.

Istraživanja ukazuju da bi ATP mogao biti jedan od evolutivno najstarijih međućelijskih glasnika. Kako ATP učestvuje u praktično svim hemijskim reakcijama u ćeliji, a purinski i pirimidinski nukleotidi čine gradivne jedinice RNK i DNK, njihova koncentracija u ćelijama je velika ($\sim 10^{-2}$ M). Oštećenje ćelije dovodi do pojave ATP-a u okolnoj sredini, što bi moglo da označava signal za opasnost drugim ćelijama. Moguće je da je prvobitna uloga signalizacije ATP-om bila reakcija

izbegavanja, možda preteča osećaja bola kod viših organizama. Danas se zna da je prenos signala posredstvom ATP univerzalan: od prokariota do ćelija u praktično svim tkivima sisara. Uloga ATP-a kao signala za opasnost evolutivno je sačuvana u nekoliko sistema odbrane organizma: osećaju bola, modulaciji imunog odgovora i regeneraciji nakon oštećenja tkiva i ćelija. Fiziološko oslobađanje nukleotida dešava se kao odgovor ćelije na mehaničko istezanje, promenu pH, povećanje sadržaja glukoze, hipoksiju ili interakciju sa patogenima, što ukazuju na centralnu ulogu purinergičke signalizacije u odgovoru ćelija na stres. Sve ovo govori u prilog pretpostavci da je ATP bio jedan od prvih signalnih molekula povezanih sa preživljavanjem (Burnstock and Verkhratsky, 2009).

Ranije se verovalo da su glavni izvor vanćelijskog ATP-a oštećene ili ćelije koje umiru, nakon povrede organa ili usled zapaljenskog procesa. Danas se zna da ćelije otpuštaju ATP u fiziološkim uslovima pri mehaničkoj ili hemijskoj stimulaciji iz okolne sredine. Ćelije različitih ekscitatornih i sekretornih tkiva (nervne ćelije, astrociti i druge glijske ćelije, hromafinske ćelije, acinarne ćelije pankreasa, trombociti) sadrže specifične vezikule sa uskladištenim ATP-om, koji se oslobađa egzocitozom u procesu koji je regulisan kalcijumovim (Ca^{2+}) jonima. Takođe i ćelije drugih tkiva mogu da otpuštaju nukleotide u vanćelijski prostor: epitelijalne i endotelijalne ćelije, fibroblasti, hepatociti, osteoblasti, keratinociti, kardiomiociti, eritrociti, neutrofili, monociti/makrofagi i druge hematopoetične ćelije. Ove ćelije otpuštanjem ATP-a reaguju na različite vrste stresa (hipotoničnu sredinu, istezanje, hidrostatični pritisak ili hipoksija), ali i na stimulaciju bradikinom, serotoninom i drugim agonistima koji vezivanjem za receptore mobilišu unutarćelijski kalcijum (Yegutkin, 2008). Predloženi mehanizmi oslobađanja ATP-a iz ćelije (slika 1.2) su: elektrodifuzno kretanje kroz jonske kanale u membrani (koneksinski ili paneksinski hemikanali i voltažno-zavisni kanali), olakšana difuzija uz pomoć nukleotid-specifičnog-ATP-vezujućeg (ABC) transportera, ili oslobađanjem iz vezikula u procesu egzocitoze (Yegutkin, 2008).

Primećeno je, takođe, da ćelije neprestano oslobađaju male (nanomolarne) količine ATP-a i održavaju bazalnu koncentraciju nukleotida u vanćelijskom prostoru, iako su mehanizmi konstitutivnog i stimulisnog oslobađanja nukleotida različiti.



Slika 1.2 Mehanizmi oslobađanja ATP iz ćelija u vanćelijski prostor (Yegutkin, 2008)

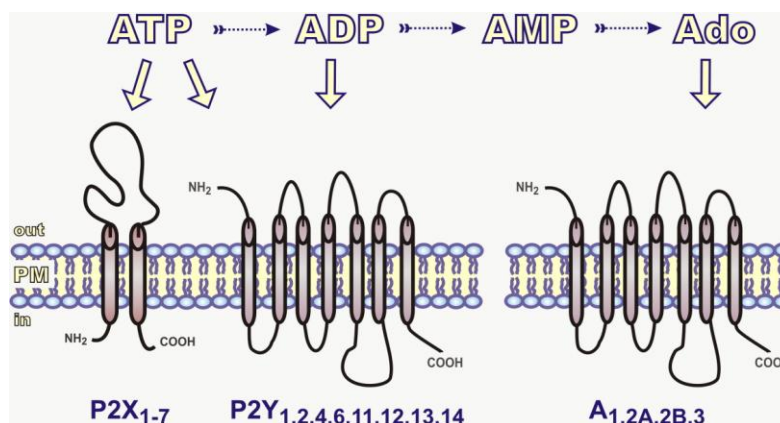
Kako je koncentracija ATP u ćeliji 3-10 mM (Agteresch et al., 1999; Schwiebert, 2000), a za aktivaciju specifičnih receptora je potrebna oko 1000 puta manja koncentracija, oslobođena količina ATP u vanćelijski prostor, neophodna za pokretanje prenosa signala, ne ugrožava energetske zalihe ćelije (Schwiebert and Zsembery, 2003). Poluživot oslobođenog ATP meri se sekundama, a domet je ograničen na samo par stotina mikrona, usled brze razgradnje ektoenzimima, ili rasipanja usled lokalnog protoka krvi ili fluida.

Pored ATP i drugi nukleotidi (ADP, UTP, UDP) i diadenozin-polifosfati se ponašaju kao primarni glasnici. Adenozin, krajnji proizvod hidrolize ATP, takođe je signalni molekul koji aktivacijom P1 receptora ostvaruje kardio- i neuroprotektivni efekat, dovodi do vazodilatacije i angiogeneze i ima ulogu u smirivanju zapaljenskih procesa (Bours et al., 2006; Jacobson and Gao, 2006).

1.1.2 Purinski receptori

Termin purinski receptor ili purinoceptor uveden je 1976. godine (Burnstock, 1976) da opiše klase membranskih receptora koji su aktivirani ATP-om (P2 receptori) ili proizvodom njegove hidrolize - adenozinom (P1 receptori) (slika 1.3).

P1 receptori su receptori spregnuti sa G-proteinima ($G_{i/o}$ i G_s), i do sada su okarakterisana četiri podtipa sa sličnom membranskom topografijom koja se sastoji od sedam transmembranskih (TM) domena. Ovu klasu receptora čine A_1 i A_3 receptori koji inhibiraju i A_{2A} i A_{2B} receptori koji stimulišu sintezu cAMP. Svi P1 receptori aktiviraju najmanje jednu familiju MAPK. Novija istraživanja su pokazala da, pored adenozina, AMP aktivira podtip A_1 receptora (Rittiner et al., 2012).



Slika 1.3 Purinski jonotropni (P2X) i metabotropni (P2Y i P1) receptori (Yegutkin, 2008)

P2 receptori su svrstani u dve familije na osnovu strukture, funkcije i farmakoloških osobina. P2X receptori su ligand zavisni jonski kanali, koji kao odgovor na vezivanje nukleotida omogućavaju ulazak katjona (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) iz vanćelijskog prostora u ćeliju (podtipovi P2X_1 - P2X_7). P2X receptori su trimeri ili heksameri sačinjeni od istih ($\text{P2X}_{1,2,3,4,5,7}$) ili različitih ($\text{P2X}_{2/3}$, $\text{P2X}_{1/2}$, $\text{P2X}_{1/5}$, $\text{P2X}_{2/6}$, $\text{P2X}_{4/6}$, $\text{P2X}_{1/4}$) subjedinica. Svaka proteinska subjedinica sastoji se od vanćelijskog ATP-vezujućeg domena, dva TM domena koji učestvuju u formiranju pore jonskog kanala i unutarćelijskog domena koji čine citoplazmatski C- i N-terminalni krajevi sa konsenzus sekvencama za vezivanje protein kinaza.

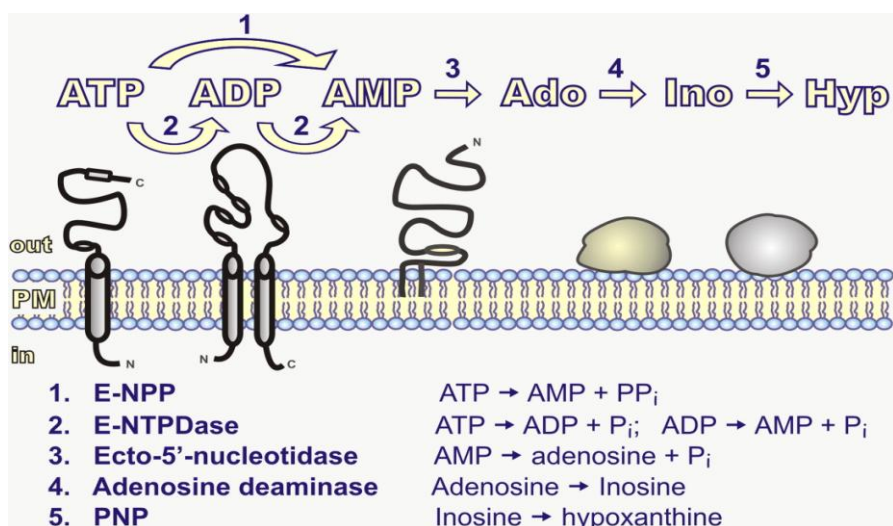
Heterooligomerni P2X receptori poseduju različita farmakološka svojstva u odnosu na homooligomere. Za razliku o ostalih članova P2X familije, P2X_7 receptor ima dug citoplazmatski C-terminalni kraj i ne formira heterooligomere. Pri stimulaciji niskim koncentracijama ATP-a, P2X_7 receptor se ponaša kao jonski kanal za katjone, dok pri većim koncentracijama ATP-a propušta u ćeliju molekule veličine do 900 Da, što dovodi do povećane propustljivosti ćelijske membrane i apoptoze (Volonte et al., 2012).

P2Y receptori pripadaju familiji receptora spregnutih sa G proteinima, i mogu se svrstati u nekoliko podfamilija: receptori spregnuti sa G_q koji aktiviraju fosfolipazu C ($\text{PLC}\beta$) - P2Y_1 , P2Y_2 , P2Y_4 , P2Y_6 i P2Y_{11} , i receptori spregnuti sa G_i koji inhibiraju adenilat kinazu (AC) i regulišu jonske kanale - P2Y_{11} , P2Y_{12} , P2Y_{13} i P2Y_{14} . Receptor P2Y_{11} je spregnut i sa PLC i AC. P2Y receptori se sastoje od vanćelijskog N-terminalnog kraja, sedam TM regiona koji formiraju ligand-vezujuće mesto i unutarćelijskog C-terminalnog kraja sa mestima za vezivanje/fosforilaciju

protein kinaza i G-proteina. Farmakološki P2 receptori se mogu podeliti na one koji vezuju ATP i ADP, one koji vezuju uridin tri- i di- fosfate (UTP i UDP), zatim na receptore sa mešovitom selektivnošću, kao i receptore koji vezuju UDP-glukozu i UDP-galaktozu (Burnstock, 2007). Za P2Y₁ receptor je pokazano da formira homodimere i heterodimere sa A₁ receptorima (Yoshioka et al., 2002).

1.1.3 Ektonukleotidaze

Nakon prenosa signala, vanćelijski nukleotidi se brzo deaktiviraju hidrolizom do nukleozida. U hidrolizi vanćelijskih nukleotida učestvuju nekoliko familija enzima (slika 1.4): ekto-nukleotid 5'-trifosfat difosfohidrolaze (E-NTPDaze), ekto-nukleotid pirofosfataze / fosfodiesteraze (E-NPP), ekto-5'-nukletidaze (eN) i alkalne fosfataze (AP).



Slika 1.4 Enzimi uključeni u inaktivaciju purinskih nukleotida, sa prikazanim odgovarajućim reakcionim shemama (Yegutkin, 2008)

Postepenom enzimskom defosforilacijom vanćelijskog ATP nastaje adenzin, koji i sam učestvuje u purinergičkoj signalizaciji. Nakon vezivanja za P1 receptore, adenzin se uklanja iz vanćelijskog prostora vraćanjem u ćelije preko transportera za nukleozide, nukleobaze i organske katjone. Alternativno, adenzin se inaktivira preko inozina do hipoksantina dejstvom ekto-adenzin deaminaze (ADA) i purin fosforilaze (PNP) (Yegutkin, 2008).

Osnovna karakteristika ektonukleotidaza je da su to membranski vezani enzimi, a njihovo katalitičko mesto okrenuto je ka vanćelijskoj sredini. Maksimalna katalitička aktivnost ovih enzima u vanćelijskoj sredini zahteva prisustvo

divalentnih katjona (Ca^{2+} i Mg^{2+}), kao i alkalni pH (7.4-9.0) (Zimmermann and Braun, 1999). Osnovna uloga ovih enzima je deaktivacija vanćelijskih nukleotida u purinergičnoj signalizaciji, međutim, postoje dokazi da neki od ovih enzima imaju ulogu transmembranskih receptora i/ili adhezivnih molekula (Zimmermann, 2000).

U većini tkiva i ćelija, E-NTPDaze čine glavni deo mašinerije za hidrolizu i interkonverziju vanćelijskih nukleotida. Prvi okarakterisani član ove familije enzima bila je E-NTPDaza 1, i to kao antigen odgovoran za aktivaciju limfocita - CD39. (Maliszewski et al., 1994). Uporedo sa ovim otkrićem, prečišćen je ektoenzim ATPDaza iz tkiva različitih životinjskih vrsta (Christoforidis et al., 1995; Seigny et al., 1997; Knowles et al., 2002; Kukulski and Komoszynski, 2003). Poređenjem aminokiselinske sekvence ATPDaze sa cDNK sekvencom CD39 antigena, potvrđeno je da se radi o istom proteinu. Otkrivanjem novih izotipova E-NTPDazne familije enzima, predložena je hipoteza o različitim posttranslacionim modifikacijama transkripta sa istog gena. Međutim, daljom analizom humanog genoma otkriveni su i drugi CD39 slični geni (CD39L), što je dovelo do dileme u nomenklaturi. CD39/NTPDaza 1 je zaista antigen diferencijacije ćelija, dok ostali CD39L članovi familije to nisu. Danas se članovi E-NTPDazne familije klasifikuju kao NTPDaze sa brojem (tabela 1.1) koji označava redosled kojim su otkriveni i okarakterisani (Robson et al., 2006).

Tabela 1.1 Nomenklatura članova familije NTPDaza (Robson et al., 2006)

Naziv proteina	Dodatni nazivi	Naziv gena: humani, pacovski
E-NTPDaza 1	CD39, ATPDaza, ekto-apiraza	<i>ENTPD1, Entpd1</i>
E-NTPDaza 2	CD39L1, ekto-ATPaza	<i>ENTPD2, Entpd2</i>
E-NTPDaza 3	CD39L3, HB6	<i>ENTPD3, Entpd3</i>
NTPDaza 4	Goldzi-UDPaza, LALP70	<i>ENTPD4, Entpd4</i>
NTPDaza 5	CD39L4, ER-UDPaza, PCPH	<i>ENTPD5, Entpd5</i>
NTPDaza 6	CD39L2	<i>ENTPD6, Entpd6</i>
NTPDaza 7	LALP1	<i>ENTPD7, Entpd7</i>
E-NTPDaza 8	ekto-ATPaza iz jetre, hATPDaza	<i>ENTPD8, Entpd8</i>

Ekto-5'-nukleotidaza je membranski Zn^{2+} -metaloenzim, koji se javlja kao dimer ukotvljen pomoću glikozilfosfatidilinozitol sidra (*engl. GPI anchor*), i može biti "odsečen" od membrane pomoću specifične fosfolipaze i tako preći u vanćelijsku solubilnu formu. Podaci iz literature ukazuju da je ovaj enzim kodiran samo jednim genom (Zimmermann, 2000). eN katalizuje poslednji korak vanćelijske razgradnje nukleotida, a to je hidroliza nukleozid-5'-monofosfata na određeni nukleozid i fosfat. Ovo je glavni enzim odgovoran za nastanak vanćelijskog adenzina, poznat i kao CD73, površinski protein limfocita koji predstavlja protein-marker zrelosti T i B limfocita (Zimmermann and Braun, 1999).

Članovi E-NPP familije enzima poseduju iznenađujuće široku supstratnu specifičnost. Poseduju alkalnu fosfodiesteraznu, kao i nukleotid pirofosfataznu aktivnost (Goding et al., 2003). Stoga su ovi enzimi u mogućnosti da hidrolizuju cAMP do AMP-a, ATP i ADP do AMP-a i P_i, NAD⁺ do AMP-a i nikotinamid mononukleotida, kao i fosfodiesterne veze nukleinskih kiselina i pirofosfatne veze nukleotidnih šećera (Zimmermann, 2000).

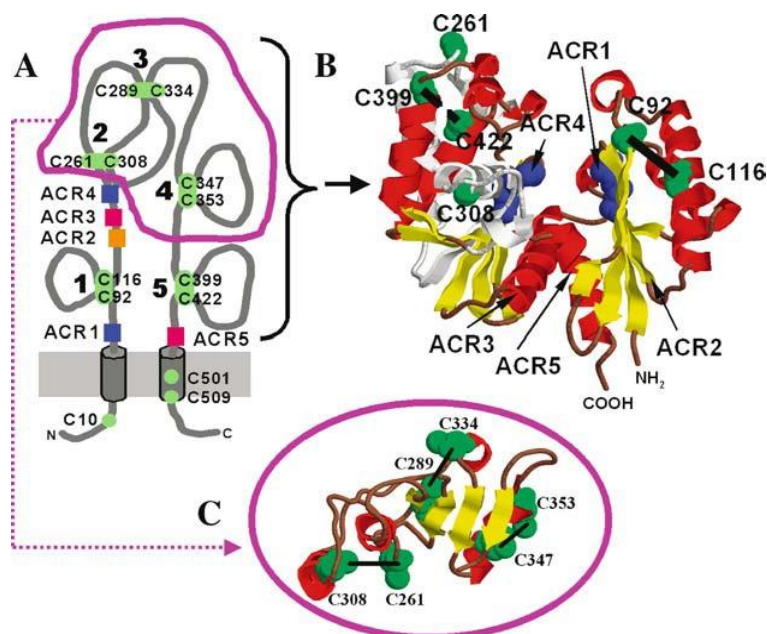
Što se tiče familije alkalnih fosfataza, ovi enzimi oslobađaju neorganski fosfat iz mnogih organskih jedinjenja, uključujući i 5'-tri-, -di-, i monofosfate. Takođe, hidrolizuju i pirofosfate (Fernley and Walker, 1970). AP su prisutne u svim tkivima a posebno u jetri, bubrezima, kostima, žučnoj kesi i placenti. Kod sisara su poznate tri izoforme AP: intestinalna (IAP), placentna (PLAP) i tkivno-nespecifična alkalna fosfataza (TNAP).

1.1.3.1 Ekto-nukleotid 5'-trifosfat diphosphohidrolaze (E-NTPDaze)

Članovi E-NTPDazne familije (EC 3.6.1.5) hidrolizuju nukleozid-5'-trifosfate, kao i nukleozid-5'-difosfate, sa različitim afinitetima za određeni tip nukleotida. Ova familija enzima je široko rasprostranjena u živom svetu te su slični (ili srodni) proteini pronađeni kod kičmenjaka, beskičmenjaka, biljaka, kvasaca i protozoa (Burnstock and Verkhatsky, 2009). Članovi familije E-NTPDaza sadrže β - i γ -fosfat vezujući motiv, karakterističan za aktin-hsp70-heksokinaznu familiju proteina (Kegel et al., 1997). Svi članovi E-NTPDazne familije imaju u vanćelijskom domenu pet visoko konzerviranih regiona - tzv.,,apirazni regioni" (ACR) značajni za katalitičku aktivnost, kao i 10 konzerviranih Cys ostataka (Slika 1.5). Mutacije u konzerviranim

sekvencama apiraznog regiona narušavaju nukleotidaznu aktivnost enzima (Smith and Kirley, 1999).

Familija E-NTPDaza može se podeliti na osnovu membranske topografije, lokalizacije u ćeliji i afiniteta prema različitim NTP/NDP. Prvoj grupi pripadaju E-NTPDaze 1, 2, 3 i 8, koje se nalaze na ćelijskoj membrani i imaju TM domene sa N- i C- terminalnim krajevima smeštenim unutar ćelije. Ovi enzimi hidrolizuju ATP i ADP sa različitim afinitetima.



Slika 1.5 Vanćelijski domen E-NTPDaze 3 (Kirley et al., 2006)

Drugu grupu čine NTPDaze 4-7 koje se nalaze na membranama organela unutar ćelije. NTPDaze 4 i 7 imaju dva TM domena na N- i C- terminalnim krajevima dok NTPDaze 5 i 6 predstavljaju podgrupu enzima kojima nedostaje C-terminalni transmembranski region i koje odsecanjem N- terminalnog kraja daju solubilni protein. NTPDaza 4 se nalazi na membranama Goldžijevog aparata i lizozoma, a glavni supstrat joj je UDP (Wang and Guidotti, 1998). NTPDaza 5 je smeštena na membranama endoplazmatičnog retikuluma (Mulero et al., 1999; Mulero et al., 2000), dok se NTPDaza 6 nalazi na membranama Goldžijevog aparata (Hicks-Berger et al., 2000; Braun et al., 2000), kao i NTPDaza 4. NTPDaza 5 približno podjednako hidrolizuje UDP, GDP i CDP, ali pokazuje nisku aktivnost u prisustvu ADP, dok solubilna forma NTPDaze 6 hidrolizuje nukleozid-difosfate: $GDP \approx IDP > UDP \gg ADP$.

1.1.3.2 Biohemijaska svojstva E-NTPDaza

Kao što je već pomenuto, E-NTPDaze 1-3 i 8 su integralni membranski glikoproteini i sastoje se od četiri domena: vanćelijskog (katalitičkog) domena, dva transmembranska i unutarćelijskog domena koga predstavljaju kratki citoplazmatski C- i N- terminalni krajevi. Ovakva topologija je neobična za ektoenzime i karakteristika je P2X receptora. Literaturni podaci ukazuju da su TM domeni značajni za katalitičku aktivnost i specifičnost prema supstratima, što bi moglo da znači da proteinska trodimenzionalna struktura, pre nego specifična aminokiselinska sekvenca, utiče na katalitičke osobine E-NTPDaza (Wang et al., 1998). Vanćelijski domen čini 85% od ukupnog proteina, sadrži aktivno mesto i visoko konzervirane apirazne regione koji su odgovorni za enzimsku aktivnost. Protein je usidren u membranu preko ostatka palmitinske kiseline, stvaranjem tioetra sa Cys ostatkom u N-terminalnom kraju (Koziak et al., 2000). Izgleda da je ova kovalentna modifikacija ključna za usmeravanje i asosovanje enzima u kaveole, specijalizovane mikrodomene ćelijske membrane koji «okupljaju» receptore i enzime koji učestvuju u prenosu signala (Volonte and D'Ambrosi, 2009). Molekulske mase predviđene na osnovu primarne sekvence (~500 aminokiselina) deglikozilovanih enzima su oko 55-60 kDa, dok glikozilovani proteini imaju mase 70-80 kDa.

Poređenjem sekvenci ACR kod ekto-ATPaza i ekto-ATPDaze pronađeno je da su one identične, što ukazuje da je neki drugi segment sekvence enzima odgovoran za specifičnost prema supstratima. Oligomerizacija značajno utiče na aktivnost E-NTPDaza (Stout and Kirley, 1996; Wang et al., 1998). Iako ne dolaze direktno u kontakt sa supstratom, TM domeni regulišu formiranje oligomera i aktivnost E-NTPDaze (Grinthal and Guidotti, 2002). Pored homooligomera, E-NTPDaze mogu formirati heterooligomere i komplekse sa purinskim receptorima (Schicker et al., 2009).

Sličnost membranske topologije sa jonskim kanalima i sposobnost oligomerizacije ukazuje na moguću ulogu E-NTPDaza u formiranju Mg^{2+}/Ca^{2+} kanala (Schreiber and Kannan, 2004). Pored enzimske aktivnosti, N-terminalni kraj NTPDaze 1 vezuje RanBPM (*engl. Ran Binding Protein M*), što omogućava interakciju sa različitim signalnim proteinima u ćeliji, pre svega ERK/Ras signalnim putem (Wu et al., 2006). Istovremeno, vezivanje RanBPM izaziva smanjenje

ATPazne aktivnosti. N-terminalni kraj E-NTPDaza takođe sadrži konsensus sekvencu za fosforilaciju PKC (Kegel et al., 1997).

Iako E-NTPaze hidrolizuju NTP i NDP na fiziološkom ili blago baznom pH (7.0-8.5) i u prisustvu dvovalentnih jona, postoje razlike u optimalnom pH i afinitetu prema Ca^{2+} i Mg^{2+} jonima između pojedinih članova familije. Na primer, E-NTPDaza 1 je najaktivnija na neutralnom i baznom pH (7.0-10.0), E-NTPDaze 2 i 8 su aktivne na pH od 4.5 do 8.5 dok E-NTPDaza 3 hidrolizuje supstrate u širokom opsegu pH (4.5-11.0). Od svih analiziranih enzima ove familije, E-NTPDaza 8 najefikasnije hidrolizuje nukleotide na kiselom pH (4.0-6.0), dok je E-NTPDaza 3 najefikasnija na alkalnim pH (9.0-11.0). Poređenjem optimalnih pH za glodarske i humane E-NTPDaze pokazano je da postoje neznatne razlike. Najznačajniji razlika je zapažena za NTPDazu 2 čiji je optimalni pH za hidrolizu ATP pH 6.0 za humani enzim, dok je za mišiji enzim optimalni pH 8.0. Kod mišije E-NTPDaze 3 pronađena je povećana aktivnost na pH 5.0 što nije primećeno kod humane i pacovske E-NTPDaze 3 (Plesner, 1995; Kukulski et al., 2005).

Kinetičke osobine enzima mogu biti različite u prisustvu jona Ca^{2+} ili Mg^{2+} (Kukulski et al., 2005), međutim, uklanjanjem dvovalentnih jona helatorima (EGTA, EDTA) onemogućena je aktivnost enzima. Sve E-NTPDaze hidrolizuju ATP brže od ADP, a odnos početnih brzina hidrolize ATP i ADP karakterističan je za svakog člana familije (tabela 1.2).

Tabela 1.2 Odnos početnih brzina (V_0) hidrolize ATP i ADP za E-NTPDaze 1, 2, 3 i 8 (Zimmermann, 2000)

Enzim	Odnos $V_0^{(\text{ATP})}/V_0^{(\text{ADP})}$
E-NTPDaza 1	1:0.5-1:0.9
E-NTPDaza 2	>1:0.03
E-NTPDaza 3	1:0.3
E-NTPDaza 8	1:0.5

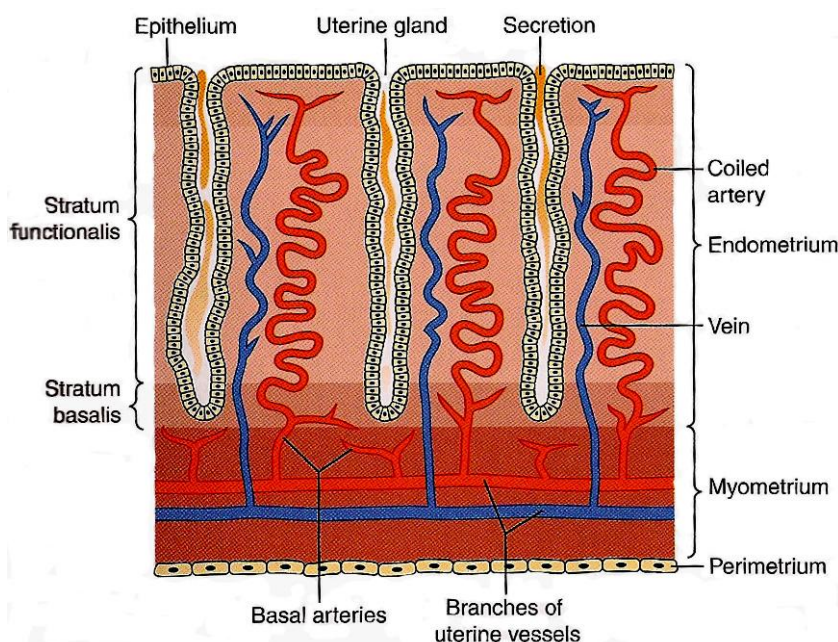
E-NTPDaze 2, 3 i 8 hidrolizuju ATP do ADP, koji se oslobađa kao međuproizvod, a zatim se dalje hidrolizuje do AMP. U slučaju E-NTPDaze 2, usled malog afinitet prema ADP dolazi do njegovog nagomilavanja pre nego što se hidroliza nastavi do AMP. Za razliku od ostalih članova familije, NTPDaza 1, koja

ima jednak afinitet za oba substrata, hidrolizuje ATP do AMP bez otpuštanja ADP kao međuproizvoda (Heine et al., 1999).

Značajna karakteristika ove familije enzima je neosetljivost na specifične inhibitore F-, P- i V-tipa ATPaza: oligomicin, vanadat ili ouabain. Azid u milimolarnim koncentracijama (2-10 mM) inhibira E-NTPDazu 1, 3 i 8, ali ne i NTPDazu 2. Inhibicija azidom zavisi od supstrata i dvovalentnih jona: hidroliza ADP je uvek više inhibirana od hidrolize ATP, a inhibicija je obično veća u prisustvu Mg^{2+} nego u prisustvu Ca^{2+} (Knowles and Nagy, 1999). Specifični inhibitori E-NTPDaza do sada nisu pronađeni, iako su testirana brojna jedinjenja, na primer: reactive blue 2, suramin (Yegutkin and Burnstock, 2000), analozi ATP (Yegutkin and Burnstock, 2000; Gendron et al., 2002; Levesque et al., 2007) i polioksometalati (Muller et al., 2006; Čolovic et al., 2011).

1.2 Uterus

Uterus (materica) igra ključnu ulogu u opstanku viviparnih životinja i pruža okruženje koje omogućava da dva različita organizma (majka i plod) koegzistiraju od trenutka implantacije do rođenja (ploda). Uterus se nalazi u delu abdomena koji se naziva pelvis i sastoji se iz endometrijuma, miometrijuma i perimetrijuma (slika 1.6).



Slika 1.6 Građa uterusu (Mesiano, 2009)

Endometrijum (unutrašnji sloj-sluzokoža) se sastoji iz tri sloja. Na površini, prema lumenu uterusu, nalazi se sloj epitelijalnih ćelija ispod koga se proteže

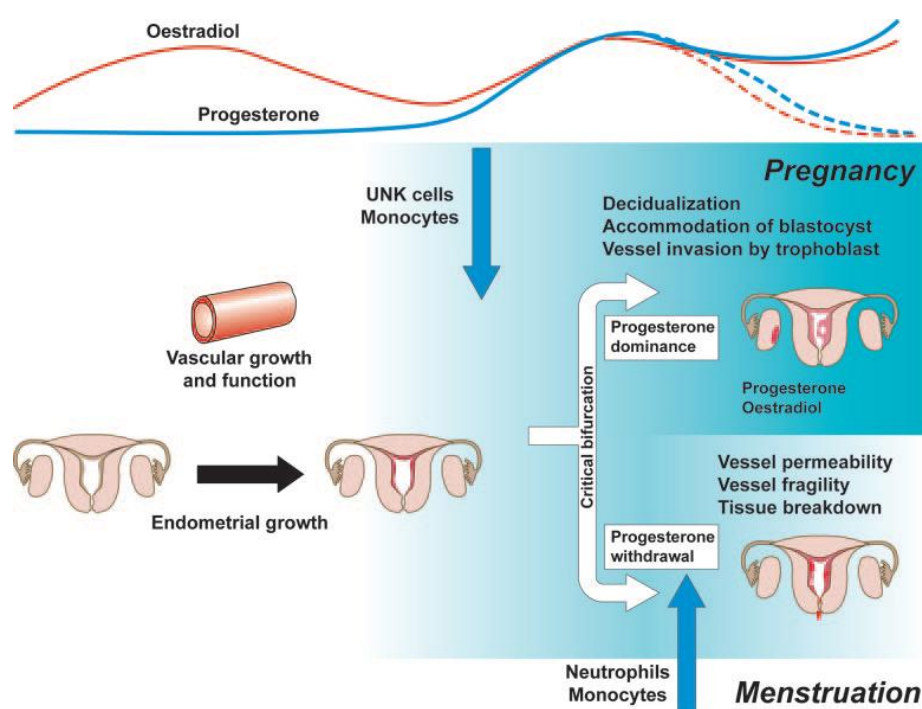
endometrijalna stroma (*lamina propria*). U ovom sloju mogu se razlikovati funkcionalni (*stratum functionalis*) i bazalni sloj (*stratum basalis*), koji se nalazi uz miometrium i sastoji se od brojnih vezivnih ćelija i vlakana. Epitel i funkcionalni sloj endometrijalne strome podležu cikličnim promenama koje nastaju kao posledica delovanja hormona. U funkcionalnom sloju se tokom lutealne faze ciklusa mogu zapaziti krvni sudovi, tzv. spiralne arterije, koje snabdevaju endometrijum krvlju. Ovi krvni sudovi igraju značajnu ulogu tokom menstruacije, kao i tokom uspostavljanja i održavanja trudnoće.

Miometrijum (srednji, mišićni sloj) se sastoji od tri sloja glatkih mišića: spoljne slojeve čine uzdužno orijentisane mišićne ćelije, dok unutrašnji sloj čine kružno postavljeni mišići. Glatke mišićne ćelije međusobno su povezane pukotinastim vezama (*engl. gap junction*) koje omogućuju međućelijsku komunikaciju. Ćelijska membrana (sarkolema) glatkih mišića sadrži invaginacije, tzv. kaveole, specijalizovane za ćelijsku signalizaciju. Ovi mikrodomeni u sarkoplazmi sadrže receptore, generatore sekundarnih glasnika, G-proteine, protein kinaze i jonske kanale grupisane blizu jedan drugog (Aguilar and Mitchell, 2010). Kaveole se često nalaze u blizini sarkoplazmatičnog retikuluma ili mitohondrija, što ukazuje na njihovu metaboličku ulogu. Kontrakcija glatkih mišića može biti izazvana opterećenjem - istezanjem (*engl. stretch*), strujom pukotinastih veza (*engl. gap junction electrical*), hormonima ili nervnom stimulacijom. Stimulacija mišićne ćelije dovodi do povećanja unutarćelijskog kalcijuma. Obrazac kontrakcija glatkih mišića uterusa može se opisati kao fazični: nakon stimulusa mišići se kontrahuju brzo i snažno, a zatim se brzo opuštaju. Pored steroidnih hormona iz jajnika, na kontraktilnost uterusa utiču i peptidni hormoni kao što su CGRP (*calcitonin gene related peptide*) i oksitocin. CGRP smanjenje kontrakcije tokom trudnoće, sve do porođaja, dok oksitocin snažno stimuliše kontrakcije gravidnog uterusa u vreme porođaja. Parakrini medijatori kao što su prostaglandini ($\text{PGF}_{2\alpha}$ i PGE_2) (Sanborn, 2007), NO (Buxton, 2004) i ATP (Burnstock, 2014) takođe regulišu kontraktilnost uterusa. Glatki mišići su inervisani autonomnim nervnim sistemom i ne poseduju prave nervno-mišićne spojnice. Akson se završava mnogobrojnim granama koje imaju proširenja (varikozitete) u kojima se nalaze neurotransmiteri, koji po oslobađanju difunduju do većeg broja glatkih mišićnih ćelija.

Perimetrijum (spoljni sloj-seroza) je peritoneum koji obavija uterus i u kom se nalaze ligamenti koji održavaju uterus na svom mestu u abdomenu. Kroz ovaj sloj do uterusa dopiru nervi, krvni i limfni sudovi.

Tokom estrusnog ciklusa, implantacije i trudnoće, uterus trpi značajne promene strukture i funkcije (tzv. remodelovanje). Ove promene su regulisane složenim nervnim i hormonskim mehanizmima. Pored miometrijuma, endometrijuma i nervnih završetaka (Latini et al., 2008), u procesima remodelovanja važnu ulogu imaju ćelije imunog sistema (Koshi et al., 2005). Imunološki sistem majke se prilagođava kako bi se izbeglo odbacivanje ploda, a promene u lokalnom imunitetu kontrolišu steroidni hormoni koje luče jajnici i placenta. Ako do oplodnje ne dođe iste ćelije su uključene u "ljuštenje" endometrijuma (Critchley et al., 2001).

Steroidni hormoni izlučeni iz jajnika: estradiol (E2) i progesteron (P4) odgovorni su za promene u strukturi i funkciji endometrijuma tokom estrusnog ciklusa (Slika 1.7).



Slika 1.7 Promene u uterusu pod uticajem progesterona i estradiola (Jabbour et al., 2006)

Nakon proliferativnog perioda pod uticajem estrogena u prvoj polovini ciklusa, progesteron iz žutog tela izaziva sekretorne promene koje čine endometrijum prijemčivim za implantaciju ploda. Epitel endometrijuma proizvodi različite hemokine, faktore rasta i molekule za ćelijsku adheziju, dok povećan razvoj spiralnih

arteriola u stromi endometrijuma obezbeđuje optimalnu podlogu za invaziju blastocita. Kasnije tokom lutealne faze, stroma endometrijuma podleže nizu morfoloških i funkcionalnih promena (decidualizacija). Ovaj proces zavisi od progesterona i dešava se nezavisno od začeća i implantacije. Decidua je zadebljan endometrijum sa rastresitim vezivom sačinjenim od kolagena, laminina, fibronektina i heparan-sulfat-proteoglikana, u kome se nalaze uvećane, poliedrične i vretenaste decidualne ćelije, razmeštene u stromi u vidu mozaika. Smatra se da decidua formira kritičnu barijeru kojom organizam majke ograničava invaziju blastocista. Prema tome, blastocist ima ograničen vremenski period za uspešnu implantaciju pre nego što je barijera decidue uspostavljena. Termin decidua je pogodan pošto označava tkivo koje se odbacuje tokom menstruacije, pobačaja i porođaja. Ukoliko dođe do oplodnje, uspostavlja se složen parakrini dijalog između embriona i endometrijuma koji vodi implantaciji. Tokom prolaska kroz jajovod oplođena jajna ćelija proizvodi P4 i E2 koji lokalno deluju na pokretljivost/kontrakcije jajovoda što olakšava transport prema šupljini uterusa. Progesteron igra ključnu ulogu u održavanju trudnoće kod sisara i svaki poremećaj u sintezi ili delovanju ovog hormona dovodi do pobačaja. Pored supresije T-limfocita koja sprečava odbacivanje ploda, P4 ima glavnu ulogu u relaksaciji mišića materice (Mesiano, 2009)

Ako do oplodnje ne dođe, pad koncentracije P4 koji prati propadanje žutog tela dovodi do menstruacije. U predmenstrualnoj fazi povlačenje progesterona izaziva kaskadu događaja koji uključuju ekspresiju citokina koji privlače leukocite u uterus i ekspresiju matriks metaloproteinaza (MMP), enzima koji razgrađuju vanćelijski matriks. Između hormona i leukocita, tj. imunog sistema, odigrava se složen dijalog putem lokalno proizvedenih citokina i faktora rasta, pošto receptori polnih hormona nisu detektovani na ćelijama imunog sistema u uterusu. Zbog priliva leukocita, oslobađanja prostaglandina i razvoja edema strome, promene u uterusu nalikuju na inflamatorni događaj. Pad nivoa P4 izaziva i suženje spiralnih arterija što dovodi do hipoksije u zonama najbliže lumenu uterusa. Tačna priroda medijatora vazokonstrikcije u endometrijumu nije poznata: pored prostaglandina, ulogu u suženju krvnih sudova mogu imati i endotelini kao i angiotenzin II. Hipoksija, koja nastaje kao posledica vazokonstrikcije, stimuliše oslobađanje citokina preko NF κ B signalnog puta i aktivira gene koji imaju „hipoksija-zavisne“ elemente, kao što je

vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), lokalni medijator koji ima ulogu u modulaciji MMP kao i povećanju propustljivosti krvnih sudova, što dovodi do edema. Kombinovano povećanje proteolitičkih enzima proizvedenih prvo u stromalnim ćelijama, a kasnije u leukocitima, dovodi do razgradnje tkiva i krvarenja tokom menstruacije (Mesiano, 2009).

1.2.1 Purinergička signalizacija u reproduktivnim organima

Poslednjih godina raste broj literaturnih podataka o značaju purinergičke signalizacije u fiziologiji reproduktivnih organa oba pola. ATP ima ulogu u kontrakciji glatke muskulature tokom erekcije, ejakulacije i laktacije (Burnstock, 2006b). Takođe, ATP povećava izlučivanje testosterona u Lajdigovim ćelijama (Foresta et al., 1996), moduliše odgovor na folikulo-stimulišući hormon u Sertolijevim ćelijama (Filippini et al., 1994), učestvuje u kontroli folikularnog ciklusa jajnika (Park et al., 2003; Tai et al., 2005) i reguliše transepitelijalni transport u jajvodima. Obrazac ekspresije purinskih receptora se menja u testisima tokom spermatogeneze (Glass et al., 2001) i u uterusu tokom implantacije i trudnoće (Slater et al., 2000; Slater et al., 2002). Egzogeni ATP povećava pokretljivost humane sperme, dok adenozin ima važnu ulogu u procesu kapacitacije, tj. seriji promena ključnih za oplodnju kroz koje prolaze spermatozoidi u ženskom reproduktivnom traktu (Fraser, 2010). Vanćelijski adenozin ima ulogu u procesima tokom rane implantacije (Blackburn et al., 1992), a učestvuje i u kontroli kontrakcija miometrijuma (Gillman and Pennefather, 1998).

U pregledu literature koji sledi dat je prikaz uloge i lokalizacije komponenti purinergičke signalizacije u različitim ćelijama tkiva uterusa.

Dobra inervacija i prokrvljenost ženskih reproduktivnih organa predstavlja izvor ATP koji se izlučuje iz autonomnih nervnih završetaka i trombocita. Takođe, značajan izvor ATP predstavlja i sperma. ATP i njegovi proizvodi hidrolize vezivanjem za specifične purinske receptore izazivaju povećanje nivoa kalcijuma unutar ćelije (P2 receptor) ili stimulišu/inhibiraju cAMP kaskadu (P1 receptor). Prema tome, purinergička signalizacija doprinosi regulaciji većine fizioloških promena u ženskim reproduktivnim organima tokom i nakon reproduktivnog perioda.

Još od kraja 70-ih godina XX veka poznato je da ATP i adenozin izazivaju kontrakcije uterusa zamoraca. Tretman nesteroidnim antiinflamatornim lekovima (NSAID) inhibira ove kontrakcije, bez uticaja na kontraktilnost izazvanu acetilholinom i bradikininom, te su autori zaključili da nukleotidi aktiviraju sintezu prostaglandina u glatkim mišićima miometrijuma, koji zatim izazivaju kontrakcije (Moritoki et al., 1979). Novija istraživanja pokazala su da je glavno mesto sinteze prostaglandina endometrijum, a ne miometrijum. Upotrebom agonista P2 i P1 receptora, pokazano je da se sinteza prostaglandina F (PGF) dešava kao posledica purinergičke signalizacije (Aitken et al., 2001).

Prisustvo obe klase purinergičkih receptora (P1 i P2) pokazano je u uterusu pacova (Gillman and Pennefather, 1998; Vial and Evans, 2001). Utvrđeno je da tokom estrusnog ciklusa (Bardini et al., 2000), implantacije i trudnoće (Slater et al., 2000; Slater et al., 2002; Urabe et al., 2009) dolazi do promena ekspresije P2 receptora. U miometrijumu, prisustvo obe vrste P2 receptora ima važnu ulogu u regulaciji kontrahovanja uterusa u svim fazama trudnoće. ATP je univerzalan agonist P2 receptora, izuzev P2Y₁₂ receptora za koji predstavlja specifičan antagonist. Aktivacija obe vrste P2 receptora dovodi do povećanja kalcijuma unutar ćelije i kontrole ciklusa kontrakcije i relaksacije glatkih mišića. Promene u nivou kalcijuma unutar ćelije su pod kontrolom više signalnih puteva koje, pored purinskih nukleotida, pokreću i medijatori kao što su oksitocin, vazopresin, prostaglandini, epidermalni faktor rasta i proinflamatorni citokini (Sanborn et al., 2005; Sanborn, 2007). Takođe, pokazano je da indometacin, inhibitor sinteze prostaglandina, smanjuje, dok L-NAME (*L*-arginin metil ester), inhibitor NO sintaze, stimuliše kontrakcije izazvane ATP (Ziganshin et al., 2006), te se može pretpostaviti da je efekat ATP na uterus složen i da zavisi od više komponenti čiji udeo može biti promenljiv tokom estrusnog ciklusa i trudnoće.

Ekspresija P2X₄ i P2X₇ receptora postepeno raste pred kraj trudnoće i postiže najviši nivo neposredno pred porođaj (Urabe et al., 2009). Smatra se da P2X₄ receptor, zbog velike propustljivosti za kalcijumove jone, ima značajnu ulogu u kontroli kontrakcija tokom porođaja, dok ekspresija P2X₇ receptora na leukocitima, fibroblastima i makrofagima strome uterusa ukazuje na ulogu ovog receptora u lokalnoj regulaciji imunog odgovora tokom menstruacije, implantacije i trudnoće

(Koshi et al., 2005). U poređenju sa ostalim članovima familije P2X receptora koji pokazuju brzu ili postepenu desenzitizaciju (P2X₁ i P2X₃ nakon 1 s, a P2X_{2,4,5} nakon 30-60 s), P2X₇ receptor ne podleže desenzitizaciji. Ispitivanjem uticaja ATP i različitih agonista i antagonista P2X₇ receptora na kontrakcije ćelija miometrijuma, metodom nametnute voltaže (*engl. patch clamp*), pokazana je funkcionalna uloga P2X₇ receptora u kontraktilnosti miometrijuma pacova tokom kasne gestacije (19-21 dan) (Miyoshi et al., 2010). Dozno zavisna aktivacija ovih receptora i odsustvo desenzitizacija ukazuje na značaj ovih receptora u generisanju snažnih kontrakcija tokom porođaja.

Zapaljenski procesi u reproduktivnim organima povećavaju rizik od neplodnosti i vanmaterične trudnoće, dok sistemska inflamacija može biti jedan od uzroka prevremenog porođaja. Pokazano je da ATP (10^{-6} - 10^{-4} M) ima malo ili nimalo efekta na spontanu kontraktilnost zdravih humanih jajovoda, ali zato značajno povećava spontane kontrakcije jajovoda sa akutnom inflamacijom. Sličan efekat na spontanu kontraktilnost jajovoda dobijen je primenom analoga ATP (2-metiltio-ATP i α,β -metilen-ATP), što sugerise na povećanu ekspresiju P2X₁ i P2X₃ receptora u jajovodima tokom akutnog zapaljenskog procesa (Ziganshin et al., 2008). Smanjenje pH u tkivu tokom akutnog imunog odgovora povećava osetljivost P2X₂ receptora na ATP (King et al., 1997), što takođe može da objasni efekat ATP na kontrakcije jajovoda sa akutnom inflamacijom. Davanje lipopolisaharida ženkama pacova u 19 danu gestacije izaziva značajno povećanja ekspresija P2X₄ i P2X₇ receptora u miometrijumu u odnosu na netretirane životinje (Urabe et al., 2009), kao i do povećanja kontaktilnosti uterusa, što predstavlja jedan od uzroka prevremenog porođaja. Povećanje koncentracije ATP u cirkulaciji ima proinflamatorni efekat, naročito tokom trudnoće. Ženke pacova kojima je dat ATP infuzijom u 14 danu gestacije razvile su simptome proteinurije i sistemske inflamacije, što odgovara stanju preeklampsije kod ljudi (Faas et al., 2010).

Smatra se da aktivacija P2X receptora dovodi do kontrakcije, dok simulacija P2Y receptora izaziva relaksaciju miometrijuma (Ziganshin et al., 2008), tako da je odgovor tkiva na ATP rezultat dva suprotna procesa i zavisi od broja receptora koji su uključeni u signalizaciju. Takođe, moguće je da P2Y receptori "prigušuju" kontrakcije miometrijuma tokom trudnoće, dok P2X omogućavaju postizanje

adekvatnog nivoa kontraktilnosti tokom porođaja. Ispitivanjem spontanijih kontrakcija glatkih mišića humanog miometrijuma *in vitro*, pokazano je da ATP utiče na započinjanje i učestalost kontrakcija, za razliku od oksitocina i prostaglandina koji regulišu jačinu i amplitudu kontrakcija (Hutchings et al., 2009) Takođe, ATP ima različito dejstvo na intaktno tkivo miometriuma u odnosu na gajene ćelije glatkih mišića uterusa (Young et al., 2002), što ukazuje da bi ulogu u započinjanju (*engl. pacemaking*) kontrakcija mogle da imaju intersticijalne (tzv. pejsmejkerske ćelije), a ne mišićne ćelije miometrijuma.

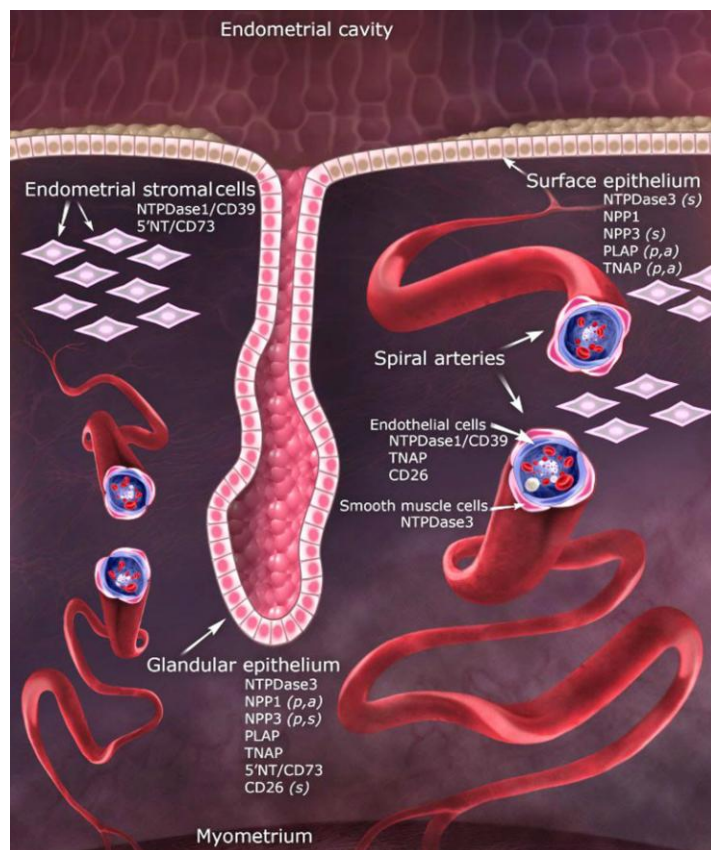
Povećana ekspresija P2Y₂ i P2Y₄ receptora na lateralnoj i apikalnoj strani epitelijalnih ćelija endometrijuma, zajedno sa konstitutivno prisutnim P2X₁₋₇ receptorima, pokreće prenos signala posredovan Ca²⁺, što dovodi do remodelovanja epitelijalnih ćelija. Transformacija plazmine membrane ovih ćelija podrazumeva promene u citoskeletu, ekspresiju TM proteina i lokalne izmene u polisaharidima na površini, što predstavlja pripremu za uspešnu implantaciju blastocita (Slater et al., 2002). Direktni dokaz da ATP ima ulogu u modulisanju menstrualnog ciklusa i implantacije pokazana je u kulturi humanih endometrijalnih ćelija strome (hESC). ATP na dozno i vremenski zavisani način, preko P2 receptora spregnutih sa G proteinima, aktivira podfamiliju MAPK- ERK1/2. Zabeležen je prelaz fosforilovane forme ERK iz citoplazme u jedro i značajno povećanje ekspresije gena za matriks metaloproteinaze: MMP-2, -3, -10 i -24 (Chang et al., 2007). Isti autori su pokazali povećanje proteinske ekspresije P2Y₂ receptora u hESC, a efekat aktivacije ovog receptora praćen je značajnim povećanjem ekspresije erg-1 gena (*engl. early growth response*), koji se aktivira u procesima ćelijskog rasta, diferencijacije i regeneracije nakon oštećenja ćelija/tkiva. Kao posledica aktivacije P2Y₂ receptora u hESC smanjena je vijabilnosti ćelija, što ukazuje na fiziološki značaj ekspresije ovog receptora u endometrijalnim ćelijama strome (Chang et al., 2008).

Promene u sastavu i volumenu fluida u uterusu tokom estrusnog ciklusa imaju značajnu ulogu u procesima kapacitacije, implantacije i razvoja embriona. ATP reguliše proizvodnju cervikalnog mukusa (Gorodeski and Hopfer, 1995), stimuliše sekreciju hlorida (Chan et al., 1997) i inhibira apsorpciju jona natrijuma (Wang and Chan, 2000) u epitelijalnim ćelijama endometrijuma.

Uprkos značaju ektonukleotidaza u fiziološkim procesima u ženskim reproduktivnim organima do skoro je bilo malo literaturnih podataka o ovim enzimima u uterusu. Visoka ekto-ATPazna aktivnost, aktivirana jonima Mg^{2+} i Ca^{2+} , detektovana je u miometrijumu pacova (Soloff and Sweet, 1982; Turi and Torok, 1985; Missiaen et al., 1988) i ljudi (Carrera et al., 2000), ali tek poslednjih godina identifikovani su i okarakterisani enzimi koji učestvuju u razgradnji vanćelijskih nukleotida u uterusu. Ekspresija i karakterizacija enzima iz familije E-NTPDaza pokazana je u uterusu miševa (Martin-Satue et al., 2009), dok je regulacija tokom estrusnog ciklusa pokazana na E-NTPDazama, NPP i AP kod ljudi (Aliagas et al., 2013), NPP kod pacova (Ahn et al., 2011) i eN kod miševa (Aliagas et al., 2010). Poznato je da se različite familije ektonukleotidaza mogu naći u istom tkivu i/ili ćelijama a da su tkivno specifični odgovori posledica ekspresije različite kombinacije članova familije ektonukeotidaza i purinskih receptora na svakom tipu ćelije.

Najnoviji podaci pokazuju prisustvo E-NTPDaze 1 (slika 1.8) na endotelnim ćelijama spiralnih arterija, ćelijama imunog sistema u stromi endometrijuma (Aliagas et al., 2013) i glatkim mišićnim ćelijama (Martin-Satue et al., 2009; Aliagas et al., 2013). E-NTPDaza 3 je nađena jedino u mišićnom sloju spiralnih arterija (slika 1.8) i može se smatrati novim markerom spiralnih arterija u humanom endometrijumu (Aliagas et al., 2013). Remodelovanje spiralnih arterija igra centralnu ulogu u uspostavljanju i održavanju normalne trudnoće, a poremećaji u ovom procesu dovode do spontanih pobačaja i preeklampsije. E-NTPDaza 2 nije detektovana u humanom uterusu, ali je zato ekspresija ovog enzima detektovana u uterusu miševa (Martin-Satue et al., 2009).

Ekto-5'-nukleotidaza je identifikovana u sekretornim i luminalnim ćelijama endometrijumu miša, a promene u ekspresiji ovog enzima uočene su tokom estrusnog ciklusa i gestacije (Bucci and Murphy, 1999; Aliagas et al., 2010). Pored funkcije u regulaciji sastava fluida u uterusu, uloga ovog enzima je stvaranje vanćelijskog adenzina neophodnog za kapacitaciju. U humanom endometrijumu, eN je nađena u bazalnom sloju sekretornog endometrijuma (slika 1.8). Izgleda da adenzin, koji generiše eN, učestvuje u regulaciji cikličnih promena u imunitetu endometrijuma (Maybin et al., 2011).



Slika 1.8 Distribucija ektonukleotidaza u humanom endometriju (Aliagas et al., 2013)

NPP1 i NPP3 su pronađene u sekretornom epitelu endometrija (slika 1.8). Promene njihove ekspresije su recipročno koordinisane tokom ciklusa, tako da, kada je smanjena ekspresija jednog, povećava se ekspresija drugog enzima. Osim toga, NPP3 se nalazi isključivo u sekretornom i luminalnom epitelu endometrija, sa najvećom ekspresijom u sekretornoj fazi ciklusa, te se stoga može smatrati biološkim markerom sekretornog endometrija. Očigledne razlike između ekspresije NPP3 pre i posle menopauze ukazuju na vezu ovog enzima sa reproduktivnim periodom kod žena. Osim toga, pokazano je da je NPP3 novi marker metaplazije endometrija jajovoda što je klinički značajno za njenu dijagnostiku (Aliagas et al., 2013).

Kod pacova, aktivnost alkalnih fosfataza je utvrđena u luminalnom i žlezdanom epitelu endometrija. Lokalno povećanje AP aktivnosti pokazano je tokom decidualizacije, kao i na mestu implantacije blastocista (Bansode et al., 1998). U humanom endometriju, PLAP i TNAP su pronađeni u luminalnom i žlezdanom epitelu. Poređenjem ekspresije ovih izoformi AP tokom estrusnog ciklusa i nakon

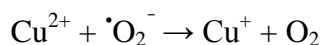
menopauze nije nađena značajna razlika u žlezdanom epitelu, ali su zapažene promene u luminalnom epitelu. Naime, u sekretornoj fazi ciklusa, PLAP i TNAP nisu detektovani u luminalnom delu endometrijuma ali je zato TNAP pronađen u endometrijalnoj stromi. Smatra se da ove varijacije u ekspresiji i distribuciji AP u luminalnom delu endometrijuma prate promene neophodne za implantaciju embriona (Aliagas et al., 2013).

Rasvetljavanje uloge ATP, purinergičkih receptora i ektonukleotidaza tokom fizioloških i patoloških procesa u reproduktivnim organima, otvara mogućnost razvoja farmakoloških supstanci za kontracepciju i tretman patoloških stanja tokom trudnoće, prevremenog porođaja, dismenoreje i neplodnosti.

1.3 Teški metali i njihov uticaj na reproduktivne organe

U literaturi se mogu naći brojne definicije „teških metala”, koje se zasnivaju na gustini ($>5 \text{ g/cm}^3$), atomskoj masi (>40) ili toksičnosti metala. Iako ne postoji jedinstvena definicija, u teške metale se uglavnom ubrajaju elementi iz grupe prelaznih metala i metaloida, koji imaju toksično dejstvo na živi svet: kadmijum, živa, olovo, arsen, hrom i nikl. U teške metale ubrajaju se i neki biometali (mikroelementi), kao što su: gvožđe, kobalt, bakar, cink, mangan, molibden i selen.

Teški metali su toksični, nisu biorazgradivi, imaju veoma dugo poluvreme života u zemljištu i akumuliraju se u živim sistemima putem lanca ishrane, zbog čega njihovo prisustvo u životnoj sredini predstavlja ekološki i zdravstveni problem (Singh et al., 2011). Teški metali, u interakciji sa organskim molekulima u živim sistemima, izazivaju oštećenja ćelijskih membrana i remete njihovu propustljivost. Pored toga, aminokiselinski ostaci proteina su mete za ireverzibilno vezivanje teških metala, što narušava strukturu i smanjuje aktivnost enzima. Pored stvaranja stabilnih kompleksa i helata, joni teških metali mogu biti dodatni izvor reaktivnih kiseoničnih vrsta, izazivajući oksidacioni stres u ćelijama (Žikić et al., 2000). Nastajanje hidroksilnih radikala ($\cdot\text{OH}$), najreaktivnijih kiseoničnih radikala, odvija se tokom Haber-Weiss-ove i Fenton-ove reakcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ i $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$).



1.3.1 Kadmijum

Kadmijum je široko rasprostranjen metal u prirodi. Izvori zagađenja kadmijumom su: vulkanska aktivnost i industrija (proizvodnja i/ili neadekvatno odlaganje otpada: antikorozivni reagensi, stabilizatori u PVC proizvodima, proizvodnja pneumatika, pigmenata, NiCd baterija, upotreba fosfornih đubriva). Apsorpcija kadmijuma uglavnom se odvija respiratorni putem a manjim delom gastrointestinalnim traktom. Najveći izvor inhalacione intoksikacije je pušenje (0.1-1.2 μg /cigareti) (Frieberg L et al., 1974). Zagađenjem površinskih voda, kadmijum putem zemljišta i atmosfere dospeva u biljke, koje su polazna karika u lancu ishrane i izvor kadmijuma za životinje i ljude. Najveće nagomilavanje kadmijuma u organizmu čoveka je u bubrezima i jetri. Iako ne učestvuje u direktnoj metaboličkoj razmeni, kadmijum se vezuje za različite biološke komponente kao što su proteini, tiolne i anjonske grupe različitih makromolekula. Toksičan efekat kadmijum ostvaruje interakcijom sa mikro i makro elementima, posebno sa gvožđem, kalcijumom, bakrom i cinkom. Hronično izlaganje uticaju kadmijuma dovodi do izlučivanja Ca^{2+} iz tela preko bubrega, što može da dovede do oštećenja bubrega i kostiju. Joni kadmijuma mogu da zamene jone Cu^{2+} i Zn^{2+} u metaloenzimima i tako inhibiraju njihovu aktivnost. Iako kadmijum nije redoks aktivan metal i ne učestvuje direktno u Fentonovoj reakciji, indirektnim mehanizmima dovodi do oksidacionog stresa i povećanja nivoa lipidne peroksidacije u ćelijama (Yalin et al., 2006). Vezivanjem za feritin, kadmijum istiskuje jone gvožđa i bakra, čime se povećava koncentracija njihovih slobodnih jona koji mogu da učestvuju u Fentonovoj reakciji (Watjen and Beyersmann, 2004; Jomova and Valko, 2011).

Zbog osobine da se vezuje za estrogene receptor, kadmijum je svrstan u grupu elemenata štetnih po reproduktivno zdravlje (Henson and Chedrese, 2004; Byrne et al., 2009). Izlaganje kadmijumu ovarijektomisanih pacova izaziva povećanje mase uterusa, rast i razvoj mlečnih žlezda i ekspresiju gena regulisanih estrogenim receptorom. Zbog estrogenog efekta, kod životinja izloženih kadmijumu *in utero* primećen je raniji ulazak u pubertet (Johnson et al., 2003). U zavisnosti od doze, kadmijum pokazuje dvojak efekat na sintezu progesterona u ovarijumima: male koncentracije stimulišu, dok velike inhibiraju sintezu (Henson and Chedrese, 2004). Pored toga kadmijum remeti homeostazu i drugih hormona: promena nivoa hormona

hipofize nađena je kod mužjaka pacova nakon hroničnog izlaganja različitim dozama kadmijuma (Lafuente et al., 2003). Izlaganje kadmijumu tokom trudnoće dovodi do male telesne mase novorođenčadi i povećane učestalosti spontanih pobačaja. Kadmijum se akumulira u placenti i smanjuje lučenje hCG (humani horionski gonadotropin), polipeptida presudnog za održanje rane trudnoće. Kod žena pušača pokazano je da udvostručenje koncentracije kadmijuma izaziva skoro 50% smanjenje sinteze progesterona u placenti (Henson and Chedrese, 2004). Takođe, pokazana je korelacija između urinom izlučenog kadmijuma i imunoloških i endokrinih parametara kod žena koje su imale više od dva spontana pobačaja (Gerhard et al., 1998b). Epidemiološka istraživanja i studije na eksperimentalnim životinjama pokazale su da je kadmijum povezan sa razvojem kancera dojke, bubrega, pankreasa, pluća, prostate i bešike (Huff et al., 2007). Mehanizam delovanja na ćelijske funkcije i ekspresiju gena može se pripisati i sličnosti jona Cd^{2+} i Ca^{2+} , zahvaljujući čemu Cd^{2+} ulazi u ćelije putem voltažno- i ligand- zavisnih kanala i aktivira PKC sa mnogostruko većom efikasnošću nego Ca^{2+} (Henson and Chedrese, 2004).

1.3.2 Živa

Živa se u prirodi nalazi u tri oblika: kao isparenja elementarne žive, neorganska i organska jedinjenja. Sagorevanje fosilnih goriva je najveći izvor zagađenja živom. Značajan izvor zagađenja elementarnom živom su termometri, termostati i zubne plombe, kao i fungicidi i pesticidi. Mikroorganizmi u vodi i zemljištu prevode elementarnu živu u organski oblik koji se može naći u ribi. U ćelijama, katalaza oksiduje elementarnu živu do neorganskog oblika, koji se zbog visokog afiniteta za tiolne grupe vezuje za praktično sve proteine. Toksičnost živinih jona pogađa sve organe, prvenstveno mozak, bubrege i gastorintestinalni trakt. Elementarna živa i njeni metaboliti imaju različite mehanizme toksičnog efekta kao što je remećenje homeostaze kalcijuma, membranskog potencijala i transporta, sinteze proteina i aktivnosti enzima. Interakcija jona žive sa slobodnim SH-grupama biomolekula je brza, a veza između žive i SH-grupe veoma stabilna, dok je afinitet za N- i O-ligande relativno nizak u odnosu na afinitet za SH-grupu. Vezivanjem za glutation, živa iscrpljuje ćelijske zalihe tiola što, zajedno sa inhibicijom enzima antioksidativne zaštite, dovodi do oksidativnog stresa (Patrick, 2002).

Epidemiološke studije na populacijama ljudi profesionalno izloženim živinim jedinjenjima, kao i studije na životinjama pokazale su da izlaganje živi izaziva ozbiljne poremećaje reproduktivnih funkcija (Davis et al., 2001; Huff et al., 2007). Iako mehanizmi nisu sasvim jasni, živa se klasifikuje kao reproduktivni toksikant (Kovacic and Jacintho, 2001). Živa se akumulira u endokrinim organima, posebno u hipofizi i adrenalnim žlezdama, što može biti uzrok hormonskih poremećaja kod žena izloženih jedinjenjima žive (Danscher et al., 1990). Na osnovu podataka Svetske zdravstvene organizacije iz 1991. godine, hronični (svakodnevni) unos žive uglavnom je posledica apsorpcije iz amalgama zubnih plombi. Stepem hronične izloženosti živinim jedinjenjima može se proceniti upotrebom helirajućeg agensa 2,3-dimerkaptopropan-1-sulfonske kiseline (DMPS) u testovima stimulisnog izlučivanja teških metala urinom. Primenjen na uzorku populacije žena sa ponovljenim spontanim pobačajuma, test stimulisnog izlučivanja žive pokazao je da je stepen hronične izloženosti srazmeran broju zubnih plombi sa živinim amalgamom. Takođe, pronađena je veza između urinom izlučene žive i imunoloških i endokrinih parametara kod žena koje su imale hormonski disbalans i/ili ponovljane spontane pobačaje. Kod ovih žena zabeležena je smanjena koncentracija progesterona i tireotropnog hormona (TSH) u krvi, kao i smanjen procenat supresorskih T ćelija (Gerhard et al., 1998a). S obzirom na značaj prilagođavanja imunog sistema majke tokom trudnoće, kao i na ulogu progesterona u supresiji T-limfocita i relaksaciji mišića uterusa, negativan uticaj žive na nivo hormona i funkcije imunog sistema može biti uzrok spontanih pobačaja. Jedan od mehanizama delovanja na reproduktivne organe je vezivanje jona žive za ligand vezujući domen estrogenog receptora (Martin et al., 2003). Estrogeni efekat živa(II)-hlorida ispitan je u ćelijskoj kulturi, praćenjem proliferacije ćelija humanog karcinoma dojke (MCF-7). Joni žive (10^{-7} M) stimulisali su deljenje ćelija MCF-7 dok je estrogeni antagonist, ICI 182.780, potpuno blokirao ovaj efekat. Takođe, pokazano je da živa(II)-hlorid može povećati masu uterusa kod ovarijektomisanih pacova (Zhang et al., 2008).

1.3.3 Bakar

Bakar se u prirodi nalazi u obliku minerala a u atmosferu se oslobađa u prašini tokom vulkanskih erupcija. Izvor zagađenja ekosfere bakrom je, pre svega, posledica

ljudske aktivnosti. Jedinjenja bakra imaju široku primenu u industriji i poljoprivredi: preradi ruda, proizvodnji azo-boja, baktericida, fungicida, insekticida, herbicida, itd. Bakar je esencijalan element i ima raznovrsne funkcije u organizmu: aktivira enzime koji učestvuju u metabolizmu gvožđa, stvaranju kolagena, elastina i melatonina. Ima ulogu u funkcionisanju imunog i nervnog sistema, kao i u u razvoju embriona i fetusa (Keen et al., 1998). Gotovo celokupna količina bakra u telu je vezana za proteine, te je koncentracija bakarnih jona veoma mala, osim u slučajevima intoksikacije i nekih poremećaja. Fiziološki i patološki efekat bakar ostvaruje zahvaljujući polivalentnosti i sposobnosti da gradi komplekse sa biomolekulima preko O- N- ili S- donora atoma bioliganda. Intoksikacija bakrom je posledica profesionalne izloženosti, preteranog unošenja hranom, kontaminacije hrane i vode. Toksičnost bakra se povezuje sa velikim brojem različitih simptoma i bolesti. Bakar je redoks aktivan metal i postoji u dva redoks stanja. Joni bakra katalizuju razlaganje peroksida, što dovodi do stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i oksidativnog oštećenja lipida, proteina i DNK. Takođe, joni bakra mogu zameniti jone magnezijuma u MgATP kompleksu i smanjiti aktivnost enzima aktiviranih magnezijumom.

Na osnovu literaturnih podataka, bakar se smatra toksičnim za reproduktivne organe (Kovacic and Jacintho, 2001; Chung et al., 2009). Takođe, svrstava se u grupu metaloestrogena, neorganskih zagađivača koji vezivanjem za estrogeni receptor menjaju ekspresiju specifičnih gena (Darbre, 2006). Primena intrauterinih spirala za kontracepciju koje su sadržale bakar pokazala je da dvovalentni joni bakra utiču na kontraktilnost uterusa i povećavaju infiltraciju leukocita u stromu uterusa, što može biti jedan od mehanizama njegovog kontraceptivnog dejstva. *In vitro* eksperimenti na uterusu pacova potvrdili su da su koncentracije bakra koje izazivaju kontrakcije uporedive sa nivoom bakra pronađenim u cervikalnom mukusu kod žena koje su nosile intrauterine spirale za kontracepciju (Verdugo et al., 1981). Takođe, zabeležen je različit efekat neokuproina, helatora Cu^+ jona, na spontane kontrakcije uterusa ovarijsktomisanih i gravidnih pacova. Neokuproin ($100 \mu\text{M}$) značajno smanjuje amplitudu i učestalost spontanijh kontrakcija uterusa ovarijsktomisanih pacova ali povećava učestalost spontanijh i oksitocinom izazvanih kontrakcija uterusa gravidnih pacova, bez promene amplitude kontrakcije. Primenjen u većoj koncentraciji ($200 \mu\text{M}$), neokuproin je povećavao i amplitudu kontrakcije gravidnog

uterusa pacova. Ovi efekti nisu zabeleženi kada se uterus tretira kuprizonom, helatorom Cu^{2+} ili neokupreionom koji je prethodno zasićen Cu^+ jonima. Primenom suramina, antagonista purinskih preceptora, blokiran je efekat neokuproina na učestalost kontrakcija, dok propranolol, blokator β -adrenoceptora i l-nitroarginin, inhibitor NO sintaze, nisu uticali na efekat neokuproina. Ovi rezultati ukazuju da neokuproin i jednovalentni joni bakra utiču na kontraktilnost uterusa modulacijom purinergičke signalizacije (Kumcu et al., 2009).

1.4 Uticaja teških metala na komponente purinergičke signalizacije

Jedan od mehanizama toksičnog dejstva teških metala je njihov uticaj na purinergičku signalizaciju inhibicijom aktivnosti ektonukleotidaza i/ili promenom afiniteta purinoreceptora.

Pokazano je da joni kadmijuma povećavaju osetljivost jonotropnih, P2X receptora, čija aktivacija pod uticajem ATP dovodi do oslobađanja dopamina u PC12 ćelijama (Ikeda et al., 1996). U interakciji sa A1 receptorima u mozgu pacova, kadmijum izaziva oksidaciju SH grupe Cys i konformacionu promenu koja dovodi do smanjenja afiniteta receptora za agoniste (Rosati and Traversa, 1999). Živa je pozitivan modulator P2X₂ receptora, dok je za P2X₄ receptore negativan modulator (Coddou et al., 2005). Na osnovu ispitivanja efekta jona žive na himerične P2X₂/P2X₄ receptore, otkriveno je primarno mesto vezivanja ovih jona na unutarćelijskom Cys-430 (Coddou et al., 2009). Bakar i cink deluju kao alosterni modulatori P2X receptora, vezujući se za His ostatke jonskog kanala (Lorca et al., 2005; Acuna-Castillo et al., 2007). U studiji u kojoj su P2X₂ i P2X₄ receptori eksprimirani u oocitama *Xenopus-a*, a njihova aktivacija merena metodom nametnute voltaže, pokazano je da cink povećava afinitet oba receptora za ATP, dok bakar povećava afinitet P2X₂ receptora, ali nema efekta na P2X₄ receptor (Xiong et al., 1999). Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem uticaja različitih teških metala kao i njihove kombinacije (Cd+Zn ili Hg+Cu) na P2X₄ receptor, pretpostavlja se da postoje najmanje tri različita mesta vezivanja metalnih jona (Coddou et al., 2005). Dalje, bakar i cink se nalaze uskladišteni u sinaptičkim vezikulama u nekim delovima mozga i oslobađanjem u sinaptičku pukotinu dostižu koncentracije koje mogu da izmene afinitet P2X receptora prema ATP (Huidobro-Toro et al., 2008).

Uticaj jona teških metala na aktivnost ektonukleotidaze, ispitan je u *in vivo* i *in vitro* uslovima na dva model sistema: pacovima i ribi zebrici (*Danio rerio*). Kako ATP ima važnu ulogu u neurotransmisiji, imunomodulaciji i tromboregulaciji, efekat teških metala na aktivnost ektonukleotidaza istraživan je uglavnom na sinaptičkim membranama, limfocitima i trombocitima.

Ispitivanje *in vitro* efekta jona žive(II), kadmijuma i bakra na aktivnost ektonukleotidaza u ćelijskim membranama mozga zebrice pokazalo je da živa inhibira hidrolizu ATP, ADP i AMP, da kadmijum povećava hidrolizu ATP i smanjuje hidrolizu ADP i AMP, a da bakar dovodi do smanjenja hidrolize ATP i ADP, dok je hidroliza AMP nepromenjena (Senger et al., 2006b; Senger et al., 2006a; Rosemberg et al., 2007). U *in vivo* uslovima efekat živa(II)-hlorida (20 µg/L) je bio vremenski zavisian. Nakon prvog dana nije bilo značajne promene aktivnosti E-NTPDaza i eN u mozgu riba, ali je posle 4 dana zabeležena smanjena hidroliza ATP (37%), ADP (42%) i AMP (39%). Nakon hroničnog (30 dana) izlaganja živa(II)-hloridu, hidroliza ATP vratila se na kontrolnu vrednost, hidroliza ADP se značajno povećala (118%), dok je hidroliza AMP (32%) ostala smanjena (Senger et al., 2006a). Akutni tretman bakar-sulfatom u *in vivo* uslovima je nakon 1 dana smanjio hidrolizu ATP (16%), ali ne i ADP i AMP, dok je subhronično izlaganje (4 dana) smanjilo aktivnost E-NTPDaza (31% hidrolizu ATP i 42% ADP) i eN (40%). Pritom je zabeležena i smanjena ekspresija gena za E-NTPDazu 2 i eN (Rosemberg et al., 2007). Zabeležen je uticaj i drugih jona metala (cinka, olova) na ektonukleotidaznu aktivnost u ćelijskim membranama zebrice.

Ispitivanja na sinaptičkim membranama iz mozga pacova pokazala su različit efekat jona žive(II), kadmijuma i bakra u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Joni žive(II) u *in vitro* uslovima inhibiraju E-NTPDaze u korteksu mozga pacova različite starosti ali *in vivo* efekat nije detektovan (Oliveira et al., 1994). Kod odraslih pacova, nakon hroničnog tretmana malim dozama živa(II)-hlorida, aktivnost E-NTPDaza u sinaptičkim membranama korteksa je značajno povećana dok je eN ostala nepromenjena. Joni kadmijuma u *in vitro* uslovima takođe inhibiraju E-NTPDaze u korteksu mozga na dozno-zavisian način (Barcellos et al., 1994). U *in vivo* uslovima, akutni tretman kadmijumom povećava aktivnost Mg^{2+} -ATPaza (177%) dok hroničan tretman vraća aktivnost na kontrolni nivo, verovatno zahvaljujući adaptivnim

mehanizmima (Carageorgiou et al., 2004). Kombinacija jona teških metala (Cd+Pb, Cd+Mn) ima aditivan ili antagonistički efekat na Mg^{2+} -ATPaznu aktivnost u ćelijama mozga pacova (Carfagna et al., 1996), što ukazuje na više različitih mesta vezivanja i/ili promenu konformacije enzima pri vezivanju jona. Uticaj prelaznih (Cu, Zn, Fe, Co) i teških metala (Hg, Pb, Cd) u *in vitro* uslovima, kao i prevencija ili ponovno obnavljanje aktivnosti enzima u prisustvu EDTA i liganda sa SH grupom (L-Cys, GSH) pokazana je na sinaptičkim membranama iz celog mozga pacova (Vujisić et al., 2004; Krstić et al., 2005)

Prisustvo helatora i liganda sa SH grupom takođe ima različit efekat u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Davanje L-Cys neposredno pre intoksikacije kadmijumom, ima zaštitni efekat na aktivnost Mg^{2+} -ATPaze iz mozga pacova, dok u *in vitro* uslovima dodavanje 0.83 mM L-Cys nije uticalo na inhibiciju u prisustvu 1 mM kadmijuma (Carageorgiou et al., 2004). Hronični kotretman kadmijumom i N-acetil-Cys (NAC) vratio je aktivnost E-NTPDaza i eN na kontrolni nivo u odnosu na aktivnost istih enzima u mozgu pacova hronično izloženih kadmijumu. Intoksikacija kadmijumom smanjuje aktivnost E-NTPDaza ali ne utiče na eN u trombocitima, dok tretman NAC nije imao efekta na vraćanje aktivnosti enzima na kontrolni nivo. Inhibicija E-NTPDaza u trombocitima moglo bi da bude objašnjenje hipertenzije koja je zabeležena kao posledica intoksikacije kadmijumom (Goncalves et al., 2013). Na osnovu kinetičkih parametara u *in vitro* eksperimentima, pokazano je da inhibicija Mg^{2+} -ATPazne aktivnosti iz sinaptičkih membrana celog mozga potiče od slobodnih jona bakra, a ne od formiranja kompleksa Cu-ATP, a nekompetitivna inhibicija je pokazala da joni bakra ne ometaju vezivanje ATP za enzim. Takođe, prisustvo EDTA može da spreči inhibiciju izazvanu jonima bakra, kao i da povрати aktivnost enzima heliranjem slobodnih jona bakra u reakcionoj smeši (Vasić et al., 1999).

O uticaju teških metala i mikroelemenata na E-NTPDaze u uterusu nema podataka u literaturi ali je zabeležena inhibicija Mg^{2+} -ATPazne aktivnosti u membranama glatkih mišića miometrijuma dvovalentnim jonima bakra, cinka, nikla, mangana i kobalta (Kosterin et al., 1995). Na osnovu karakteristika ove Mg^{2+} -zavisne ATPazne aktivnosti, kao što je povećanje aktivnosti na alkalnim pH (Kosterin et al., 1995; Danylovyh and Kosterin, 2004), može se pretpostaviti da ova aktivnost potiče od E-NTPDaza.

2 PREDMET I CILJ RADA

Literaturni podaci o visokoj ekto-ATPaznoj aktivnosti u ćelijskim membranama uterusa ukazuju da ektoenzimi koji hidrolizuju vanćelijske nukleotide igraju značajnu ulogu u purinergičkoj signalizaciji u ovom organu. Ipak, u literaturi nema podatka o kinetičkim karakteristikama i zastupljenosti E-NTPDaza u uterusu pacova, kao ni o uticaju zagađivača (teških metala) iz životne sredine na njihovu aktivnost, što je odredilo cilj i glavne zadatke ove doktorske disertacije. Raniji rezultati dobijeni u našoj laboratoriji pokazali su da teški metali *in vitro* inhibiraju membranske enzime iz sinaptičkih membrana mozga pacova, između ostalog i Mg^{2+} -ATPaznu aktivnost, za koju je pokazano da se može pripisati E-NTPDazama. S obzirom na značaj vanćelijskog ATP u kontroli funkcija uterusa, uticaj teških metala na aktivnost E-NTPDaza bi mogao da predstavlja jedan od mehanizama njihovog toksičnog dejstva na reproduktivne funkcije uterusa. *In vitro* ispitivanje uticaja EDTA i L-cisteina na modulaciju efekta metalnih jona pružio bi podatak o mogućoj ulozi O- i S- donor liganda u zaštiti ćelija uterusa od toksičnih efekata ispitivanih metala.

Rad na ovoj doktorskoj disertaciji obuhvatio je sledeće zadatke:

- 1) Optimizaciju protokola za izolovanje i prečišćavanje frakcije ćelijskih membrana iz uterusa pacova i određivanje prečišćenosti dobijenog preparata;
- 2) Nalaženje optimalnih uslova za (maksimalnu) enzimsku aktivnost E-NTPDaza u preparatu ćelijskih membrana izolovanih iz uterusa pacova i određivanje kinetičkih parametara enzima (V_{max} i K_m)
- 3) Identifikaciju članova familije E-NTPDaza prisutnih na ćelijskim membranama uterusa pacova;
- 4) Ispitivanje, u *in vitro* uslovima, inhibicije aktivnosti E-NTPDaza u prisustvu različitih metalnih jona (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+}) i određivanje tipa inhibicije;
- 5) Ispitivanje mogućeg zaštitnog efekta EDTA i L-cisteina, na aktivnost E-NTPDaza u prisustvu jona žive(II), kadmijuma i bakra(II).

3 REZULTATI

Na prisustvo E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova ukazuju literaturni podaci (Turi and Torok, 1985; Magocsi and Penniston, 1991; Valenzuela et al., 1992; Kosterin et al., 1995; Martin-Satue et al., 2009). Iako su ovim enzimima ranije pripisivani različiti nazivi (Mg^{2+} -ATPaza, ATP difosfohidrolaza, apiraza) opisane karakteristike ekto-ATPazne i ekto-ADPazne aktivnosti ukazuju na prisustvo jednog ili više članova familije E-NTPDaza u uterusu pacova.

U skladu sa definisanim ciljevima, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je enzimska aktivnost i ekspresija E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova, kao i uticaj i mehanizam delovanja jona teških metala (žive, kadmijuma, bakra) na vanćelijsku hidrolizu ATP i ADP.

Da bi se realizovali postavljeni zadaci, najpre je optimizovan protokol za izolovanje i prečišćavanje ćelijskih membrana iz uterusa pacova i određena je prečišćenost dobijenog preparata, merenjem hidrolize ATP i ADP u prisustvu inhibitora ostalih membranskih ATPaza. U cilju pronalaženja optimalnih uslova za aktivnost E-NTPDaza u uterusu pacova, enzimska aktivnost je ispitana u zavisnosti od: temperature i pH inkubacione smeše, količine dodatih proteina (enzima) u reakcionu smešu, dužine trajanja enzimske reakcije, koncentracije dvovalentnih jona magnezijuma i kalcijuma i koncentracije ATP i ADP. Analizom genske i proteinske ekspresije potvrđeno je prisustvo članova familije E-NTPDaza u uterusu pacova. Zatim je analizirana aktivnost i promene kinetičkih parametara E-NTPDaze u prisustvu jona žive(II), kadmijuma i bakra(II), kao i zaštitni efekat EDTA i L-Cys na sprečavanje inhibicije i obnavljanje aktivnosti E-NTPDaza iz uterusa pacova.

3.1 Enzimska aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova

U cilju dobijanja većeg stepena prečišćenosti, za izolovanja ćelijskih membrane iz uterusa pacova korišćena je kombinacija dva protokola (Krall and Korenman, 1979; Turi and Torok, 1985). Dobijeni preparat ćelijskih membrana iz uterusa pacova imao je značajno veću (~25%) ATPaznu aktivnost (2.676 ± 0.112 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$) u odnosu na podatak zabeležen u literaturi (1.967 ± 0.241 μmol

Pi/min/mg) (Turi and Torok, 1985), uvođenjem dodatnog koraka prečišćavanja membrana na saharoznom gradijentu (Krall and Korenman, 1979).

3.1.1 Efekat inhibitora različitih ATPaza na hidrolizu ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusu pacova

U slučaju nedovoljne prečišćenosti preparata ćelijskih membrana, hidroliza ATP i ADP može poticati od aktivnosti drugih enzima kao što su nespecifične fosfataze i mitohondrijalna ATPaza. Da bi se procenio doprinos ostalih membranskih enzima u hidrolizi ATP i ADP, pod datim eksperimentalnim uslovima (odjeljak 6.7), ispitan je uticaj različitih inhibitora membranskih i mitohondrijalnih ATPaza (odjeljak 6.7.1) na aktivnost E-NTPDaza u preparatu ćelijskih membrana uterusu pacova. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 3.1.

Tabela 3.1 Efekat inhibitora na hidrolizu ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusu. Rezultati su prikazani kao procenat od kontrolne aktivnosti (srednje vrednosti \pm se, n=3), koja je iznosila 2.280 \pm 0.060 μ mol Pi/min/mg za hidrolizu ATP i 1.117 \pm 0.019 μ mol Pi/min/mg proteina za hidrolizu ADP.

Inhibitor	koncentracija (mM)	% od kontrolne aktivnosti			
		ATPaza		ADPaza	
Natrijum-azid	1.0	93.7 \pm 1.6		94.8 \pm 2.4	
	5.0	83.1 \pm 1.1	**	87.1 \pm 1.8	**
	10.0	75.5 \pm 0.5	**	79.2 \pm 1.5	**
Oligomicin	2 μ g/ml	92.3 \pm 2.4		90.8 \pm 4.7	
Teofilin	1.0	97.6 \pm 0.3		92.3 \pm 0.6	
Levamisol	1.0	89.5 \pm 4.3		95.3 \pm 4.4	
Ouabain	1.0	92.7 \pm 2.3		93.6 \pm 1.0	
Natrijum-fluorid	1.0	91.1 \pm 0.7	*	82.9 \pm 1.8	**
Ortovanadat	0.1	86.3 \pm 0.8	**	71.6 \pm 3.0	**
EDTA	1.0	68.7 \pm 2.6	**	45.9 \pm 1.0	**
Suramin	0.3	48.2 \pm 1.4	**	46.5 \pm 2.2	**

Statistička značajnost je određena jednofaktorskom analizom varijanse - ANOVA, sa nivoom značajnosti * p<0.05, ** p<0.01.

Tokom izolovanja ćelijskih membrana mitohondrije se nalaze u talogu, u frakciji gradijenta koja odgovara 1.2 M saharozi (odjeljak 6.5). Ipak, kontaminacija je

moguća, a jedna od komponenti mitohondrijalne ATPaze (F_1), može se naći nevezana za membranu (solubilna) i hidrolizovati ATP u prisustvu jona magnezijuma. Oligomicin (Penefsky, 1985) i natrijum-azid (Vigers and Ziegler, 1968) su najčešće primenjivani specifični inhibitori mitohondrijalne ATPaze, te su korišćeni i u našim eksperimentima. Oligomicin inhibira membransku F_1F_0 ATPazu, dok natrijum-azid inhibira i membransku (F_1F_0) i solubilnu (F_1) mitohondrijalnu ATPazu. Prisustvo mitohondrija u preparatu ispitano je merenjem enzimske aktivnosti u prisustvu natrijum-azida (1 mM) i oligomicina (2 μ g/ml). Kao što se vidi iz tabele 3.1, hidroliza ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova nije statistički značajno promenjena (<10%) te se preparat može smatrati prečišćenim od mitohondrija. Natrijum-azid dodat u inkubacionu smešu u koncentraciji od 5 mM i 10 mM, podjednako i statistički značajno ($p < 0.01$) je smanjio hidrolizu oba supstrata, ATP (16.9% i 24,5%) i ADP (12.9% i 20,8%) u odnosu na kontrolnu aktivnost, što ukazuje na prisustvo E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova. (Knowles and Nagy, 1999).

Teofilin (1 mM) i levamisol (1 mM) (Van Belle, 1972) nisu statistički značajno (<10%) smanjili hidrolizu ATP i ADP (tabela 3.1), što pokazuje prečišćenost izolovanog preparata od alkalnih fosfataza koje mogu biti aktivirane endogenim kalcijumom.

Ouabain (LeBel et al., 1980) je kardiotionični glikozid koji se vezuje za α -subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze i blokira njenu aktivnost. Iz tabele 3.1 vidi se da prisustvo ouabaina (1 mM) u inkubacionoj smeši nije statistički značajno (<10%) promenilo hidrolizu ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova, te se može zaključiti da pod datim eksperimentalnim uslovima Na^+/K^+ -ATPaza nije aktivna.

Natrijum-fluorid je statistički značajno smanjio hidrolizu ATP (8.9%, $p < 0.05$) i ADP (17.1%, $p < 0.01$). Literaturni podaci ukazuju da natrijum-fluorid može da inhibira i E-ATPDaze (Strobel et al., 1996; Knowles and Nagy, 1999), a kako nije pronađena značajna inhibicija teofilinom i levamisolom, može se zaključiti da alkalne fosfataze ne doprinose značajno hidrolitičkoj aktivnosti u preparatu ćelijskih membrana iz uterusa pacova.

Inhibicija natrijum-ortovanadatom (0.1 mM) (Sorensen and Mahler, 1982) je statistički značajna ($p < 0.01$) i iznosi 13.7% za ATPaznu i 28.4% za ADPaznu

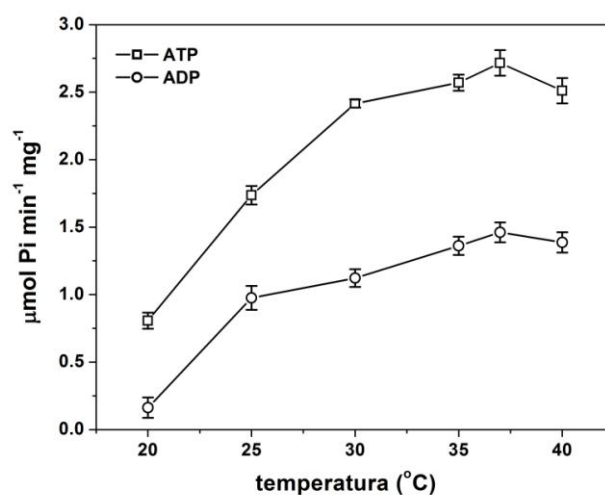
aktivnost. Iako ovaj rezultat može da ukazuje na prisustvo V- i P-tipa ATPaza, u literaturi je opisano da ortovanadat pri malim koncentracijama može da inhibira i E-NTPDaze (Knowles and Nagy, 1999).

EDTA (1 mM) je statistički značajno ($p < 0.01$) smanjio hidrolizu ATP (31.3%) i ADP (54.1%). što je posledica uklanjanja dvovalentnih jona, neophodnih za aktivnost E-NTPDaza. Suramin (0.3 mM) (Marti et al., 1996), inhibitor P2 receptora i E-NTPDaza, smanjio je oko 50% enzimske aktivnosti za oba supstrata, što je takođe potvrda prisustva E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova.

Rezultati prikazani u tabeli 3.1 pokazuju da nespecifične ATPaze u maloj meri doprinose ukupnoj hidrolizi ATP i ADP (10-20%) u preparatu ćelijskih membrana uterusa, te se dobijena aktivnost i određeni kinetički parametri mogu pripisati E-NTPDazama.

3.1.2 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od temperature

Enzimska aktivnost merena je u standardnoj inkubacionoj smeši (odeljak 6.7) na temperaturama od 20°C do 40°C. Reakcija sa supstratom prekinuta je nakon inkubacije od 10 min na odgovarajućoj temperaturi. Na slici 3.1 je prikazana je hidroliza ATP i ADP u zavisnosti od temperature inkubacionog medijuma.



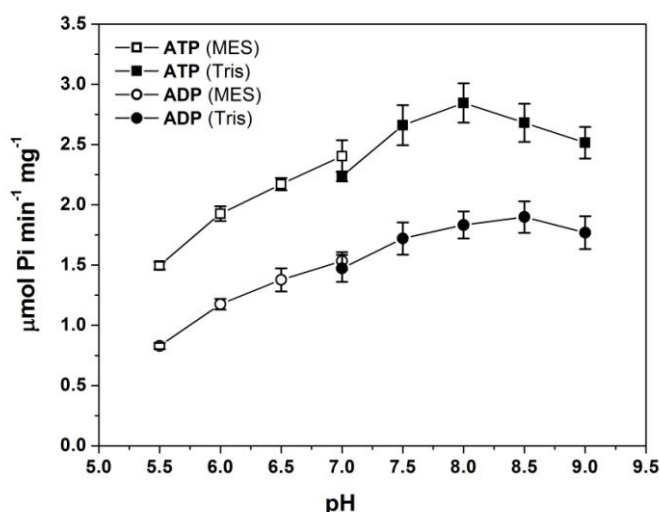
Slika 3.1 Uticaj temperature na hidrolizu ATP (□) i ADP (○) u izolovanom preparatu ćelijskih membrana uterusa pacova. Rezultati su prikazani kao specifična aktivnost (μmol Pi/min/mg) u zavisnosti od temperature (srednja vrednost±se, n=3).

Specifična aktivnost enzima naglo raste u intervalu od 20-25°C dok se od 30-40°C ne menja značajno. Normalna fiziološka temperatura kod albino pacova je između 35.9-37.5°C, što se poklapa sa eksperimentalno dobijenom optimalnom

temperaturom za maksimalnu brzinu enzimske reakcije na 37°C. Stoga je u daljem toku karakterizacije E-NTPDaza, kao optimalna temperatura za enzimske eseje uzeta je temperatura od 37°C.

3.1.3 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od pH

Hidroliza ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova merena je na različitim pH vrednostima, od 5.5 do 9.0. Standardna inkubaciona smeša (odjeljak 6.7) je sadržala 50 mM pufer (Tris ili MES) odgovarajućeg pH, a enzimska reakcija je prekinuta nakon 10 minuta inkubacije na 37°C. Da bi se utvrdilo da li promena pufera značajno utiče na aktivnost enzima, tačka na pH=7.0 je izmerena pojedinačno za oba pufera. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 3.2.



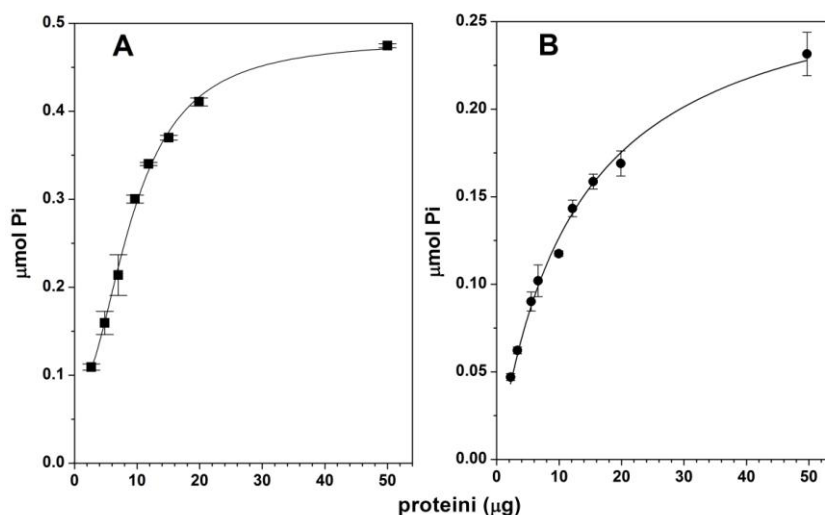
Slika 3.2 Uticaj pH na hidrolizu ATP (□ MES, ■ Tris) i ADP (○ MES, ● Tris) u izolovanom preparatu ćelijskih membrana uterusa pacova. Rezultati su prikazani kao specifična aktivnost ($\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$) u zavisnosti od promene pH inkubacione smeše (srednje vrednosti \pm se, n=3).

Sa slike 3.2 vidi se da hidroliza ATP i ADP nije značajno promenjena u prisustvu MES u odnosu na Tris pufer, na pH 7.0. Maksimalna aktivnost za ATPaznu aktivnost izmerena na pH=8.0 dok je optimalni pH za ADPaznu aktivnost bio 8.5. Iako je nađeni optimalni pH 8.0-8.5, što ukazuje na prisustvo E-NTPDaza, (odjeljak 1.1.3.2), u daljem radu aktivnost enzima ispitana je na pH=7.4, pre svega da bi se umanjio doprinos enzima koji su aktivni u alkalnoj sredini: alkaline fosfataze i E-NPP. Takođe, neutralan pH više odgovara fiziološkim uslovima, a aktivnost enzima nije značajno umanjena (<10%) u odnosu na maksimalnu aktivnost u alkalnoj sredini.

3.1.4 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od količine proteina

Promena enzimske aktivnosti u zavisnosti od količine ukupnih proteina u uzorku (2-50 μg) merena je u standardnoj inkubacionoj smeši (odjeljak 6.7), a enzimski reakcija je trajala 10 min na 37°C i pH 7.4.

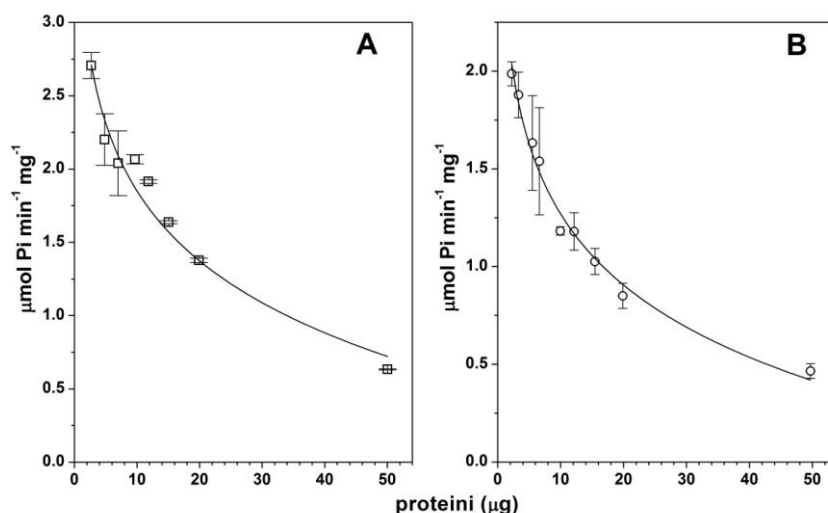
Na slici 3.3 predstavljene su krive toka reakcije izražene u $\mu\text{mol Pi}$, u prisustvu ATP odnosno ADP.



Slika 3.3 Uticaj količine proteina na hidrolizu ATP (A) i ADP (B) u ćelijskim membranama uterusu pacova. Rezultati su prikazani kao količina oslobođenog Pi (μmol) u zavisnosti od količine proteina (srednja vrednost \pm se, n=3).

Ukupna količina oslobođenog proizvoda (Pi) linearno raste za oba supstrata sa povećanjem količine proteina do 10 μg , nakon čega se zapaža usporavanje brzine enzimske reakcije u zavisnosti od količine dodatih proteina. U ovom slučaju, kada se meri ukupna promena količine proizvoda (Pi) u nekom određenom vremenu, usporavanje reakcije javlja se zbog smanjenja dostupne količine substrata u odnosu na dodati protein.

Na slici 3.4 prikazane su vrednosti specifične aktivnosti izražene u $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ u zavisnosti od količine proteina u uzorku.



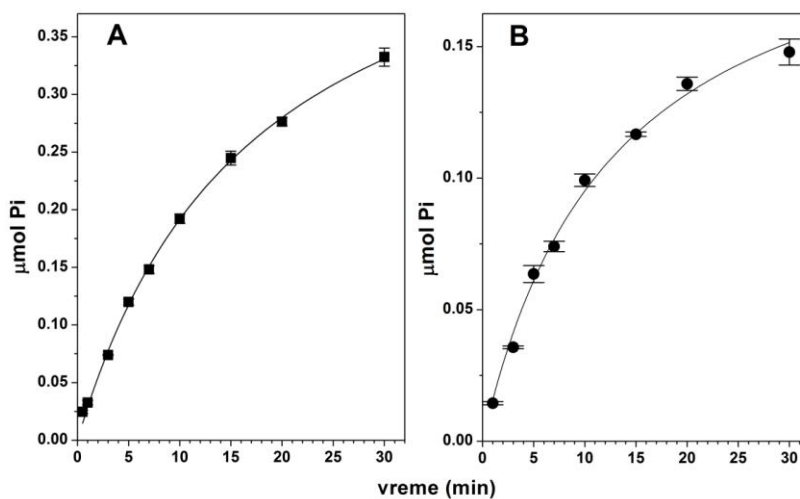
Slika 3.4 Uticaj količine proteina na hidrolizu ATP (**A**) i ADP (**B**) u ćelijskim membranama uterusu pacova. Rezultati su prikazani kao specifična aktivnost ($\mu\text{mol Pi/min/mg}$) u zavisnosti od količine proteina (srednja vrednost \pm se, $n=3$).

Analizom dobijenih krivih na slici 3.4 vidi se da se najveća specifična aktivnost postiže već u prvoj tački, sa najmanjom količinom proteina (2 μg). Ipak, da bi se umanjila greška usled merenja malih vrednosti Pi (0.05-0.1 μmol , odeljak 6.8), u daljem radu odabrana je količina proteina (7 μg) koja se nalazi u okviru linearnog dela krive toka obe enzimske reakcije.

3.1.5 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od dužine trajanja reakcije

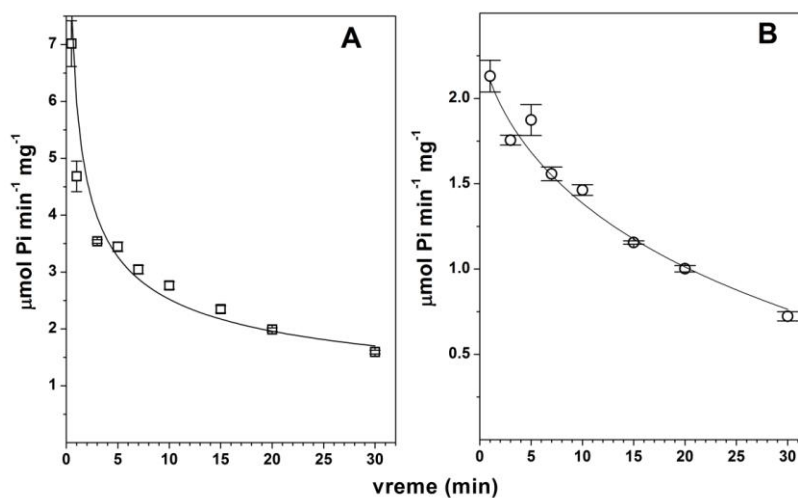
Efekat dužine trajanja reakcije na aktivnost E-NTPDaza analiziran je u vremenskom intervalu od 30 s do 30 min. Standardna inkubaciona smeša (odeljak 6.7) sadržala je optimalne količine proteina (7 μg), utvrđene u prethodnom eksperimentu.

Na slici 3.5 prikazana je ukupna količina oslobođenog Pi u zavisnosti od dužine trajanja enzimske reakcije. Iz krive toka reakcije vidi se da je brzina najveća u vremenu t_0 . Povlačenjem tangente u vremenu t_0 , kriva toka reakcije je praktično prava linija do $t=10$ min za hidrolizu oba supstrata. U ovom delu krive, kada transformacija ne prelazi 5% ukupne količine supstrata, početna brzina je maksimalna brzina reakcije za datu koncentraciju substrata i enzima.



Slika 3.5 Uticaj trajanja reakcije na hidrolizu ATP (A) i ADP (B) u ćelijskim membranama uterusu pacova. Rezultati su prikazani kao količina oslobođenog Pi (μmol) u zavisnosti od vremena trajanja reakcije (srednje vrednosti \pm se, $n=3$).

Na slici 3.6 prikazana je specifična aktivnost enzima u zavisnosti od dužine trajanja reakcije.



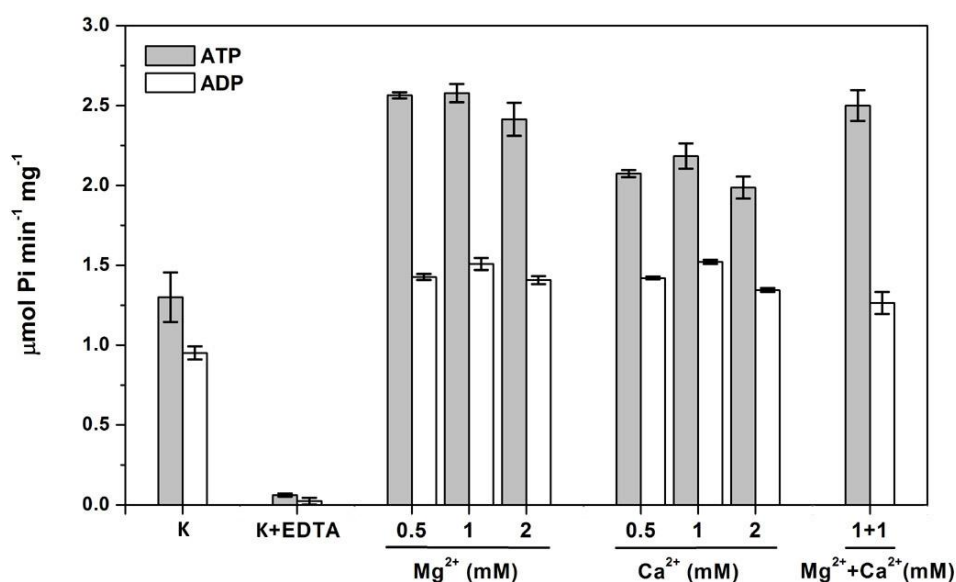
Slika 3.6 Uticaj trajanja reakcije na hidrolizu ATP (A) i ADP (B) u ćelijskim membranama uterusu pacova. Rezultati su prikazani kao specifična aktivnost ($\mu\text{mol Pi/min/mg}$) u zavisnosti od vremena trajanja reakcije (srednje vrednosti \pm se, $n=3$).

Analizom krivih na slici 3.6, najveća količina proizvoda oslobođena je već u prvih 30 s (ATP) odnosno 1 min (ADP). Ipak, ovako kratka inkubacija bi bila izvor greška usled merenja malih vrednosti Pi ($<0.025 \mu\text{mol}$), te je u daljem radu odabrano vreme trajanja reakcije od 10 minuta.

3.1.6 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od koncentracije dvovalentnih jona

Kako je za aktivnost E-NTPDaza neophodno prisustvo dvovalentnih jona kao aktivatora (odjeljak 1.1.3.2), ispitan je uticaj jona magnezijuma i kalcijuma na hidrolizu ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusu pacova. U standardnu inkubacionu smešu (odjeljak 6.7) sa optimalnom količinom proteina (7 μg) dodate su različite koncentracije dvovalentnih jona Mg^{2+} i/ili Ca^{2+} ; (0.5, 1 i 2 mM), kako bi se utvrdilo koji jon i u kojoj koncentraciji predstavlja bolji aktivator enzimske aktivnosti. Inkubacija sa supstratom (1 mM ATP ili 1 mM ADP) trajala je 10 minuta na 37°C i pH 7.4.

Na slici 3.7 prikazan je efekat jona Mg^{2+} i/ili Ca^{2+} na aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusu pacova.



Slika 3.7 Uticaj prisustva dvovalentnih jona na hidrolizu ATP (beli stubići) i ADP (sivi stubići) u ćelijskim membranama uterusu pacova. Enzimska aktivnost izmerena bez dodavanja jona u standardnu inkubacionu smešu (odjeljak 6.7) obeležena je kao kontrolna vrednost (**K**). Aktivnost E-NTPDaza dobijena nakon dodatka 1 mM EDTA u inkubacionu smešu bez dvovalentnih jona obeležena je sa **K+EDTA**. Rezultati su prikazani kao specifična aktivnost ($\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$) u zavisnosti od prisustva/odsustva jona magnezijuma i/ili kalcijuma (srednje vrednosti \pm se, n=3).

Aktivnost obeležena sa K na slici 3.7 predstavlja hidrolizu ATP i ADP bez dodatka dvovalentnih jona u inkubacionu smešu. Ova aktivnost gotovo potpuno nestaje (<5% od kontrolne aktivnosti - K) dodavanjem 1 mM EDTA u standardnu inkubacionu smešu bez dvovalentnih jona (slika 3.7: K+EDTA) Dobijeni rezultati ukazuju na prisustvo izvesne količine dvovalentnih jona u samom uzorku. Ove jone

uklanja helator (EDTA), te se može zaključiti da je prisustvo dvovalentnih jona neophodno za aktivnost enzima u ćelijskim membranama uterusa pacova.

Dobijene vrednosti za hidrolizu ATP u prisustvu jona Mg^{2+} veće su za 97.2% (0.5 mM), 98.3% (1 mM), i 85.7% (2 mM), dok su u prisustvu jona Ca^{2+} jona povećane za 59.6% (0.5 mM), 68% (1 mM) i 52.8% (2 mM) u odnosu na enzimsku aktivnost bez dodatka dvovalentnih jona u inkubacionu smešu (K). ADPazna aktivnost je veća u prisustvu jona Mg^{2+} za 49.9% (0.5 mM), 58.5% (1 mM), i 47.9% (2 mM), a u prisustvu jona Ca^{2+} za 49.3% (0.5 mM), 59.9% (1 mM) i 41.3% (2 mM) u odnosu na aktivnost bez dodatih jona (K).

Iz ovih rezultata se vidi da joni Mg^{2+} bolje aktiviraju ATPaznu aktivnost enzima u odnosu na jone Ca^{2+} , dok je ADPazna aktivnost približno jednako aktivirana Mg^{2+} i Ca^{2+} jonima. Stoga su u daljem toku istraživanja kao aktivator enzimske aktivnosti korišćeni su joni Mg^{2+} u koncentraciji od 1 mM.

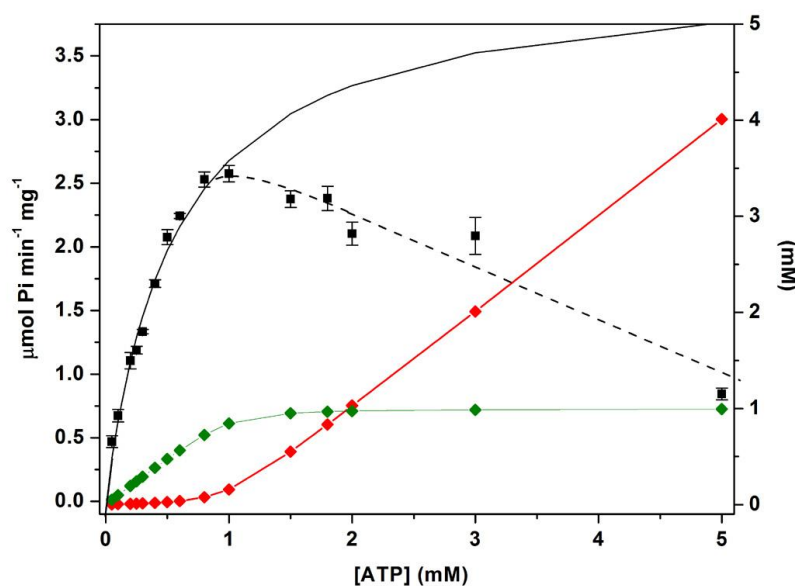
Iako ponaosob joni magnezijuma i kalcijuma aktiviraju hidrolizu ATP i ADP, dodati zajedno (1 mM Mg^{2+} + 1 mM Ca^{2+}) u inkubacionu smešu nemaju aditivan efekat (slika 3.7). Hidroliza ATP (2.500 ± 0.096 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$) i ADP (1.264 ± 0.068 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$), u prisustvu oba jona nije se značajno razlikovala od aktivnosti izmerene u prisustvu samo 1 mM Mg^{2+} (ATP= 2.578 ± 0.057 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$; ADP= 1.508 ± 0.038 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$).

Ovi rezultati ukazuju da se joni magnezijuma i kalcijuma vezuju za isto aktivno mesto na enzimu i da mogu zameniti jedan drugog u katalitičkom ciklusu enzima.

3.1.7 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od koncentracije supstrata

Kinetički parametri E-NTPDaza određeni su praćenjem promene enzimske aktivnosti u zavisnosti od koncentracije ATP, odnosno ADP, od 0.05 do 5 mM, u optimalnim uslovima koji su određeni u prethodnim eksperimentima (37°C, pH 7.4, 7 μg proteina, 10 min, 1 mM Mg^{2+}). Upotrebom programa JONCONC, a na osnovu konstanti stabilnosti nastajanja kompleksa $MgATP^{2-}$ i $MgADP^-$ (odjeljak 6.7.3.1, tabela 6.2), izračunate su promene koncentracije slobodnog supstrata i onog vezanog u kompleksu sa Mg^{2+} , sa povećanjem koncentracije dodatog supstrata (0.05-5.0 mM) pri konstantnoj koncentraciji magnezijum-hlorida (1 mM).

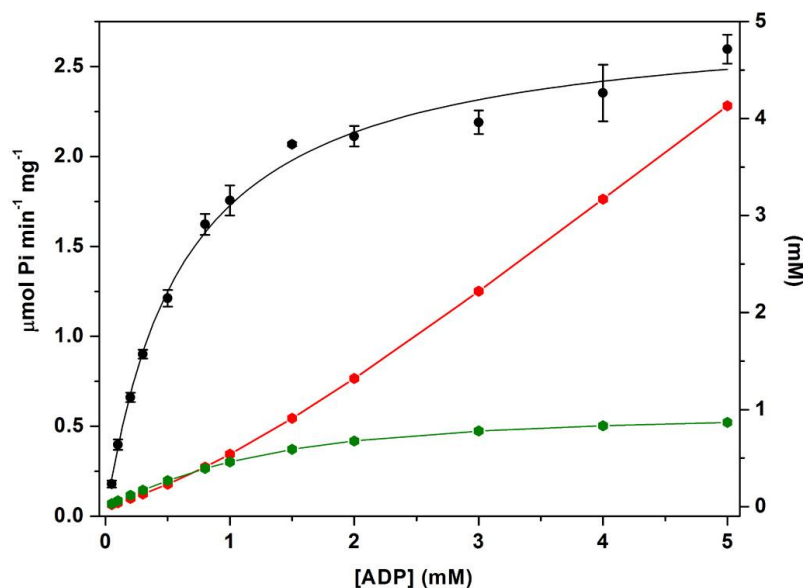
Rezultati su prikazani na slikama 3.8 i 3.9.



Slika 3.8 Uticaj koncentracije ATP na aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusu pacova. Na levoj y-osi predstavljena je specifična aktivnost enzima (■) u zavisnosti od dodatog ATP (0.05-5.0 mM), dok je na desnoj y-osi prikazana promena koncentracije kompleksa MgATP^{2-} (◆) i slobodnog ATP (♦) u zavisnosti od koncentracije dodatog ATP, u prisustvu 1 mM Mg^{2+} . Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm se ($n=3$).

Analizom ATPazne aktivnosti uočava se da pri koncentracijama ATP od 0.05 do 1 mM brzina enzimske reakcije raste do najveće (slika 3.8, leva y-osa), a daljim povećanjem koncentracije ATP javlja se odstupanje od hiperbolične zavisnosti, odnosno dolazi do supstratne inhibicije enzimske reakcije. Na slici 3.8 (desna y-osa) vidi se da povećanjem koncentracije dodatog ATP raste koncentracija kompleksa MgATP^{2-} . Maksimalna brzina enzimske reakcije zabeležena je pri 1 mM koncentraciji dodatog supstrata, kada se 85% dodatog ATP nalazi u kompleksu MgATP^{2-} u odnosu na 15% slobodnog ATP. Daljim povećanjem koncentracije dodatog ATP ($>1\text{mM}$), koncentracija MgATP^{2-} se ne menja dok koncentracija slobodnog ATP nastavlja da raste.

Na osnovu izračunatih koncentracija slobodnog supstrata i kompleksa sa magnezijumom, može se zaključiti da je MgATP^{2-} pravi supstrat za aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusu pacova. Takođe, može se pretpostaviti da je uočena inhibicija ATPazne aktivnosti pri koncentracijama dodatog ATP većim od 1 mM, posledica kompeticije slobodnog ATP i kompleksa MgATP^{2-} za isto mesto vezivanja na enzimu.

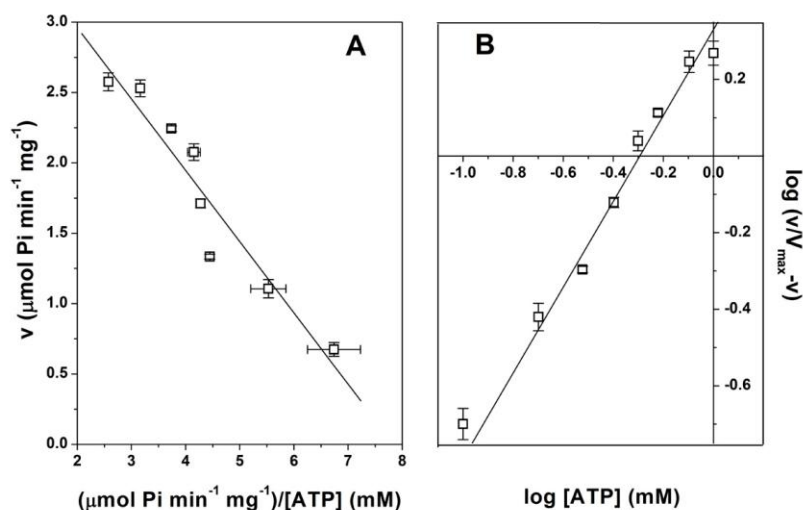


Slika 3.9 Uticaj koncentracije ADP na aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusu pacova. Na levoj y-osi predstavljena je specifična aktivnost enzima (●) u zavisnosti od dodatog ADP (0.05-5.0 mM), dok je na desnoj y-osi prikazana promena koncentracije kompleksa MgADP^{2-} (●) i slobodnog ADP (●) u zavisnosti od koncentracije dodatog ADP, u prisutvu 1 mM MgCl_2 . Svi rezultati predstavljeni su kao srednje vrednosti \pm se (n=3).

Zavisnost aktivnosti E-NTPDaze od koncentracije dodatog ADP ima oblik hiperbole (slika 3.9, leva y-osa) i dostiže plato na koncentracijama većim od 1.5 mM ADP. Na slici 3.9 (desna y-osa) može se uočiti da koncentracije MgADP^+ i slobodnog ADP raste paralelno sa koncentracijom dodatog ADP. Maksimalna brzina enzimske reakcije podudara se sa postizanjem platoa za koncentraciju MgADP^+ kompleksa. Na osnovu izračunatih koncentracija slobodnog ADP i kompleksa sa magnezijumom, može se zaključiti da je kompleks MgADP^+ pravi supstrat za aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusu.

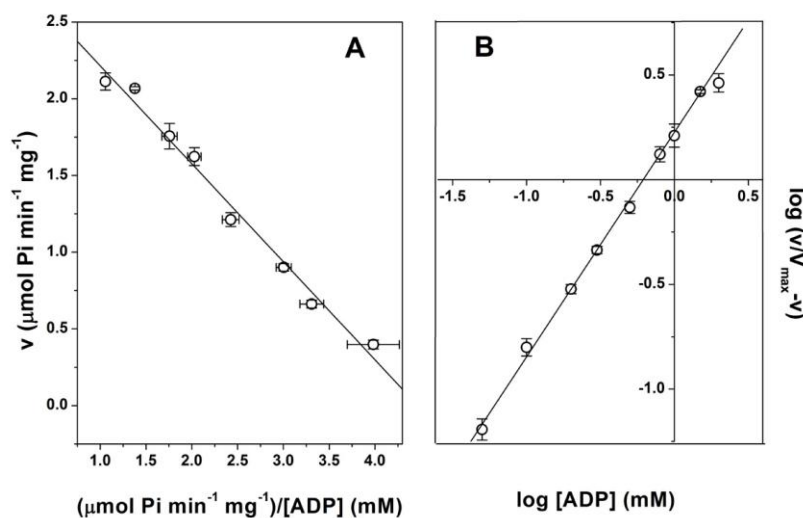
Kinetički parametri enzima su određeni iz eksperimentalnih podataka sa slike 3.10 A i 3.11 A Eadie-Hofstee-jevom transformacijom MM jednačine. Iz odsečka i nagiba prave izračunate su prividne (*engl. apparent*) vrednosti za $K_m^{(app)}$ i $V_{max}^{(app)}$ (tabela 3.2).

Iz vrednosti $K_m^{(app)}$ vidi se da enzim ima veći afinitet za ATP (0.506 ± 0.062 mM) u odnosu na ADP (0.639 ± 0.031 mM). Maksimalna brzina enzimske reakcije je veća za hidrolizu ATP ($V_{max}^{(app)} = 3.973 \pm 0.280$ $\mu\text{mol Pi/min/mg}$) u odnosu na hidrolizu ADP ($V_{max}^{(app)} = 2.854 \pm 0.080$ $\mu\text{mol Pi/min/mg}$).



Slika 3.10 Eadiee-Hofstee–jeva linearizacija (A) i Hill-ova linearizacija (B) hiperbole prikazane na slici 3.9. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm se ($n=3$).

Hill-ovom linearizacijom eksperimentalnih podataka (slike 3.10 B i 3.11 B) dobijene su vrednosti Hill-ovog koeficijenta (n_H) i $K_{0.5}$.



Slika 3.11 Eadiee-Hofstee–jeva linearizacija (A) i Hill-ova linearizacija (B) hiperbole prikazane na slici 3.10. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm se ($n=3$).

Vrednosti Hill-ovih koeficijenata (tabela 3.2) za oba substrata su veće od 1 što ukazuje na blagu kooperativnost u vezivanju ATP ($n_H=1.12\pm 0.02$), odnosno ADP ($n_H=1.07\pm 0.02$).

Tabela 3.2 Kinetički parametri za hidrolizu ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova, u prisustvu 1 mM Mg²⁺. Početne brzine određene su u standardnoj inkubacionoj smeši (odjeljak 6.7) na 37°C i pH 7.4, nakon 10 min trajanja reakcije.

Kinetički parametri E-NTPDaza					
	$V_{\max}^{(app)}$ ($\mu\text{mol Pi/min/mg}$)	$K_M^{(app)}$ (mM)	V_{\max}/K_M	n_H	$K_{0.5}$ (mM)
ATP	3.973±0.280	0.506±0.062	7.85	1.12±0.02	0.531±0.005
ADP	2.854±0.080	0.639±0.031	4.47	1.07±0.02	0.677±0.006

Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti±se (n=6).

Na osnovu dobijenih vrednosti kinetičkih parametara $K_m^{(app)}$ i $V_{\max}^{(app)}$, izračunata je katalitička efikasnost enzima (konstanta specifičnosti) za hidrolizu ATP i ADP, kao što je opisano u odeljku 6.7.3. Konstanta specifičnosti se dobija deljenjem vrednosti $V_{\max}^{(app)}$ sa $K_m^{(app)}$. Odnos konstanti specifičnosti hidrolize ATP i ADP je karakteristična osobina svakog člana familije E-NTPDaza (odjeljak 1.1.3.2, tabela 1.2).

Izračunati odnos početnih brzina hidrolize ATP/ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova je 1:0.57. S obzirom da je nađena blaga kooperativnost u vezivanju oba supstrata ($n_H^{\text{ATP}} \neq n_H^{\text{ADP}}$), konstante specifičnosti se mogu izračunati korišćenjem parametara dobijenih Hill-ovom linearizacijom, n_H i $K_{0.5}$ (Cornish-Bowden and Cardenas, 2010), na osnovu jednačine date u odeljku 6.7.3. Dobijeni odnos početnih brzina hidrolize ATP/ADP je 1:0.54, pri čemu je uzet u obzir različit stepen kooperativnosti vezivanja ATP i ADP za enzim. Dobijeni rezultati ukazuje na prisustvo E-NTPDaze 1 (ATP:ADP=1:0.5-1:0.8) u ćelijskim membranama uterusa pacova, ali ne isključuje mogućnost prisustva još nekog enzima iz pomenute familije.

3.1.8 Kriva kompeticije supstrata

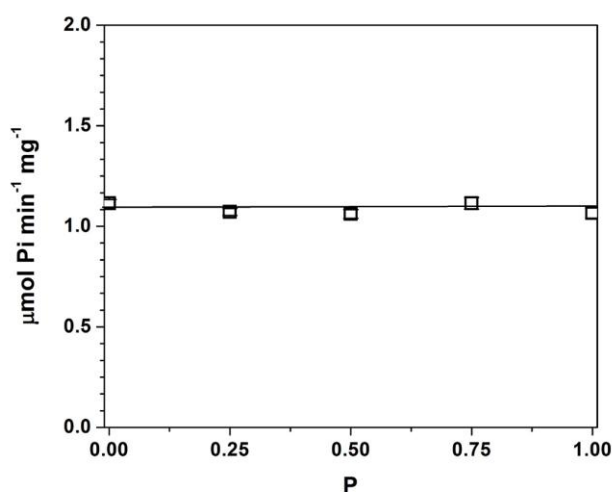
Chevillard-ova kriva kompeticije (Chevillard et al., 1993) je korišćena da se utvrdi da li se hidroliza ATP i ADP odvija na istom aktivnom mestu na enzimu.

Sa grafika $v_0 = f[S]$ prikazanih na slikama 3.8 i 3.9, odabrane su koncentracije ATP (0.25 mM) i ADP (0.5 mM) pri kojima je brzina enzimske reakcije ista (1.100 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$). Zatim je napravljena serija smeša supstrata (ATP i ADP) u različitim odnosima (P). Vrednosti odnosa P bile su od 1 do 0. Kada

je $P=0$ koncentracija ATP je 0.25 mM a ADP 0 mM, dok je pri odnosu $P=1$ koncentracija ADP 0.5 mM a ATP 0 mM.

Ukoliko vrednosti brzine enzimske reakcije za smeše sa različitim odnosima supstrata leže na pravoj horizontalnoj liniji, hidroliza se odvija na istom aktivnom mestu u enzimu. Ako eksperimentale vrednosti daju krivu sa maksimumom, hidroliza se odvija na dva nezavisna mesta, dok oblik krive sa minimumom ukazuje na antagonističke reakcije tj. na postojanje dva mesta vezivanja između kojih postoji međusobno inhibirajući efekat.

Na slici 3.12 prikazana je Chevillard-ova kriva kompeticije ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova.



Slika 3.12 Kriva kompeticije ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova. Koncentracije substrata su odabrane tako da specifična aktivnost za hidrolizu ATP i ADP bude ista ($1.100 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$). U tački $P=0$ koncentracija ATP iznosila je 0.25 mM, u tački $P=1$ koncentracija ADP iznosila je 0.5 mM. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm se, $n=3$.

Kao što se vidi sa slike 3.12 specifična aktivnost enzima u prisustvu različitih odnosa ATP i ADP ostala je nepromenjena, a eksperimentalne tačke mogu se povezati horizontalnom pravom linijom što ukazuje na isto mesto hidrolize oba substrata.

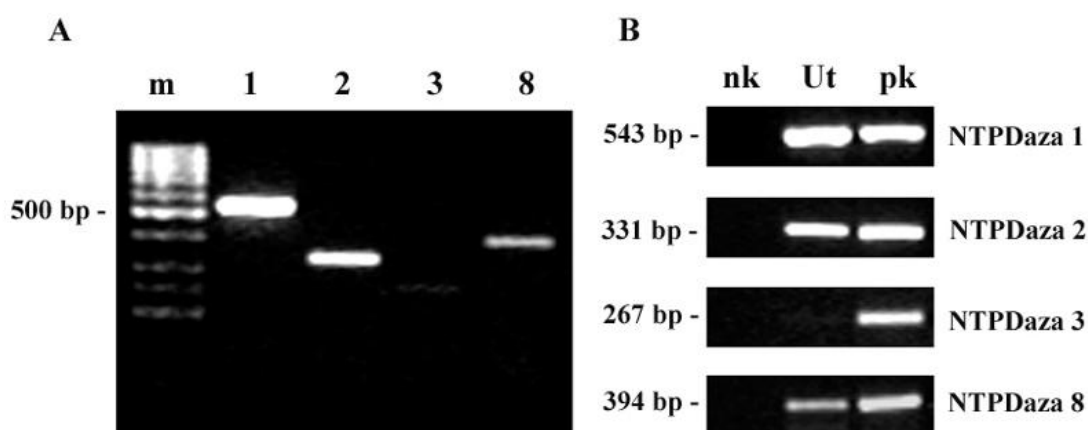
3.2 RT-PCR analiza ekspresije E-NTPDaza u uterusu pacova

Da bi se odredilo koji članovi familije E-NTPDaza su prisutni na ćelijskim membranama, RT-PCR metodom analizirana je ekspresija gena (iRNK) za E-NTPDaze 1, 2, 3 i 8 u uterusu pacova.

Optimalni uslovi za određivanje ekspresije gena *Entpd* 1, 2, 3 i 8 utvrđeni su variranjem temperature hibridizacije (58-68°C) i broja ciklusa (28-35) PCR reakcije za svaki par prajmera, na uzorcima izolovanim iz uterusa i odgovarajućeg kontrolnog tkiva (mozak ili jetra). Optimalna temperatura hibridizacije prajmera bila je 65°C za E-NTPDazu 1, 3 i 8 i 66°C za E-NTPDazu 2, što je u skladu sa literaturnim podacima o ekspresiji E-NTPDaza u bubrezima pacova (Furstenau et al., 2010). Optimalan broj ciklusa za sve prajmere iznosio je 30. Za eksperimentalne detalje videti odeljak 6.9.

S obzirom da PCR može dati lažno pozitivne ili negativne rezultate, urađen je PCR sa cDNK iz uterusa paralelno sa negativnim i pozitivnim kontrolama. cDNK korišćena za pozitivne probe sintetisana je upotrebom ukupne RNK izolovane iz kore mozga ili jetre pacova, dok su kao negativna kontrola za PCR korišćene RT reakcije bez unete RNK (umesto uzorka dodata je dejonizovana voda).

Na slici 3.13 prikazana je ekspresija gena (snimak reprezentativne elektroforeze produkata PCR na agaroznom gelu) za E-NTPDaze iz uterusa pacova.

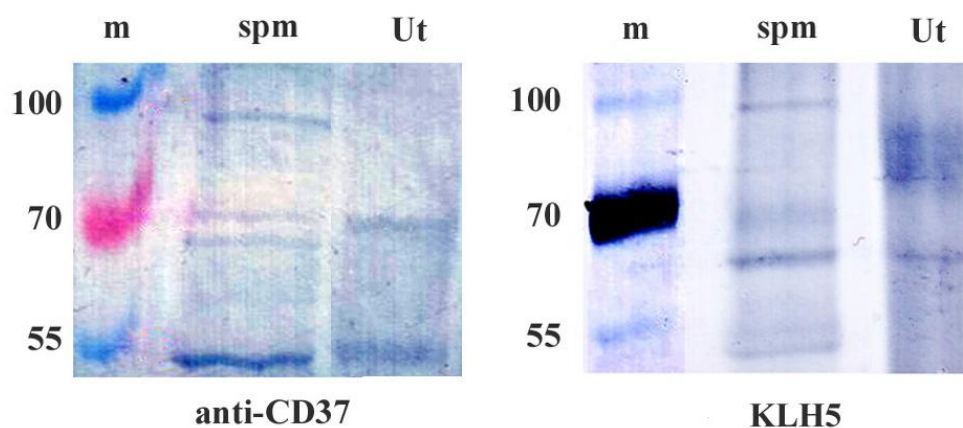


Slika 3.13 RT-PCR analiza ekspresije gena za E-NTPDaze u uterusu pacova. **A**-Ukupna RNK izolovana iz uterusa pacova prevedena je u cDNK i analizirana lančanom reakcijom polimeraze u prisustvu specifičnih prajmera, a produkti PCR reakcije razdvojeni su elektroforezom na 1.5% agaroznom gelu, kao što je opisano u odeljku 6.9. (**m**) marker, (**1**) E-NTPDaza 1, (**2**) E-NTPDaza 2, (**3**) E-NTPDaza 3, (**8**) E-NTPDaza 8. **B**-cDNK iz kore mozga i jetre pacova upotrebljene su kao pozitivne kontrole (**pk**), dok su negativne kontrole (**nk**) predstavljale proizvod reakcije reverzne transkripcije u koju je umesto RNK iz uterusa dodata dejonizovana voda.

Rezultati prikazani na slici 3.13 A pokazuju ekspresiju tri člana familije E-NTPDaza: jasan signal dobijen je amplifikacijom gena *Entpd 1* i *Entpd 2*, dok je amplifikacija gena *Entpd 8* jedva uočljiva. U negativnim kontrolama nije detektovan signal, dok se u pozitivnim kontrolama jasno vidi ekspresija gena za NTPDaze 1, 2 i 3 iz kore mozga kao i za NTPDazu 8 iz jetre (slika 3.13 B).

3.3 Elektroforetsko razdvajanje proteina iz ćelijskih membrana uterusu pacova i Western blot analiza

Western blot analizom ispitana je proteinska ekspresija ENTDPaze 1 i 2 u ćelijskim membranama uterusu i rezultati su prikazani na slici 3.14. Prisustvo E-NTPDaze 1 i 2 u mozgu opisano je u literaturi (Battastini et al., 1995; Boeck et al., 2002; Braun et al., 2003; Nedeljkovic et al., 2003) te su kao kontrolno tkivo korišćene sinaptičke plazma membrane (spm) izolovane iz celog mozga pacova (Nedeljković et al., 1998).



Slika 3.14 Western blot analiza proteina iz ćelijskih membrana uterusu pacova. Proteini (10 μ g po bunariću) su elektroforetski razdvojeni na 8% poliakrilmaidnom gelu, prebaćeni na PVDF membranu i inkubirani sa anti-CD39 (NTPDaza 1) i KLH5 (anti-NTPDaza 2) antitelima, kao što je opisano u poglavlju 6.10. Specifične trake na 65-70 kDa označavaju detektovane proteine u membranama iz sinaptozoma mozga (spm) i uterusu (Ut) pacova.

Poliklonskim antitelom za E-NTPDazu 1 (Nedeljković et al., 2006; Corti et al., 2011) detektuje se specifična traka na molekularnoj masi 70-80 kDa (Heine et al., 1999). Sa slike 3.14 može se uočiti da se je u uzorku ćelijskih membrana uterusu pacova prisutna jedna traka na odgovarajućoj molekularnoj masi (~70 kDa), dok su se na sinaptičkim plazma membranama pojavile dve trake (65-70 kDa), što je

zabeleženo i kod drugih autora (Battastini et al., 1995). Nespecifična traka, koja se pojavljuje u oba tkiva na molekulskoj masi 50-55 kDa, može biti neki proteolitički fragment E-NTPDaza ili ukrštena reakcija sa proteinom koji je zastupljen u pomenutim tkivima. Drugi autori su takođe detektovali sekundarnu traku na molekulskoj masi 50-65 kDa (Kaczmarek et al., 1996; Sevigny et al., 2002; Ostuni et al., 2009) u krvnim sudovima i pljuvačnim žlezdama pacova.

E-NTPDaza 2 detektovana je u ispitivanim uzorcima na molekulskoj masi ~67 kDa nekomercijalnim antitelom KLH5. Specifičnost ove trake prethodno je proverena je primenom preimuno seruma i kontrolom vezivanja sekundarnih antitela (rezultati nisu prikazani).

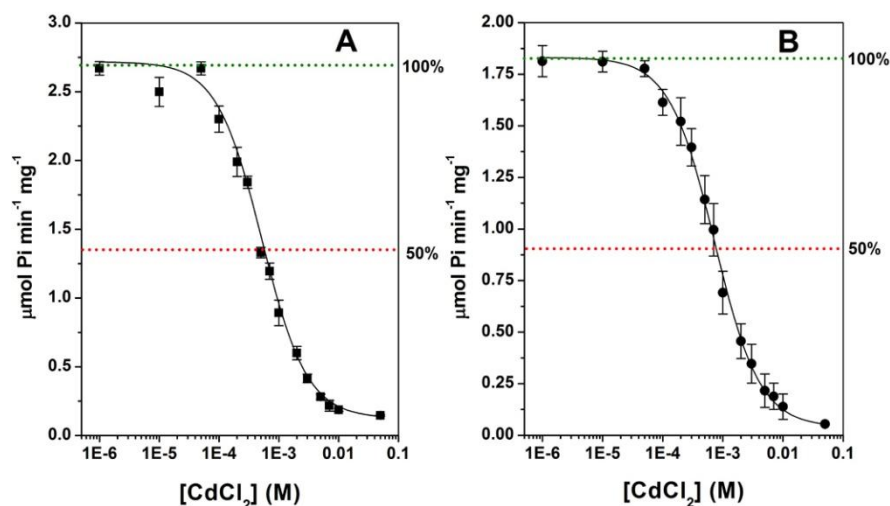
3.4 Uticaj teških i prelaznih metala na aktivnost E-NTPDaza

Efekat jona žive(II), kadmijuma i bakra(II) na aktivnost E-NTPDaza iz uterusu pacova praćen je u prisustvu rastućih koncentracija pomenutih jona (odjeljak 6.7.2) a dobijena enzimaska aktivnost upoređena je sa kontrolnim vrednostima.

Na osnovu eksperimentalno dobijenih krivi inhibicije, određene su IC_{50} vrednosti. Isti podaci obrađeni su Hill-ovom linearizacijom (odjeljak 6.7.3.1) kako bi se utvrdilo da li se joni metala vezuju za jedno ili više mesta na enzimu kao i da li postoji kooperativnost u njihovom vezivanju. Da bi ispitali da li je vezivanje jona metala za E-NTPDaze iz uterusu pacova reverzibilno, enzimaska aktivnost je merena u zavisnosti od vremena preinkubacije uzorka i jona metala. Ireverzibilnu inhibiciju karakteriše progresivan gubitak enzimaska aktivnosti: inhibitor se vezuje za enzim kovalentno ili toliko čvrsto ($K_i < 10^{-9}$ M) da je disocijacija spora ili nemoguća, te kod ovog tipa inhibicije nije moguće obnoviti enzimsku aktivnost. Reverzibilnu inhibiciju karakteriše ravnotežna konstanta inhibicije (K_i), enzimaska aktivnost se može obnoviti uklanjanjem inhibitora, a inhibicija je nezavisna od vremena preinkubacije uzorka sa inhibitorom.

3.4.1 Uticaj jona kadmijuma na aktivnost E-NTPDaza

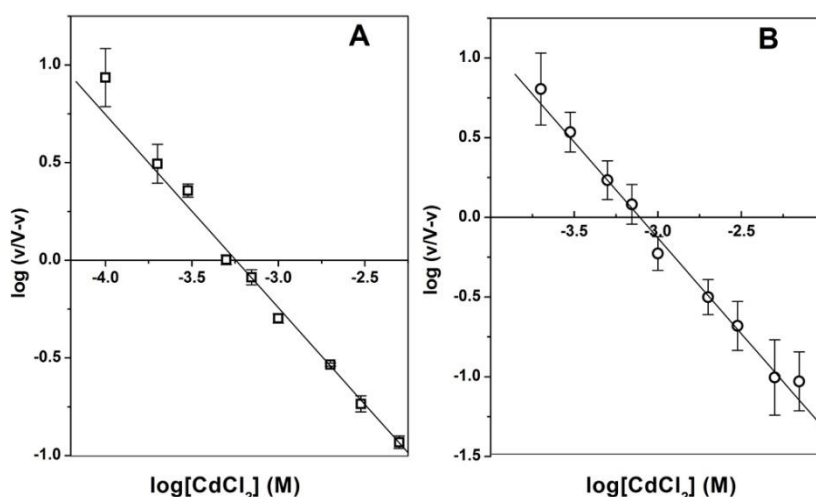
Na slici 3.15 prikazan je uticaj rastućih koncentracija kadmijum-hlorida (10^{-6} - 5×10^{-2} M) na hidrolizu ATP i ADP u ćelijskim membrana uterusa pacova. Rezultati pokazuju da obe inhibicione krive imaju sigmoidalan oblik, a koncentracije jona kadmijuma veće od 1×10^{-4} M dovode do koncentraciono zavisne inhibicije hidrolize ATP i ADP.



Slika 3.15 Krive inhibicije ATPazne (A) i ADPazne (B) aktivnosti u ćelijskim membranama uterusa pacova u prisustvu rastućih koncentracija CdCl_2 . Kontrolna aktivnost, obeležena sa 100% iznosila je 2.691 ± 0.085 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ATP, odnosno 1.829 ± 0.171 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ADP. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm se, $n=3$.

Sa slike 3.15 može se očitati da se 50% inhibicija ATPazne aktivnosti postiže pri koncentraciji od 5.2×10^{-4} M, a ADPazne aktivnosti pri koncentraciji 7.3×10^{-4} M kadmijum-hlorida. U prisustvu 5×10^{-2} M kadmijum-hlorida, preostala aktivnost za hidrolizu ATP iznosi 5% a za hidrolizu ADP 3% kontrolne aktivnosti, te se može smatrati da je postignuta skoro potpuna inhibicija aktivnosti E-NTPDaza jonima kadmijuma.

Hill-ova linearizacija inhibicionih krivi (slika 3.15) u prisustvu rastućih koncentracija CdCl_2 , prikazana je na slici 3.16.



Slika 3.16 Hill-ova linearizacija inhibicionih krivi (slika 3.15) za ATPaznu (A) i ADPaznu (B) aktivnost u ćelijskim membranama uterusu pacova u prisustvu rastućih koncentracija CdCl_2 . Rezultati su obrađeni kao što je opisano u odeljku 6.7.3.1 i prikazani kao srednje vrednosti \pm se, $n=3$.

Parametri koji karakterišu inhibiciju E-NTPDaza u prisustvu jona kadmijuma, prikazani su u tabeli 3.4. IC_{50} vrednosti su određene sa inhibicionih krivi (slika 3.15) i Hill-ovom linearizacijom (slika 3.16). IC_{50} vrednosti dobijene iz inhibicionih krivih su 0.52 ± 0.02 mM za ATPaznu aktivnost, odnosno 0.73 ± 0.01 mM za ADPaznu aktivnost. Izračunate IC_{50} vrednosti Hill-ovom linearizacijom su 0.57 ± 0.01 mM za hidrolizu ATP i 0.78 ± 0.02 mM za hidrolizu ADP. Iz tabele 3.4 vidi se da su vrednosti za IC_{50} dobijene iz prevojne tačke inhibicionih krivih niže u odnosu na one izračunate Hill-ovom linearizacijom.

Tabela 3.3 Parametri inhibicije ATPazne i ADPazne aktivnosti u ćelijskim membranama uterusu pacova u prisustvu CdCl_2 izračunati iz inhibicione krive (slika 3.15) i Hill-ove linearizacije (slika 3.16)

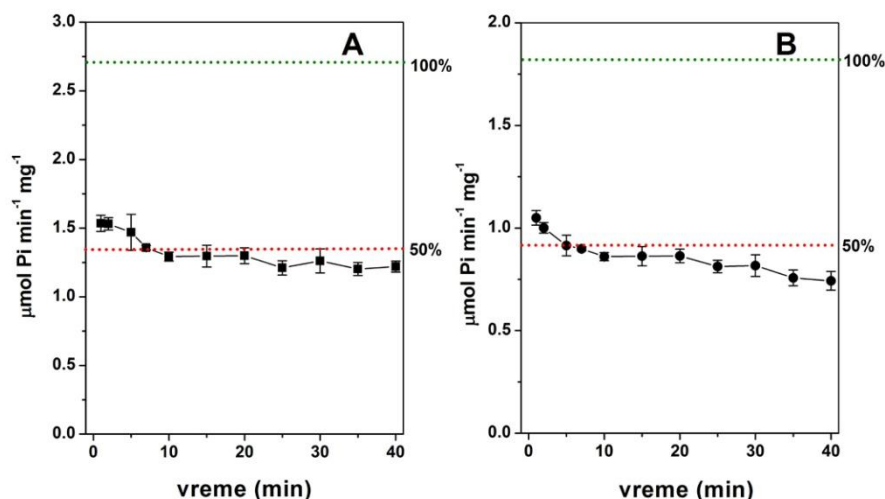
	IC_{50} (mM)		% od I_{\max}	n_H
	Iz krive	Iz Hill-ove linearizacije		
ATP	0.52 ± 0.02	0.57 ± 0.01	95% na 5×10^{-2}	0.99 ± 0.03
ADP	0.73 ± 0.01	0.78 ± 0.02	97% na 5×10^{-2}	1.20 ± 0.11

IC_{50} vrednosti su date kao srednja vrednost \pm se ($n=3$).

Hill-ov koeficijent za ATPaznu aktivnost je približno 1 (0.99 ± 0.03), što ukazuje da nema kooperativnosti u vezivanju jona kadmijuma za enzim. Za

ADPaznu aktivnost koeficijent je $n_H > 1$ (1.20 ± 0.11) pa se može reći da postoji blaga kooperativnost pri vezivanju inhibitora.

Inhibicija ATPazne i ADPazne aktivnosti u ćelijskim membranama uterusu pacova u zavisnosti od vremena preinkubacije uzorka i jona kadmijuma, pri koncentracijama jona metala koje odgovaraju IC_{50} vrednostima dobijenim iz kriva inhibicije (tabela 3.3), prikazana je na slici 3.17.

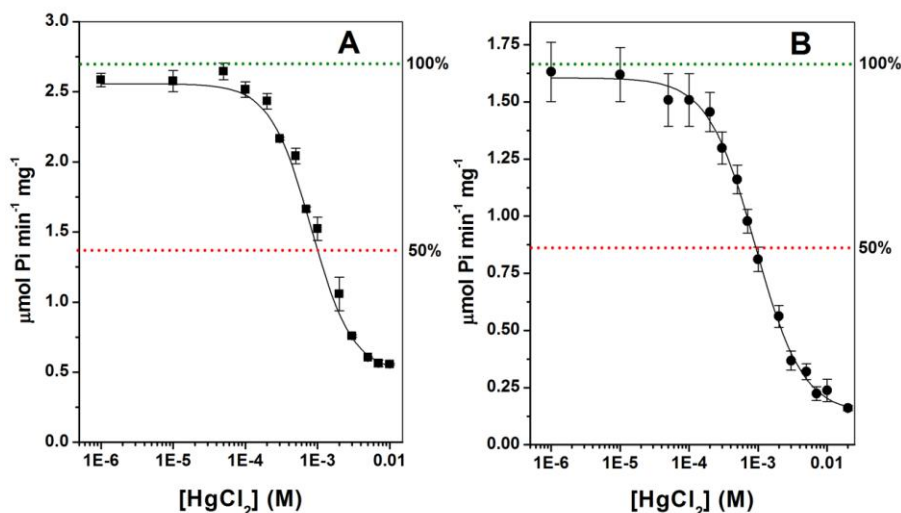


Slika 3.17 Uticaj vremena preinkubacije uzorka sa jonima Cd^{2+} na ATPaznu (A) i ADPaznu (B) aktivnost u ćelijskim membranama uterusu pacova. Kontrolna aktivnost obeležena sa 100% iznosila je $2.691 \pm 0.085 \mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ATP i $1.829 \pm 0.171 \mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ADP. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti $\pm se$, $n=3$.

Sa slike 3.17 A uočava se smanjenje od oko 7% ATPazne aktivnosti u prisustvu 5×10^{-4} M kadmijum-hlorida uočava se tokom prvih 5 min preinkubacije, dok je ukupna promena aktivnosti $\sim 12\%$ u merenom vremenskom intervalu (1-40 min). Hidroliza ADP takođe se smanjuje 7% nakon 5 min preinkubacije, a zatim se aktivnost značajno ne menja u intervalu od 5 do 30 min. Ukupno smanjenje ADPazne aktivnosti u merenom vremenskom intervalu 1-40 min je 17% (slika 3.17 B). Kako je obrazac smanjenja aktivnosti E-NTPDaza u zavisnosti od vremena preinkubacije uzorka i jona kadmijuma sličan za oba supstrata, a aktivnost se ne menja značajno tokom vremena preinkubacije 5-30 min, u narednim eksperimentima vreme preinkubacije uzorka sa jonima kadmijuma bilo je 15 min.

3.4.2 Uticaj jona žive na aktivnost E-NTPDaza

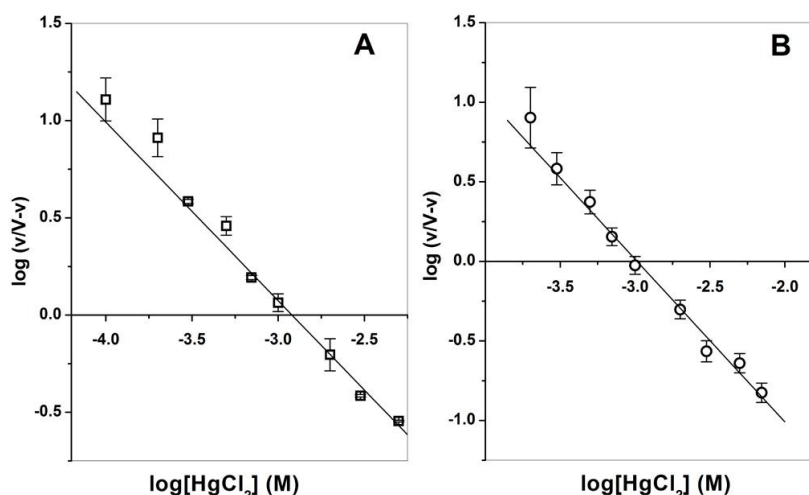
Aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova u prisustvu rastućih koncentracija živa(II)-hlorida (10^{-6} - 2×10^{-2} M) prikazana je na slici 3.18.



Slika 3.18 Krive inhibicije ATPazne (A) i ADPazne (B) aktivnosti u ćelijskim membranama uterusa pacova u prisustvu rastućih koncentracija HgCl_2 . Kontrolna aktivnost obeležena sa 100%, iznosila je 2.723 ± 0.091 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ za hidrolizu ATP, odnosno 1.671 ± 0.129 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ za hidrolizu ADP. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm se, $n=3$.

Sa slike 3.18 A vidi se da su krive inhibicije za oba substrata sigmoidalne. Inhibicija ATPazne aktivnosti je oko 10% u prisustvu koncentracija živa(II)-hlorida do 1×10^{-4} M. Daljim povećanjem koncentracije živa(II)-hlorida dolazi do naglog pada aktivnosti enzima, 50% inhibicije ATPazne aktivnosti postiže se pri koncentraciji živinih jona od 8.1×10^{-4} M, dok je maksimalna inhibicija od ~80% postignuta pri koncentraciji od 1×10^{-2} M. Na inhibicionoj krivi za ADPaznu aktivnost (slici 3.18 B), inhibicija do 10% takođe se postiže koncentracijama živa(II)-hlorida manjim od 1×10^{-4} M. Hidroliza ADP smanjena je za 50% pri koncentraciji od 9.1×10^{-4} M HgCl_2 , a maksimalna inhibicija enzimske aktivnosti od 90% nastupa u prisustvu 2×10^{-2} M živa(II)-hlorida.

Hill-ovom linearizacijom opisanih inhibicionih krivi izračunate su IC_{50} vrednosti i Hill-ovi koeficijenti za hidrolizu ATP i ADP u prisustvu rastućih koncentracija živa(II)-hlorida (slika 3.19).



Slika 3.19 Hill-ova linearizacija inhibicionih krivi (slika 3.18) za ATPaznu (A) i ADPaznu (B) aktivnost u ćelijskim membranama uterusu pacova u prisustvu rastućih koncentracija HgCl_2 . Rezultati su obrađeni kao što je opisano u odeljku 6.7.3.1 i prikazani su kao srednje vrednosti $\pm se$, $n=3$.

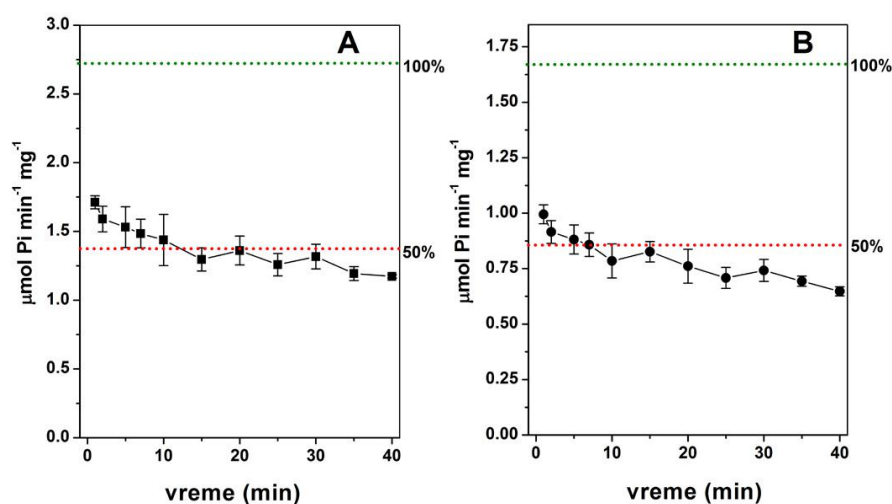
Vrednosti IC_{50} dobijene iz inhibicionih krivi (slika 3.18), iznosile su 0.82 ± 0.02 mM za hidrolizu ATP i 0.91 ± 0.06 mM za hidrolizu ADP i bile su nešto niže u odnosu na IC_{50} vrednosti izračunate Hill-ovom linearizacijom istih eksperimentalnih podataka (slika 3.19): 1.20 ± 0.01 mM za ATPaznu aktivnost, odnosno 1.03 ± 0.02 mM za ADPaznu aktivnost (tabela 3.3). Za ATPaznu aktivnost Hill-ov koeficijent je manji od 1 ($n_H = 0.92 \pm 0.01$), što govori o blagoj negativnoj kooperativnosti pri vezivanju jona žive(II) za enzim. Vrednost Hill-ovog koeficijent za ADPaznu aktivnost je približno jedan ($n_H = 1.02 \pm 0.05$), što ukazuje na jedno mesto vezivanja, odnosno na nepostojanju kooperativnosti ukoliko postoji više mesta vezivanja. Svi dobijeni parametri inhibicije prikazani su u tabeli 3.3.

Tabela 3.4 Parametri inhibicije ATPazne i ADPazne aktivnosti u ćelijskim membranama uterusu pacova u prisustvu HgCl_2 izračunati iz inhibicione krive (slika 3.18) i Hill-ove linearizacije (slika 3.19).

	IC_{50} (mM)		% od I_{\max}	n_H
	Iz krive	Iz Hill-ove linearizacije		
ATP	0.82 ± 0.02	1.20 ± 0.01	80% na 1×10^{-2}	0.92 ± 0.01
ADP	0.91 ± 0.06	1.03 ± 0.02	90% na 2×10^{-2}	1.02 ± 0.05

IC_{50} vrednosti su date kao srednja vrednost $\pm se$ ($n=3$).

Kako bi ispitili da li je vezivanje jona žive(II) za E-NTPDaze reverzibilno, enzimaska aktivnost je merena u zavisnosti od vremena preinkubacije uzorka i jona Hg^{2+} . Koncentracija HgCl_2 (1×10^{-3} M) dodata u standardnu inkubacionu smešu približno odgovara IC_{50} vrednostima za hidrolizu ATP i ADP (tabela 3.3). Na slici 3.20 prikazana je hidroliza ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusu pacova u zavisnosti od vremena preinkubacije uzorka sa jonima žive(II) pre početka enzimske reakcije.



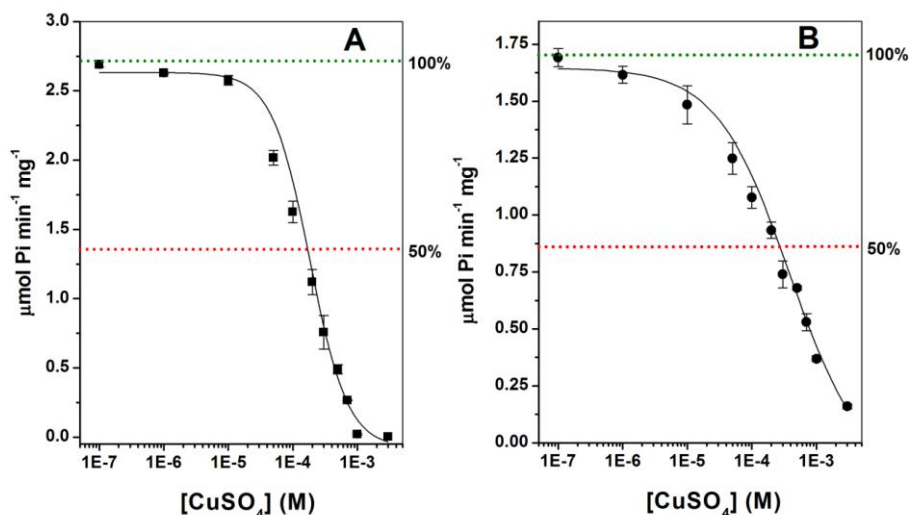
Slika 3.20 Uticaj vremena preinkubacije uzorka sa jonima Hg^{2+} (1×10^{-3} M) na ATPaznu (A) i ADPaznu (B) aktivnost u ćelijskim membranama uterusu pacova. Kontrolna aktivnost obeležena sa 100% iznosila je 2.723 ± 0.091 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ATP i 1.671 ± 0.129 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ADP. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm se, n=3.

Aktivnost E-NTPDaza opada tokom prvih 10 min, a zatim u intervalu od 10-30 min se ne menja značajno i iznosi ~48% za hidrolizu ATP i ~45% za hidrolizu ADP (slika 3.20). Nakon 30 min preinkubacije uzorka sa jonima žive(II), aktivnost E-NTPDaza nastavlja da se smanjuje. Ukupna promena aktivnosti u merenom vremenskom intervalu preinkubacije (1-40 min) za oba supstrata je oko 20%.

Kako je obrazac smanjenja aktivnosti E-NTPDaza u zavisnosti od vremena preinkubacije sličan za oba supstrata a aktivnost se ne menja statistički značajno u intervalu preinkubacije 10-30 min, u narednim eksperimentima korišćeno je vreme preinkubacije od 15 min.

3.4.3 Uticaj jona bakra na aktivnost E-NTPDaza

Na slici 3.21 prikazan je uticaj bakar(II)-sulfata (10^{-7} - 5×10^{-3} M) na hidrolizu ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova.

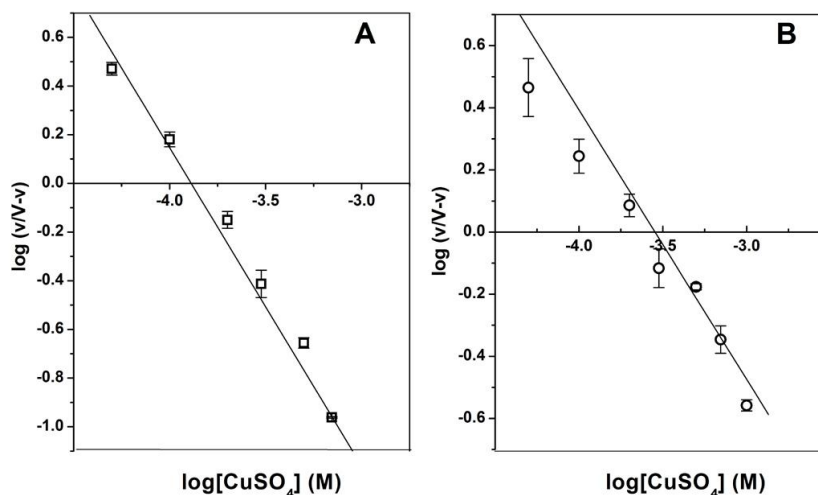


Slika 3.21 Inhibicione krive ATPazne (A) i ADPazne (B) aktivnosti u ćelijskim membranama uterusa pacova u prisustvu rastućih koncentracija CuSO_4 . Kontrolna aktivnost, obeležena sa 100% iznosila je $2.725 \pm 0.102 \mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ATP, odnosno $1.701 \pm 0.157 \mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ADP. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm se, $n=3$.

Obe inhibicione krive imaju sigmoidalan oblik, a koncentracije bakar(II)-sulfata veće od 1×10^{-5} M dovode do koncentraciono zavisne inhibicije. Sa slike 3.21 A vidi se da je ATPazna aktivnost smanjena za 50% u prisustvu 1.83×10^{-4} M bakar(II)-sulfata, a da se potpuna inhibicija postiže pri koncentraciji od oko 1×10^{-3} M jona Cu^{2+} . ADPazna aktivnost je inhibirana 50% pri koncentraciji od 3.80×10^{-4} M CuSO_4 , a maksimalna inhibicija od 90% postiže se u prisustvu 3×10^{-3} M CuSO_4 (slika 3.21 B).

Na slici 3.22 prikazana je Hill-ova linearizacija krivi inhibicije (slika 3.21) za hidrolizu oba supstrata. IC_{50} vrednosti su određene sa inhibicionih krivi (slika 3.21) i Hill-ovom linearizacijom (slika 3.22). Vrednosti dobijene iz inhibicionih krivi, bile su 0.18 ± 0.01 mM za ATPaznu aktivnost, odnosno 0.38 ± 0.03 mM za ADPaznu aktivnost. Izračunate vrednosti, dobijene Hill-ovom linearizacijom inhibicionih krivi, iznosile su 0.13 ± 0.02 mM za hidrolizu ATP i 0.28 ± 0.01 mM za hidrolizu ADP.

Prema tome, IC_{50} vrednosti dobijene iz sigmoidalnog fitovanja eksperimentalnih podataka bile su nešto više u odnosu na IC_{50} vrednosti izračunate Hill-ovom linearizacijom.



Slika 3.22 Hill-ova linearizacija inhibicionih krivi (slika 3.21) za ATPaznu (A) i ADPaznu (B) aktivnost u ćelijskim membranama uterusu pacova u prisustvu rastućih koncentracija $CuSO_4$. Rezultati su obrađeni kao što je opisano u odeljku 6.7.3.1 i prikazani kao srednje vrednosti $\pm se$, $n=3$.

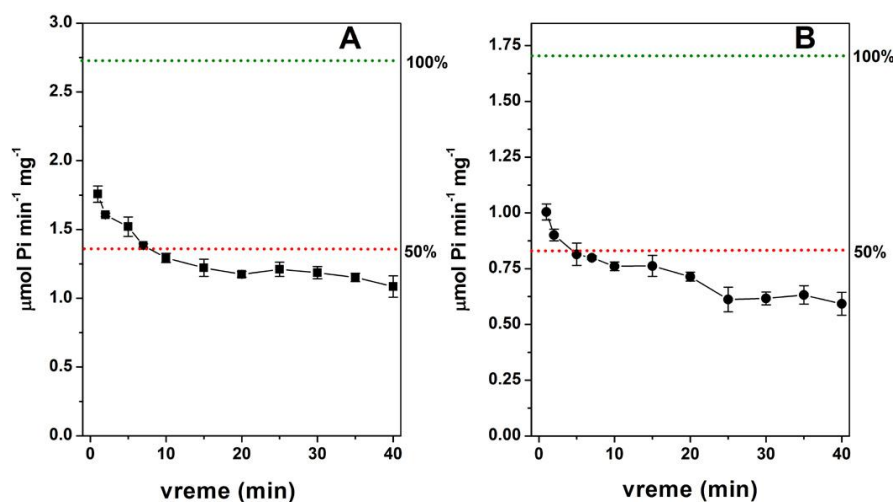
Za ATPaznu aktivnost, Hill-ov koeficijent je veći od jedan ($n_H=1.31\pm 0.02$), što govori o pozitivnoj kooperativnosti pri vezivanju jona bakra za enzim. Nasuprot tome, vrednost Hill-ovog koeficijent za ADPaznu aktivnost je manja od jedan ($n_H=0.87\pm 0.04$), što ukazuje na blagu negativnu kooperativnosti pri vezivanju jona bakra za E-NTPDaze. U tabeli 3.5 prikazani su svi parametri inhibicije E-NTPDaza u prisustvu jona bakra.

Tabela 3.5 Parametri inhibicije ATPazne i ADPazne aktivnosti u ćelijskim membranama uterusu pacova u prisustvu $CuSO_4$ izračunate iz inhibicione krive (slika 3.21) i Hill-ove linearizacije (slika 3.22)

	IC ₅₀ (mM)		% od I _{max}	n _H
	Iz krive	Iz Hill-ove linearizacije		
ATP	0.18±0.01	0.13±0.02	100% na 1×10 ⁻³	1.31±0.02
ADP	0.38±0.03	0.28±0.01	90% na 3×10 ⁻³	0.87±0.04

IC_{50} vrednosti su date kao srednja vrednost $\pm se$ ($n=3$).

Na slici 3.23 prikazana je inhibicija ATPazne i ADPazne aktivnosti u ćelijskim membranama uterusu pacova u funkciji vremena preinkubacije uzorka i jona Cu^{2+} , pri koncentracijama koje odgovaraju IC_{50} vrednostima (1×10^{-4} M CuSO_4 za hidrolizu ATP i 3×10^{-4} M CuSO_4 za hidrolizu ADP)



Slika 3.23 Uticaj vremena preinkubacije uzorka sa jonima Cu^{2+} na ATPaznu (A) i ADPaznu (B) aktivnost u ćelijskim membranama uterusu pacova. Kontrolna aktivnost obeležena sa 100% iznosila je $2.725 \pm 0.102 \mu\text{mol Pi/min/mg}$ odnosno $1.701 \pm 0.157 \mu\text{mol Pi/min/mg}$. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm se, $n=3$.

Sa slike 3.23 A se uočava da se ATPazna aktivnost u prisustvu 1×10^{-4} M CuSO_4 , smanjuje za 20% u toku prvih 10 min, da bi dostigla plato od $\sim 45\%$ aktivnosti u vremenskom intervalu od 10 do 35 min, nakon čega enzimska aktivnost ponovo počinje da lagano opada. Ukupno smanjenje ATPazne aktivnosti od 25% nađeno je nakon 40 min vremena preinkubacije uzorka sa jonima Cu^{2+} .

Na slici 3.23 B vidi se da se hidroliza ADP u prisustvu 3×10^{-4} M jona bakra, takođe smanjuje u prvih 10 minuta preinkubacije za 13%, a u preostalim 30 minuta aktivnost opada za dodatnih 10%, te je ukupna promena aktivnosti u merenom vremenskom intervalu preinkubacije (1-40 min) oko 23%.

Iako postoji značajno smanjenje aktivnosti E-NTPDaza u funkciji vremena preinkubacije uzorka sa jonima Cu^{2+} , u narednim eksperimentima uzeto je vreme preinkubacije od 15 min, s obzirom da se ono nalazi u platou inhibicije aktivnosti enzima u prisustvu oba supstrata.

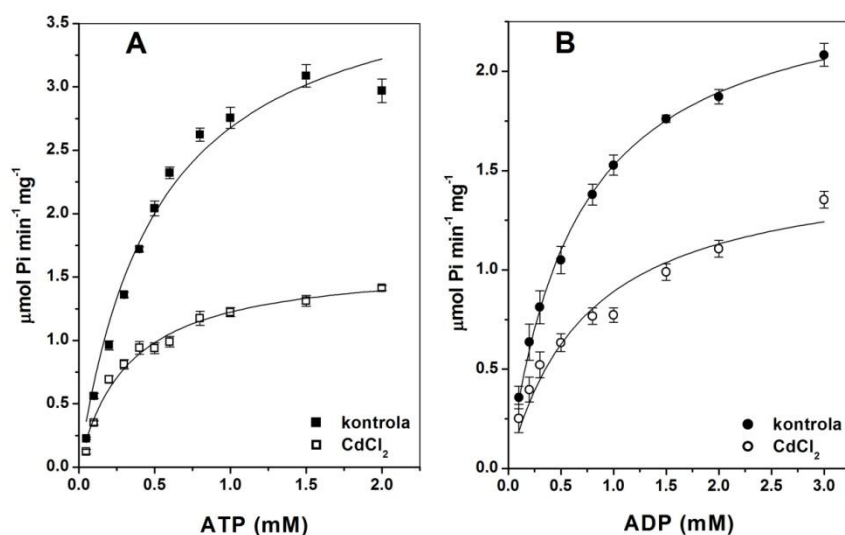
3.5 Mehanizam delovanja jona teških i prelaznih metala na aktivnost E-NTPDaza

Mehanizam inhibicije hidrolize ATP i ADP u prisustvu jona žive(II), kadmijuma i bakra ispitan je praćenjem aktivnosti enzima bez inhibitora (kontrola) i u prisustvu koncentracije jona teških metala koja dovodi do 50% inhibicije enzimske aktivnosti (IC_{50}), nakon 15 min preinkubacije (odjeljak 6.7.2). Za utvrđivanje mehanizma inhibicije korišćena je Lineweaver-Burk-ova linearizacija (odjeljak 6.7.3.1).

3.5.1 Mehanizam inhibicije E-NTPDaza pod uticajem jona kadmijuma

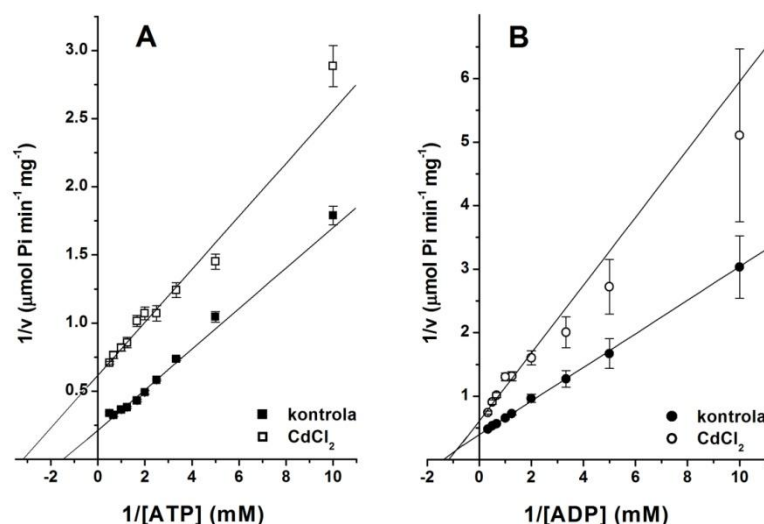
Aktivnost E-NTPDaza iz uterusu pacova merena je u standardnoj inkubacionoj smeši (odjeljak 6.7), bez (kontrola) u prisustvu $CdCl_2$ koncentracije 5×10^{-4} M (za ATPaznu aktivnost) i 7×10^{-4} M (za ADPaznu aktivnost), nakon 15 min preinkubacije uzorka sa jonima Cd^{2+} .

Promena aktivnosti enzima u funkciji koncentracije ATP ili ADP (0.1-3.0 mM), bez (kontrola) i u prisustvu jona kadmijuma, prikazana je na slici 3.24.



Slika 3.24 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od koncentracije ATP (A) i ADP (B) bez (■, ●) i u prisustvu 5×10^{-4} M (□), odnosno 7×10^{-4} M $CdCl_2$ (○). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm se, n=3.

Na slici 3.25 prikazana je Lineweaver-Burk-ova linearizacija eksperimentalnih podataka, dobijenih bez (kontrola) i u prisustvu jona kadmijuma.



Slika 3.25 Lineweaver-Burk-ova linearizacija aktivnosti E-NTPDaza (prikazane na slici 3.24) u zavisnosti od koncentracije ATP (A) i ADP (B) bez (■, ●) i u prisustvu 5×10^{-4} (□), odnosno 7×10^{-4} M CdCl_2 (○). Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti \pm se, $n=3$

Joni kadmijuma ponašaju se kao mešoviti inhibitor hidrolize ATP i ADP. U slučaju hidrolize ATP, prave dobijene linearizacijom, sa i bez inhibitora, seku se ispod x-ose (slika 3.25 A). Maksimalna brzina enzimske reakcije se u prisustvu jona kadmijuma smanjila se za faktor α' ($V_{\max}^{(\text{app})} = 1.621 \pm 0.028 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), a afinitet enzima prema ATP se, takođe, smanjio za odnos α'/α ($K_m^{(\text{app})} = 0.314 \pm 0.007 \text{ mM}$) u odnosu na kontrolu. Izračunate prividne konstante inhibicije su $K_i'^{(\text{app})} = 0.264 \pm 0.004 \text{ mM}$ i $K_i^{(\text{app})} = 1.673 \pm 0.150 \text{ mM}$.

Prave dobijene LB linearizacijom za ADPaznu aktivnost, u prisustvu i bez jona kadmijuma, seku se iznad x-ose (slika 3.25 B). Maksimalna brzina enzimske reakcije se u prisustvu jona kadmijuma smanjila se za faktor α' ($V_{\max}^{(\text{app})} = 1.637 \pm 0.073 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), a afinitet prema ADP se povećao za odnos α'/α ($K_m^{(\text{app})} = 0.874 \pm 0.023 \text{ mM}$) u odnosu na kontrolnu aktivnost. Prividne konstante inhibicije hidrolize ADP jonima kadmijuma su $K_i'^{(\text{app})} = 1.270 \pm 0.049 \text{ mM}$ i $K_i^{(\text{app})} = 0.685 \pm 0.004 \text{ mM}$.

Kinetički parametri i prividne konstante inhibicije izračunati su na osnovu MM jednačine za mešovitu inhibiciju (odjeljak 6.7.3.1, tabela 6.2) i dati u tabeli 3.6:

Tabela 3.6 Kinetički parametri hidrolize ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova u prisustvu CdCl₂ ($a=K_i^?$, $b=K_i$)

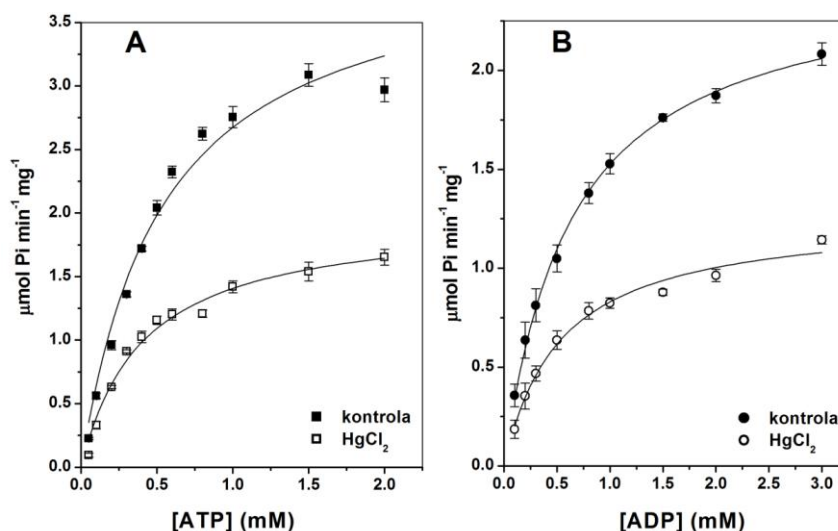
parametar	ATPazna aktivnost		ADPazna aktivnost	
	kontrola	5x10 ⁻⁴ M Cd ²⁺	kontrola	7x10 ⁻⁴ M Cd ²⁺
$V_{max}^{(app)}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	4.695±0.132	1.621±0.028	2.538±0.077	1.637±0.073
$K_m^{(app)}$ (mM)	0.700±0.006	0.314± 0.007	0.670±0.025	0.874±0.023
$K_i^{(app)}$ (mM)		0.264±0.004 ^a 1.673±0.150 ^b		1.270±0.049 ^a 0.685±0.004 ^b
Tip inhibicije	mešovita		mešovita	

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm se (n=3).

3.5.2 Mehanizam inhibicije E-NTPDaza pod uticajem jona žive

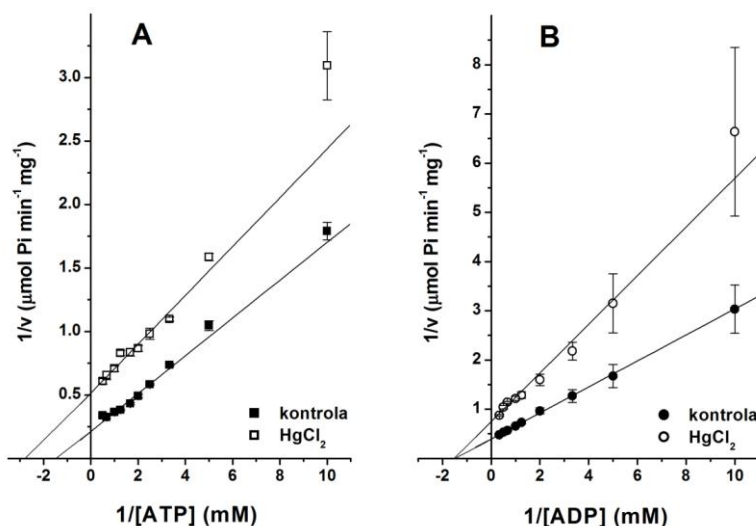
Aktivnost E-NTPDaza je praćena u standardnoj inkubacionoj smeši (odjeljak 6.7), bez (kontrola) i u prisustvu HgCl₂ koncentracije 1×10⁻³ M, nakon 15 min preinkubacije uzorka sa jonima Hg²⁺.

Promena aktivnosti enzima u funkciji koncentracije ATP ili ADP (0.1-3.0 mM), u prisustvu i bez jona Hg²⁺ (kontrola), prikazana je na slici 3.26.



Slika 3.26 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od koncentracije ATP (A) i ADP (B) bez (■, ●) i u prisustvu 1×10⁻³ M HgCl₂ (□, ○). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti specifične aktivnosti enzima \pm se, n=3

Dobijeni eksperimentalni podaci obrađeni su Lineweaver-Burk-ovom linearizacijom i rezultati su prikazani na slici 3.27.



Slika 3.27 Lineweaver-Burk-ova linearizacija aktivnosti E-NTPDaza (prikazane na slici 3.26) u zavisnosti od koncentracije ATP (A) i ADP (B) bez (■, ●) i u prisustvu 1×10^{-3} M HgCl_2 (□, ○). Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti \pm se, $n=3$

Prave dobijene Lineweaver-Burk-ovom linearizacijom za hidrolizu ATP (slika 3.27 A), bez i u prisustvu jona žive(II), seku se ispod x-ose, menjanjući vrednosti i $K_m^{(app)}$ i $V_{max}^{(app)}$, što ukazuje na mešovitu inhibiciju. U tom slučaju, joni žive(II) inhibiraju ATPaznu aktivnost vezivanjem i za slobodni enzim i za kompleks enzim-supstrat pri čemu konstante disocijacije (K_i i K_i') ova dva kompleksa nisu iste. Na osnovu MM jednačine za mešovitu inhibiciju (odeljak 6.7.3.1, tabela 6.2), izračunati su kinetički parametri i prividne konstante inhibicije (tabela 3.7).

Tabela 3.7 Kinetički parametri hidrolize ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova u prisustvu HgCl_2 ($a=K_i'$, $b=K_i$)

parametar	ATPazna aktivnost		ADPazna aktivnost	
	kontrola	1×10^{-3} M Hg^{2+}	kontrola	1×10^{-3} M Hg^{2+}
$V_{max}^{(app)}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	4.695 ± 0.132	1.942 ± 0.056	2.538 ± 0.077	1.344 ± 0.038
$K_m^{(app)}$ (mM)	0.700 ± 0.006	0.373 ± 0.001	0.670 ± 0.025	0.665 ± 0.025
$K_i^{(app)}$ (mM)		0.705 ± 0.001^a 3.477 ± 0.170^b		1.126 ± 0.005^b
Tip inhibicije		mešovita		nekompetitivna

Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti \pm se ($n=3$).

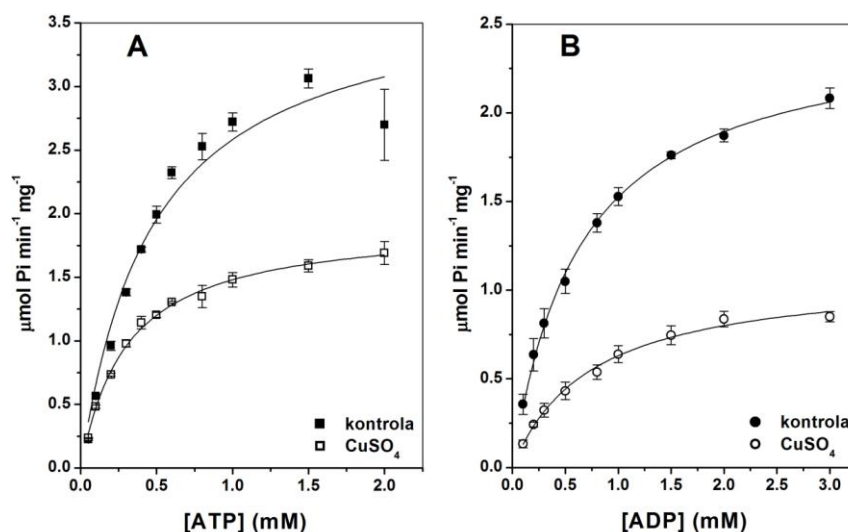
Maksimalna brzina enzimske reakcije u prisustvu jona žive(II) smanjila se za faktor α' u odnosu na kontrolu i iznosila je $V_{\max}^{(app)}=1.942\pm 0.056 \mu\text{mol Pi/min/mg}$. Afinitet enzima prema ATP se, takođe, smanjio ($K_m^{(app)}=0.373\pm 0.001 \text{ mM}$) za odnos α'/α . Izračunate prividne konstante inhibicije su $K_i^{(app)}=0.705\pm 0.001 \text{ mM}$ i $K_i^{(app)}=3.477\pm 0.170 \text{ mM}$ (tabela 3.6).

U prisustvu ADP kao supstrata, prave dobijene Lineweaver-Burk-ova linearizacijom seku se na x-osi (slika 3.27 B). Joni žive(II) se ponašaju kao nekompetitivni inhibitor i ne menjaju afinitet E-NTPDaza prema ADP ($K_m^{(app)}=0.665\pm 0.025 \text{ mM}$) već smanjuju maksimalnu brzinu enzimske reakcije za faktor α ($V_{\max}^{(app)}=1.344\pm 0.038 \mu\text{mol Pi/min/mg}$). Kinetički parametri i prividna konstanta inhibicije ($K_i^{(app)}=1.126\pm 0.005 \text{ mM}$) izračunati su na osnovu MM jednačine za nekompetitivnu inhibiciju (odjeljak 6.7.3.1, tabela 6.2), i prikazani u tabeli 3.6.

3.5.3 Mehanizam inhibicije E-NTPDaza pod uticajem bakra

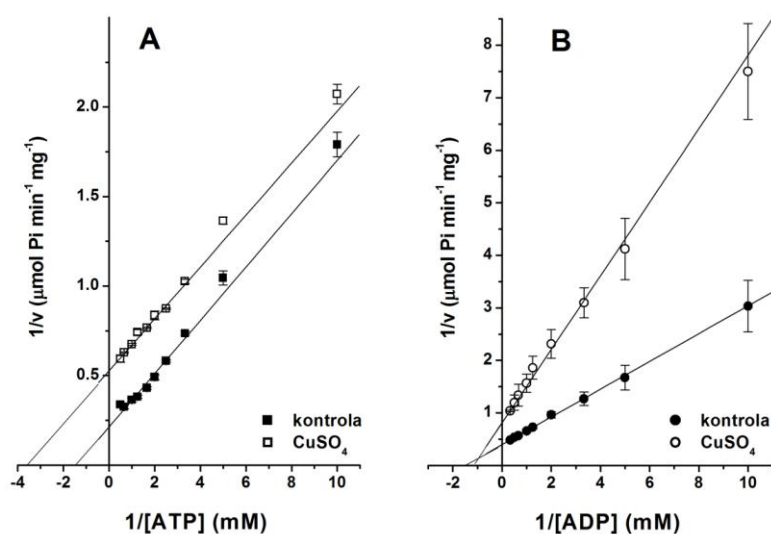
Aktivnost E-NTPDaza je ispitivana u standardnoj inkubacionoj smeši (odjeljak 6.7), bez (kontrola) i u prisustvu $1\times 10^{-4} \text{ M CuSO}_4$ (za ATPaznu aktivnost), odnosno $3\times 10^{-4} \text{ M CuSO}_4$ (za ADPaznu aktivnost), nakon 15 minuta preinkubacije.

Uticaj jona Cu^{2+} na aktivnost enzima u prisustvu rastućih koncentracija ATP ili ADP prikazan je na slici 3.28.



Slika 3.28 Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od koncentracije ATP (A) i ADP (B) bez (■, ●) i u prisustvu $1\times 10^{-4} \text{ M}$ (□), odnosno $3\times 10^{-4} \text{ M CuSO}_4$ (○). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm se, n=3

Na slici 3.29 prikazana je Lineweaver-Burk-ova linearizacija eksperimentalnih podataka, dobijenih bez (kontrola) i u prisustvu jona kadmijuma.



Slika 3.29 Lineweaver-Burk-ova linearizacija aktivnosti E-NTPDaza (prikazane na slici 4.29) u zavisnosti od koncentracije ATP (A) i ADP (B) bez (■, ●) i u prisustvu 1×10^{-4} M (□), odnosno 3×10^{-4} M CuSO_4 (○). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm se, $n=3$

Sa slike 3.29 A vidi se da su dobijene prave paralelne što znači da se joni bakra ponašaju kao akompetitivni inhibitor ATPazne aktivnosti. U ovom slučaju se joni bakra ne vezuju za slobodan enzim već samo za kompleks enzim-supstrat, pri čemu se afinitet enzima prema ATP ($K_m^{(\text{app})} = 0.276 \pm 0.002$ mM) i maksimalna brzina reakcije ($V_{\text{max}}^{(\text{app})} = 1.901 \pm 0.014$ $\mu\text{mol Pi/min/mg}$) smanjuju za faktor α' , dok je odnos $K_m^{(\text{app})}/V_{\text{max}}^{(\text{app})}$ ostao nepromenjen u odnosu na kontrolnu aktivnost. Kinetički parametri i konstante inhibicije izračunate su iz MM jednačine za akompetitivnu inhibiciju (odeljak 6.7.3.1, tabela 6.2).

Na slici 3.29 B se vidi da se prave dobijene LB linearizacijom seku iznad x-ose, što znači da se joni bakra ponašaju kao mešoviti inhibitor ADPazne aktivnosti, vezujući se i za slobodan enzim i za kompleks enzim-supstrat. Kinetički parametri izračunati su iz MM jednačine za mešovitu inhibiciju (odeljak 6.7.3.1, tabela 6.2). Afinitet E-NTPDaza prema ADP se u prisustvu jona bakra povećao za odnos α'/α ($K_m^{(\text{app})} = 0.866 \pm 0.04$ mM), dok se maksimalna brzina enzimske reakcije smanjila za faktor α' ($V_{\text{max}}^{(\text{app})} = 1.238 \pm 0.037$ $\mu\text{mol Pi/min/mg}$) u odnosu na kontrolu.

Kinetički parametri i konstante inhibicije dobijeni Lineweaver-Burk-ovom linearizacijom (slika 3.29) dati su u tabeli 3.8.

Tabela 3.8 Kinetički parametri hidrolize ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova u prisustvu CuSO_4 ($a=K_i'$, $b=K_i$)

parametar	ATPazna aktivnost		ADPazna aktivnost	
	kontrola	$1 \times 10^{-4} \text{ M Cu}^{2+}$	kontrola	$3 \times 10^{-4} \text{ M Cu}^{2+}$
$V_{\max}^{(\text{app})}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	4.695 \pm 0.132	1.901 \pm 0.014	2.538 \pm 0.077	1.238 \pm 0.037
$K_m^{(\text{app})}$ (mM)	0.700 \pm 0.006	0.276 \pm 0.002	0.670 \pm 0.025	0.866 \pm 0.04
$K_i^{(\text{app})}$ (mM)		0.068 \pm 0.004 ^a		0.285 \pm 0.001 ^a 0,182 \pm 0.002 ^b
Tip inhibicije		akompetitivna		mešovita

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm se (n=3).

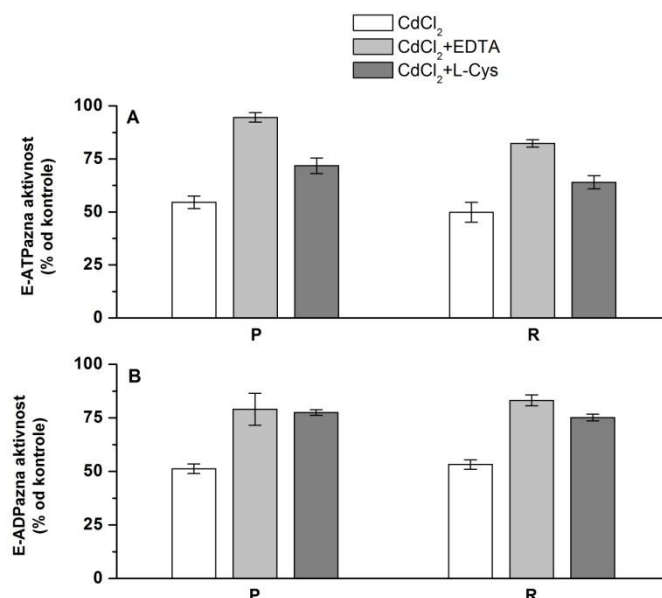
3.6 Uticaj EDTA i L-Cys na inhibiciju E-NTPDaza jonima teških i prelaznih metala

U cilju određivanja zaštitnog efekat EDTA i L-cisteina na enzimsku aktivnost, merena je hidroliza ATP i ADP, pre i nakon preinkubacije uzorka sa jonima teških i prelaznih metala. Sprečavanje inhibicije (*engl. prevention*) i obnavljanje enzimске aktivnosti (*engl. recovery*) ispitano je u standardnoj inkubacionoj smeši (poglavlje 6.7) koja je sadržala 1 mM EDTA ili 1 mM L-Cys i koncentraciju soli živa(II)-hlorida, kadmijum-hlorida ili bakar(II)-sulfata koje dovodi do ~50% inhibicije (IC_{50}) E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova.

Efekat sprečavanja inhibicije enzimске aktivnosti je meren tako što je EDTA ili L-Cys dodat u inkubacionu smešu pre inkubacije uzorka sa jonima teških metala. Obnavljanje enzimске aktivnosti praćeno je dodavanjem EDTA ili L-Cys nakon 15 minuta preinkubacije uzorka sa jonima teških metala (odjeljak 6.7.2).

3.6.1 Uticaj EDTA i L-Cys na inhibiciju E-NTPDaza jonima kadmijuma

Na slici 3.30 prikazani su rezultati uticaja 1 mM EDTA i 1 mM L-Cys na hidrolizu ATP i ADP u prisustvu 5×10^{-4} M, odnosno 7×10^{-4} M kadmijum-hlorida.



Slika 3.30 Uticaj 1 mM EDTA i 1 mM L-Cys na sprečavanje inhibicije (**P**) i obnavljanje (**R**) aktivnosti E-NTPDazna iz uterusa pacova, u prisustvu 5×10^{-4} M, odnosno 7×10^{-4} M CdCl_2 . Rezultati su prikazani kao procenat od kontrolne aktivnosti (srednje vrednosti \pm se, n=3), koja je iznosila 2.618 ± 0.087 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ATP (**A**) i 1.591 ± 0.034 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ADP (**B**).

Izmerena ATPazna aktivnost u prisustvu 1 mM EDTA (slika 3.30, A) iznosila je $94.6 \pm 2.3\%$ u odnosu na kontrolnu. Dodavanjem 1 mM EDTA nakon preinkubacije uzorka sa jonima kadmijuma, obnovljeno je $82.3 \pm 1.8\%$ ATPazne aktivnosti u odnosu na kontrolnu, što može da znači da je izvesna količina jona kadmijuma ostala čvrsto vezana za enzim. ATPazna aktivnost u prisustvu 1 mM L-Cys u inkubacionoj smeši iznosila je $71.8 \pm 3.6\%$ u odnosu na kontrolnu. Obnovljena aktivnost nakon dodavanja L-Cys bila je $64.0 \pm 3.1\%$ u odnosu na kontrolnu. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključujemo da je EDTA efikasniji od L-Cys u sprečavanju inhibicije i obnavljanju ATPazne aktivnosti enzima u prisustvu 0.5 mM kadmijum-hlorida.

Sa slike 3.30 B vidi se da je prisustvo 1 mM EDTA u inkubacionoj smeši očuvalo $79.1 \pm 7.5\%$ ADPazne aktivnosti u odnosu na kontrolu, dok je dodavanje 1 mM EDTA nakon 15 min preinkubacije uzorka sa jonima kadmijuma obnovilo $83.2 \pm 2.6\%$ ADPazne aktivnost u odnosu na kontrolu. Izmerena ADPazna aktivnost,

kada je 1 mM L-Cys dodat u inkubacionu smeši pre dodavanja uzorka, iznosila je $77.5 \pm 1.3\%$ u odnosu na kontrolnu. Dodavanje 1 mM L-Cys nakon 15 min preinkubacije uzorka sa jonima kadmijuma, obnovilo je $75.2 \pm 1.6\%$ ADPazne aktivnost u odnosu na kontrolu. Dobijeni rezultati sugerišu da je 1 mM EDTA efikasnije sprečio inhibicije i obnovio ADPaznu aktivnost enzima u odnosu na 1 mM L-Cys, u prisustvu 0.7 mM kadmijum-hlorida.

U tabeli 3.9 date su koncentracije slobodnih (nevezanih) jona kadmijuma kao i kompleksa koji nastaju između dvovalentnih jona (Mg^{2+} i Cd^{2+}), supstrata (ATP, ADP), EDTA i L-Cys, izračunate upotrebom programa JONCONC, a na osnovu konstanti stabilnosti nastajanja kompleksa (odjeljak 6.7.3.1, tabela 6.3).

Tabela 3.9 Izračunate koncentracije (mol/dm^3) slobodnih jona kadmijuma (Cd^{2+}) i kompleksa u prisustvu Mg^{2+} (1mM), Cd^{2+} (0.5 mM za ATPaznu odnosno 0.7 mM za ADPaznu aktivnost), ATP (1 mM), ADP (1 mM), EDTA (1 mM) ili L-Cys (1 mM).

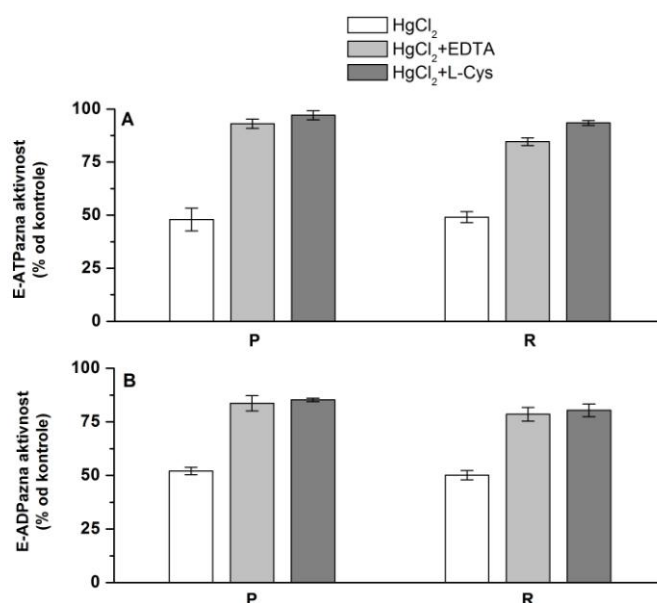
	ATP (1mM)			ADP (1 mM)		
	+CdCl ₂	Cd+EDTA	Cd+L-Cys	+CdCl ₂	Cd+EDTA	Cd+L-Cys
Cd²⁺	2.2×10^{-4}	5.2×10^{-13}	8.6×10^{-11}	3.3×10^{-4}	1.6×10^{-11}	5.6×10^{-10}
CdATP²⁻	2.8×10^{-4}	6.2×10^{-12}	5.6×10^{-8}			
CdADP⁻				3.7×10^{-4}	3.9×10^{-11}	1.3×10^{-9}
CdEDTA²⁻		4.9×10^{-4}			6.9×10^{-4}	
CdCys			4.9×10^{-4}			6.9×10^{-4}
MgATP²⁻	6.6×10^{-4}	4.7×10^{-4}	7.2×10^{-4}			
MgADP⁻				3.2×10^{-4}	3.5×10^{-4}	3.8×10^{-4}
MgEDTA²⁻		4.9×10^{-4}			3×10^{-4}	
MgCys			2.1×10^{-4}			2.4×10^{-4}

Joni kadmijuma mogu da grade komplekse sa ATP i ADP (Pecoraro et al., 1984), te inhibicija aktivnosti E-NTPDaza može biti posledica stvaranje neaktivnih kompleksa $CdATP^{2-}$ i $CdADP^{-}$, kao i vezivanja slobodnih jona kadmijuma za funkcionalne grupe enzima. Prisustvo EDTA ili L-Cys značajno smanjuje koncentraciju slobodnih jona kadmijuma i kompleksa kadmijuma sa supstratima. Iz tabele 3.9 vidi se da dodavanjem 1 mM EDTA ili 1 mM L-Cys u inkubacionu smešu koja sadrži 0.5 mM odnosno 0.7 mM kadmijum-hlorida, praktično celokupna količina jona kadmijuma nalazi se u kompleksu $CdEDTA^{2-}$ odnosno $CdCys$.

Preostala količina EDTA i L-Cys može da gradi komplekse i sa jonima magnezijumom i tako utiče na koncentraciju supstrata MgATP^{2-} , odnosno MgADP^+ .

3.6.2 Uticaj EDTA i L-Cys na inhibiciju E-NTPDaza jonima žive

Na slici 3.31 prikazani su rezultati uticaja 1 mM EDTA i 1 mM L-Cys na hidrolizu ATP i ADP u prisustvu 1 mM živa(II)-hlorida.



Slika 3.31 Uticaj 1 mM EDTA i 1 mM L-Cys na sprečavanje inhibicije (**P**) i obnavljanje (**R**) aktivnosti E-NTPDaza iz uterusu pacova, u prisustvu 1×10^{-3} M HgCl_2 . Rezultati su prikazani kao procenat od kontrolne aktivnosti (srednje vrednosti \pm se, n=3), koja je iznosila 2.618 ± 0.087 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ATP (**A**) i 1.591 ± 0.034 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ za hidrolizu ADP (**B**).

Izmerena ATPazna aktivnost u prisustvu 1 mM EDTA (slika 3.31, A) iznosila je $93.1 \pm 2.2\%$ u odnosu na kontrolnu - 100% (bez prisustva jona žive). Dodavanjem 1 mM EDTA nakon preinkubacije uzorka sa jonima žive(II), zabeleženo je obnavljanje aktivnosti od $84.6 \pm 1.8\%$ u odnosu na kontrolnu, što ukazuje da je EDTA nije u potpunosti uklonila jone Hg^{2+} i/ili da je izvesna količina ovih jona ostala čvrsto vezana za enzim. Dodatak 1 mM L-Cys u inkubacionu smešu je, takođe, sprečio inhibiciju jonima Hg^{2+} a izmerena ATPazna aktivnost iznosila je $97.1 \pm 2.1\%$ u odnosu na kontrolnu (100%). L-Cys je skoro podjednako dobro uticao na obnavljanje ATPazne aktivnost nakon 15 min preinkubacije uzorka sa jonima žive(II), a zabeležena aktivnost enzima bila je $93.5 \pm 1.2\%$ u odnosu na kontrolnu.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je L-Cys bio efikasniji od EDTA u sprečavanju inhibicije i obnavljanju ATPazne aktivnosti enzima u prisustvu 1 mM živa(II)-hlorida.

U slučaju ADPazne aktivnosti (slika 3.31, B), EDTA i L-Cys su bili neznatno manje efikasni u sprečavanju inhibicije i obnavljanju aktivnosti enzima. Izmerena ADPazna aktivnost u prisustvu 1 mM EDTA iznosila je $83.7 \pm 3.6\%$, dok je obnovljena aktivnost nakon 15 min preinkubacije uzorka sa jonima žive(II) bila $78.6 \pm 3.2\%$ u odnosu na kontrolnu. Izmerena ADPazna aktivnost, kada je 1 mM L-Cys dodat u inkubacionu smeši pre dodavanja uzorka, iznosila je $85.3 \pm 0.8\%$ u odnosu na kontrolnu. Dodavanjem 1 mM L-Cys nakon 15 min preinkubacije uzorka sa jonima žive(II), obnovljeno je $80.4 \pm 3.0\%$ ADPazne aktivnosti u odnosu na kontrolnu. Na osnovu dobijenih rezultata, može se reći da su EDTA i L-Cys bili podjednako efikasni u sprečavanju inhibicije i obnavljanju ADPazne aktivnosti enzima u prisustvu 1 mM živa(II)-hlorida.

U tabeli 3.10 date su koncentracije slobodnih (nevezanih) jona Hg^{2+} kao i kompleksa koji nastaju između dvovalentnih jona (Mg^{2+} i Hg^{2+}), supstrata (ATP i ADP), EDTA i L-Cys, izračunate upotrebom programa JONCONC, a na osnovu konstanti stabilnosti nastajanja kompleksa (odeljak 6.7.3.1, tabela 6.3).

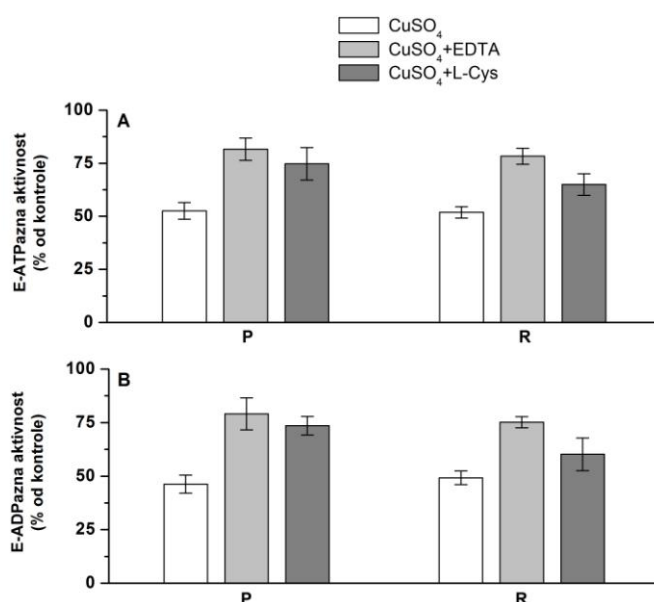
Tabela 3.10 Izračunate koncentracije (mol/dm^3) slobodnih jona žive (Hg^{2+}) i kompleksa u prisustvu Mg^{2+} (1mM), Hg^{2+} (1 mM za ATPaznu odnosno ADPaznu aktivnost), ATP (1 mM), ADP (1 mM), EDTA (1 mM) ili L-Cys (1 mM).

	ATP (1 mM)			ADP (1 mM)		
	+HgCl ₂	Hg+EDTA	Hg+L-Cys	+HgCl ₂	Hg+EDTA	Hg+L-Cys
Hg²⁺	1×10^{-3}	6.1×10^{-15}	4.8×10^{-12}	1×10^{-3}	4.1×10^{-15}	2.5×10^{-12}
HgEDTA²⁻		$>9.9 \times 10^{-4}$			9.9×10^{-4}	
HgCys			9.9×10^{-4}			9.9×10^{-4}
MgATP²⁻	8.4×10^{-4}	8.4×10^{-4}	8.4×10^{-4}			
MgADP⁻				4.6×10^{-4}	4.6×10^{-4}	4.6×10^{-4}
MgEDTA²⁻		1×10^{-5}			1×10^{-5}	
MgCys			6.1×10^{-6}			8.4×10^{-6}

Joni žive(II) ne grade komplekse sa ATP i ADP, te je inhibicija aktivnosti E-NTPDaza posledica vezivanja jona žive(II) za funkcionalne grupe enzima. Dodavanjem 1 mM EDTA ili 1 mM L-Cys u inkubacionu smešu koja sadrži 1×10^{-3} M živa(II)-hlorida, praktično celokupna količina jona Hg^{2+} nalazi se u kompleksu $HgEDTA^{2-}$, odnosno $HgCys$. Prisustvo EDTA ili L-Cys nije uticalo na koncentraciju kompleksa $MgATP^{2-}$ i $MgADP^-$ koji predstavljaju prave supstrate za aktivnost E-NTPDaza u uterusu pacova.

3.6.3 Uticaj EDTA i L-Cys na inhibiciju E-NTPDaza jonima bakra

Na slici 3.32 prikazan je uticaj 1 mM EDTA i 1 mM L-Cys na hidrolizu ATP i ADP u prisustvu 1×10^{-4} M, odnosno 1×10^{-4} M bakar(II)-sulfata.



Slika 3.32 Uticaj 1 mM EDTA i 1 mM L-Cys na sprečavanje inhibicije (P) i obnavljanje (R) aktivnosti E-NTPDazna iz uterusa pacova, u prisustvu 1×10^{-4} M, odnosno 3×10^{-4} M $CuSO_4$. Rezultati su prikazani kao procenat od kontrolne aktivnosti (srednje vrednosti \pm se, n=3), koja je iznosila 2.618 ± 0.087 μ mol Pi/min/mg za hidrolizu ATP (A) i 1.591 ± 0.034 μ mol Pi/min/mg za hidrolizu ADP (B).

Izmerena ATPazna aktivnost kada je 1 mM EDTA dodat u inkubacionu smešu pre uzorka iznosila je $81.6 \pm 5.3\%$ u odnosu na kontrolnu (slika 3.32, A). Dodavanjem 1 mM EDTA nakon preinkubacije uzorka sa jonima Cu^{2+} , obnovljeno je $78.3 \pm 3.8\%$ ATPazne aktivnosti u odnosu na kontrolu. ATPazna aktivnost u prisustvu 1 mM L-Cys u inkubacionoj smeši iznosila je $74.8 \pm 7.6\%$ u odnosu na kontrolnu. Obnovljena aktivnost nakon dodavanja L-Cys bila je $65.0 \pm 5.1\%$ u odnosu na kontrolu.

Na osnovu dobijenih rezultata, zaključujemo da je EDTA efikasniji od L-Cys u sprečavanju inhibicije i obnavljanju ATPazne aktivnosti enzima u prisustvu 0.1 mM bakar(II)-sulfata.

Prisustvo 1 mM EDTA u inkubacionoj smeši očuvalo je $79.1 \pm 7.5\%$ ADPazne aktivnosti u odnosu na kontrolnu, dok je dodavanje 1 mM EDTA nakon preinkubacije uzorka sa jonima Cu^{2+} obnovilo $75.2 \pm 2.6\%$ ADPazne aktivnost u odnosu na kontrolnu (slika 3.32, B). Izmerena ADPazna aktivnost, kada je 1 mM L-Cys dodat u inkubacionu smeši pre dodavanja uzorka, iznosila je $73.5 \pm 4.3\%$ u odnosu na kontrolnu. Dodavanje 1 mM L-Cys nakon 15 min preinkubacije uzorka sa jonima bakra, obnovilo je $60.2 \pm 7.6\%$ ADPazne aktivnosti u odnosu na kontrolnu. Na osnovu dobijenih rezultata, može se reći da je EDTA efikasniji od L-Cys u sprečavanju inhibicije i obnavljanju ADPazne aktivnosti E-NTPDaza u prisustvu 0.3 mM bakar(II)-sulfata.

U tabeli 3.11 date su koncentracije slobodnih (nevezanih) jona bakra kao i kompleksa koji nastaju između dvovalentnih jona (Mg^{2+} i Cd^{2+}) i supstrata (ATP, ADP), EDTA i L-Cys, izračunate upotrebom programa JONCONC, a na osnovu konstanti stabilnosti nastajanja kompleksa (odjeljak 6.7.3.1, tabela 6.3).

Tabela 3.11 Izračunate koncentracije (mol/dm^3) slobodnih jona bakra (Cu^{2+}) kompleksa u prisustvu Mg^{2+} (1mM), Cu^{2+} (0.1 mM za ATPaznu odnosno 0.3 mM za ADPaznu aktivnost), ATP (1 mM), ADP (1 mM), EDTA (1 mM) ili L-Cys (1 mM).

	ATP (1 mM)			ADP (1 mM)		
	+CuSO ₄	Cu+EDTA	Cu+L-Cys	+CuSO ₄	Cu+EDTA	Cu+L-Cys
Cu²⁺	6.7×10^{-7}	2.7×10^{-17}	1.1×10^{-20}	1.1×10^{-6}	4.3×10^{-15}	9.1×10^{-20}
CuATP²⁻	9.9×10^{-5}	3.3×10^{-14}	5.1×10^{-18}			
CuADP⁻				3×10^{-4}	2.8×10^{-12}	5.2×10^{-17}
CuEDTA²⁻		9.9×10^{-5}			2.9×10^{-4}	
CuCys			9.9×10^{-5}			2.9×10^{-4}
MgATP²⁻	7.9×10^{-4}	9.7×10^{-5}	6.4×10^{-4}			
MgADP⁻				3.5×10^{-4}	1.7×10^{-4}	2.7×10^{-4}
MgEDTA²⁻		8.9×10^{-4}			6.9×10^{-4}	
MgCys			3.1×10^{-4}			4.9×10^{-4}

Joni bakra mogu da grade komplekse sa ATP i ADP (Sillen and Martell, 1971), te inhibicija aktivnosti E-NTPDaza može biti posledica stvaranje neaktivnih kompleksa CuATP^{2-} i CuADP^- , kao i vezivanja slobodnih jona bakra za funkcionalne grupe enzima. Dodavanjem 1 mM EDTA ili 1 mM L-Cys u inkubacionu smešu koja sadrži 0.1 mM, odnosno 0.3 mM bakar-sulfata, praktično celokupna količina jona bakra vezana je u kompleksu CuEDTA^{2-} odnosno CuCys , što značajno smanjuje koncentraciju slobodnih jona bakra i kompleksa CuATP^{2-} i CuADP^- . S obzirom da su IC_{50} vrednosti za jone bakra (odeljak 3.4.3, tabela 3.5) za red veličine manje od primenjenih koncentracija helatora, preostala količina EDTA i L-Cys može da gradi komplekse i sa jonima magnezijumom i utiče na koncentraciju supstrata MgATP^{2-} , odnosno MgADP^- .

4 DISKUSIJA

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazali su da se vanćelijska hidroliza ATP i ADP u uterusu pacova može pripisati članovima porodice E-NTPDaza. Iako u literaturi postoje podaci o visokoj aktivnosti enzima koji hidrolizuju nukleotide u uterusu pacova (Turi and Torok, 1985; Magocsi and Penniston, 1991; Valenzuela et al., 1992; Kosterin et al., 1995), ovo je prva studija u kojoj je okarakterisana hidroliza ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova i identifikovani enzimi odgovorni za ovu aktivnost.

Kako je cilj ove studije bio da se odrede optimalni uslovi za aktivnost E-NTPDaza u uterusu pacova, bilo je neophodno najpre odrediti stepen prečišćenosti preparata ispitivanjem uticaj inhibitora membranskih ATPaze i E-NTPDaza na hidrolizu ATP i ADP. Prisustvo specifičnih inhibitora mitohondrijalnih ATPaza (oligomicin i azid), alkalnih fosfataza (teofilin i levamisol) i Na^+/K^+ -ATPaze (ouabain) nije značajno uticalo na hidrolizu ATP i ADP u ćelijskim membranama uterusa pacova (tabela 3.1), što pokazuje da ovi enzimi nisu aktivni pod datim eksperimentalnim uslovima, a dobijena enzimaska aktivnost i kinetički parametri mogu se pripisati E-NTPDazama.

Natrijum-azid je dobro poznati inhibitor mitohondrijalne F_1 -ATPaze, pri mikromolarnim koncentracijama ($\text{IC}_{50} \approx 100 \mu\text{M}$) (Vigers and Ziegler, 1968). E-NTPDaze su takođe inhibirane azidom, ali pri koncentracijama u milimolarnom opsegu (2-10 mM) (Knowles, 2011). Između pojedinih članova porodice E-NTPDaza postoji različit stepen osetljivosti na inhibiciju azidom, što može biti koristan kriterijum za razlikovanje E-NTPDaze 1 i E-NTPDaze 2 u preparatima ćelijskih membrana, pogotovo zato što se ovi enzimi uglavnom zajedno eksprimirani u većini tkiva sisara. Ispitivanjem uticaja azida na prečišćene E-ATPDaze iz kokošijeg ovidukta, pokazano je da je smanjenje hidrolize ADP uvek veće u odnosu na hidrolizu ATP, a stepen inhibicije varira u zavisnosti od eksperimentalnih uslova (nukleotidnih supstrata, pH i dvovalentnih jona). Pri neutralnom pH, u prisustvu jona magnezijuma (4 mM) i koncentracijama substrata 2-5 mM, E-ATPDaza iz kokošijeg ovidukta inhibirana je milimolarnim koncentracijama azida ($>5 \text{ mM}$), dok E-ATPaza nije osetljiva na prisustvo azida (Knowles and Nagy, 1999). Poređenjem uticaja azida

na aktivnost prečišćenih E-NTPDaza iz sinaptozoma kore mozga svinje, takođe je zabeležena veća osetljivost NTPDase 1 na ovaj inhibitor u odnosu na NTPDazu 2 (Kukulski and Komoszynski, 2003). Naši rezultati su pokazali približno podjednako, uporedno smanjenje hidrolize ATP i ADP sa povećanjem koncentracije azida (tabela 3.1), što ukazuje na prisutvo E-NTPDaze 1 u uterusu pacova. Sličan procenat inhibicije azidom nađen je kod E-NTPDaza iz kosti (Demenis et al., 2003), srca (Menezes de Oliveira E et al., 1997) i sluzokože želuca pacova (Savegnago et al., 2005).

Natrijum fluorid i ortovanadat inhibiraju različite ATPaze i nespecifične fosfataze. Transportne ATPaze (Ca^{2+} -ATPaza) su naročito osetljive na prisustvo ortovanadata i inhibirane su pri koncentracijama manjim od 0.1 mM (Sorensen and Mahler, 1982). Fluorid je inhibitor enolaze, Ser/The fosfataze i Ca^{2+} -ATPaze (Murphy and Coll, 1992). Oba pomenuta inhibitora mogu inhibirati i ekto-ATPaze. Iako je inhibicija ortovanadatom statistički značajna u ćelijskim membranama uterusa pacova, što može da ukazuje na prisustvo V- i P-tipa ATPaza, u literaturi je opisano da ortovanadat pri malim koncentracijama (0.1 mM) inhibira E-NTPDaze iz humanog i pacovskog seruma (Pilla et al., 1996; Oses et al., 2004) i kokošijeg jajovoda (Strobel et al., 1996). Natrijum-fluorid je takođe značajno inhibirao obe aktivnosti E-NTPDaza u uterusu pacova, pri čemu je ADPazna aktivnost pokazala veću osetljivost na ovaj inhibitor (tabela 3.1). Sličan rezultat je zabeležen u literaturi, na prečišćenim E-ATPDazama iz kokošijeg jajovoda (Strobel et al., 1996; Knowles and Nagy, 1999) i humane placentе (Christoforidis et al., 1995). E-NTPDaze poseduju izvestan stepen homologije aminokiselinske sekvence sa P-tipom ATPaza (Ca^{2+} -ATPazom) (Komoszynski and Wojtczak, 1996), što bi moglo da objasni osetljivost ovih enzima na inhibiciju ortovanadatom i fluoridom.

Suramin je nespecifični antagonist P2 receptora i inhibitor E-NTPDaza (Beukers et al., 1995; Gendron et al., 2002; Kukulski et al., 2005). Efekat suramina nije univerzalan i može se razlikovati u zavisnosti od tkiva; na primer, pokazano je da suramin efikasnije inhibira aktivnost E-NTPDaza u jetri u odnosu na bubrege pacova (Vieira et al., 2004). Ispitivanjem efekta suramina (0.1 mM) na prečišćene enzime iz mozga pacova eksprimirane u CHO ćelijama (Heine et al., 1999), nađena je znatno veća inhibicija NTPDaze 2 (45%) u odnosu na NTPDazu 1 (5%). Procenat

inhibicije E-NTPDaza iz uterusa u našoj studiji (~50%), dobijen u prisustvu 0.3 mM suramina, u skladu je sa rezultatima drugih autora (Savegnago et al., 2005; Leal et al., 2005). Takođe, ovaj rezultat bi mogao da ukazuje na prisustvo NTPDaze 1, koje je otpornija na inhibiciju suraminom, ili i na istovremeno prisustvo E-NTPDaze 1 i 2 u uterusu pacova.

Inhibicija hidrolize ATP i ADP u uterusu pacova u prisustvu EDTA (tabela 3.1, slika 3.7) posledica je uklanjanja dvovalentnih jona neophodnih za aktivnost E-NTPDaza. Smanjenje aktivnosti E-NTPDaza u prisustvu EDTA zabeleženo je u različitim tkivima izolovanim iz pacova, svinje i ribe zebrice (Casali et al., 2001; Kukulski and Komoszynski, 2003; Rico et al., 2003; Leal et al., 2005; Savegnago et al., 2005; Henz et al., 2007). Zavisnost hidrolize ATP i ADP od prisustva dvovalentnih jona je važna karakteristika E-NTPDaza (Plesner, 1995; Zimmermann et al., 2012). Naši rezultati su pokazali da dodavanjem jona Mg^{2+} i Ca^{2+} hidroliza ATP i ADP značajno raste u ćelijskim membranama uterusa pacova (slika 3.7). Joni magnezijuma su bolje aktivirali ATPaznu aktivnost, dok je ADPazna aktivnost u uterusu pacova bila podjednako aktivirana i Mg^{2+} i Ca^{2+} jonima. Optimalni uslovi za merenje aktivnost E-NTPDaza u uterusu pacova su ekvimolarne količine dvovalentnih jona i nukleotida, što je skladu sa nalazima drugih autora (Demenis et al., 2003; Danylovych and Kosterin, 2004; Henz et al., 2006). Odsustvo sinergističkog efekta na aktivnost E-NTPDaza u prisustvu oba jona (slika 3.7; Mg+Ca) ukazuje da, pod datim eksperimentalnim uslovima, hidroliza ATP ne potiče od kontaminacije (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPazom (Demenis et al., 2003).

Ispitivanjem optimalnih uslova za maksimalnu aktivnost E-NTPDaza iz uterusa pacova utvrđeno je da je optimalna temperatura za odvijanje enzimske reakcije 37°C, što odgovara fiziološkoj temperaturi kod albino pacova (35.9°-37.5°C). Optimalna količina proteina je 7 µg, a optimalno vreme trajanja reakcije 10 min, što je u skladu sa literaturnim podacima, gde se pri ispitivanju aktivnosti E-NTPDaza kod glodara obično koriste koncentracije proteina od 2-25 µg i vreme inkubacije 5-20 min (Lai et al., 1980; Menezes de Oliveira E et al., 1997; Nedeljković et al., 1998; Nikezic et al., 1998; Vieira et al., 2004; Leal et al., 2005; Henz et al., 2006; Furstenu et al., 2010).

Maksimalna aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova izmerena je na pH 8.0 za hidrolizu ATP, odnosno na pH 8.5 za hidrolizu ADP.

Ovakav rezultat je takođe potvrda prisustva E-NTPDaza (Plesner, 1995; Zimmermann et al., 2012), čiji je optimalni pH za maksimalnu enzimsku aktivnost u alkalnoj sredini opisan karakterizacijom ovih enzima iz tkiva različitih životinjskih vrsta (Strobel et al., 1996; Menezes de Oliveira E et al., 1997; Leal et al., 2005; Savegnago et al., 2005).

Aktivnost E-NTPDaza u zavisnosti od koncentracije supstrata, opisana je Michaelis-Mentenovom hiperbolom (slike 3.9 i 3.10). Dobijeni kinetički parametri i Hill-ovi koeficijenti (tabela 3.2) ukazuju na jedno mesto vezivanja ATP i ADP. Na osnovu Chevillard-ove krive kompeticije, hidroliza ATP i ADP u uterusu pacova odvija se na istom aktivnom mestu enzima. Sličan rezultat dobijen je analizom aktivnosti NTPDaza iz mozga riba zebrica (Rico et al., 2003), hipokampus mozga (Boeck et al., 2002), seruma (Osés et al., 2004), pljuvačnih žlezda (Henz et al., 2006), kosti (Demenis et al., 2003) i Sertolijevih ćelija pacova (Casali et al., 2001), humanih limfocita, trombocita i placente (Kettlun et al., 1994; Leal et al., 2005). Ovakav rezultat ne znači nužno da je za hidrolizu ATP i ADP odgovoran jedan enzim. Kako je metodom RT-PCR (slika 3.13) i Western blot-a (slika 3.14) pokazano prisustvo više od jednog enzima iz familije E-NTPDaza u uterusu pacova, prava linija na dijagramu kompeticije supstrata može da predstavlja zbirnu hidrolizu ATP i ADP koja se odvija na više aktivnih mesta. Sličan rezultat dobijen je analizom ektonukleotidazne aktivnosti u ćelijama tumora (Walker 256) mlečnih žlezda pacova. Iako je RT-PCR-om detektovana ekspresija dva člana familije E-NTPDaza, Chevillard-ova kriva kompeticije je ukazivala na jedno mesto hidrolize ATP i ADP (Buffon et al., 2007).

Pri koncentracijama $ATP > 1 \text{ mM}$ dobili smo inhibiciju aktivnosti E-NTPDaza iz uterusu pacova. U literaturi je opisana inhibicija enzimске aktivnosti E-NTPDaza povećanjem koncentracije ATP i/ili ADP, pri fiksnim koncentracijama dvovalentnih jona (Mg^{2+} ili Ca^{2+}) (Strobel et al., 1996; Demenis et al., 2003). Smatra se da kompleks $MgATP^{2-}$ predstavlja pravi substrat za enzim, a da povećanjem koncentracije ATP, pri nepromenjenim količinama magnezijuma, dovodi do kompeticije između kompleksa $MgATP^{2-}$ i slobodnog ATP i smanjenja aktivnosti (Frassetto et al., 1995). Takođe, nađeno je da je E-NTPDaza 2 naročito podložna inhibiciji supstratom (Chiang and Knowles, 2008). U slučaju hidrolize ADP, a na

osnovu naših rezultata, takođe se može zaključiti da je kompleks MgADP⁻ pravi (ili bar bolji) supstrat za enzim, ali pri povećanju koncentracije slobodnog ADP ipak ne dolazi do inhibicije ekto-ADPazne aktivnosti u uterusu pacova (slika 3.9).

Inhibicija substratom nije neuobičajena pojava, procenjuje se da javlja kod oko 20% enzima i smatra se da ima regulatornu ulogu. Sličnu osobinu pokazuje još jedan enzim značajan za inaktivaciju neurotransmitera – acetilholin esteraza (AChE). ATP je, kao i acetilholin (ACh), signalni molekul i neurotransmiter, a zajedničko svojstvo im je da se nakon izlučivanja u sinaptičku pukotinu inaktiviraju razgradnjom umesto ponovnim preuzimanjem, kao npr. dopamin i serotonin. To podrazumeva da enzimi koji razgrađuju neurotransmitere imaju veliku efikasnost (AChE i E-NTPDaze), što istovremeno može da predstavlja problem pri prenosu signala. Velika efikasnost enzima znači da bi se velika količina transmitera razgradila pre nego se veže za postsinaptičke receptore. Inhibicija substratom omogućava da se razgradnja neurotransmitera odvija sporo pri visokim koncentracijama, a zatim ubrzava kako se koncentracija smanjuje. Na primer, AChE dostiže maksimalnu aktivnost pri 1 mM, dok se procenjuje da je koncentracija ACh~10 mM nakon otpuštanja iz presinaptičkih vezikula (Reed et al., 2010). Inhibicija supstratom E-NTPDaza u uterusu pacova mogla bi takođe da ima regulatorni značaj, tim pre što je enzim inhibiran sa ATP ali ne i ADP. To bi značilo da E-NTPDaze brzo razgrađuju fiziološke (mikromolarne) koncentracije vanćelijskog ATP, dok bi mogle biti inhibirane u patofiziološkim uslovima kada se oslobađaju veće koncentracije ATP usled oštećenja i smrti ćelija (Di Virgilio, 2000).

Purinske receptore aktiviraju mikromolarne koncentracije nukleotida u vanćelijskoj sredini, a kontrakcije humanog uterusa u *in vitro* uslovima su zabeležene već pri koncentracijama ATP \geq 1 μ M (Bardini et al., 2000). Na osnovu naših rezultata, aktivnost E-NTPDaza u uterusu je veoma visoka u odnosu na ostala tkiva pacova, što se vidi iz vrednosti $V_{\max}^{(app)}$ za hidrolizu ATP (3.973 \pm 0.280 μ mol Pi/min/mg), odnosno ADP (2.854 \pm 0.080 μ mol Pi/min/mg). Specifična aktivnost E-NTPDaza zabeležena u ostalim tkivima pacova kreće se u opsegu od 0.001 μ mol Pi/min/mg u serumu (Oses et al., 2004) do 2.275 μ mol Pi/min/mg u pljuvačnim žlezdama (Henz et al., 2006). Afinitet enzima za ATP ($K_m^{(app)}$ =0.506 \pm 0.062 mM) prevazilazi koncentraciju ATP u vanćelijskom prostoru (<25 μ M) što znači da enzim u

normalnim fiziološkim uslovima nije zasićen supstratom i da njegova aktivnost zavisi od koncentracije vanćelijskog ATP. Odnos hidrolize ATP/ADP je 1:0.57, što govori u prilog pretpostavci da je u vanćelijskoj hidrolizi nukleotida u uterusu pacova dominantna E-NTPDaza 1 (tabela 1.2). Takođe, ovaj odnos ukazuje na ponašanje enzima u fiziološkim uslovima kada su oba supstrata prisutna i takmiče se pri vezivanju za aktivno mesto enzima, u prisustvu alosternih aktivatora i inhibitora koji mogu da utiču na aktivnost enzima (Cornish-Bowden and Cardenas, 2010). Naši rezultati su pokazali da postoji veoma blaga kooperativnost pri vezivanju ATP i ADP (tabela 3.2), te smo pri izračunavanju odnosa hidrolize ATP/ADP smatrali da se enzim ponaša u skladu sa Michaelis-Mentenovom kinetikom.

Na osnovu rezultata dobijenih RT-PCR (slika 3.13) i Western blot (slika 3.14) metodama, u uterusu pacova eksprimirane su ENTPDaza 1, 2 i 8, pri čemu je ekspresija gena *Entpd8* veoma mala. U literaturi nema podataka o genskoj ekspresiji E-NTPDaza u uterusu pacova, ali je imunodetekcijom pokazana proteinska ekspresija E-NTPDaze 1 i 2 kod miševa i pacova soja Sprague-Dawley. E-NTPDaza 1 pronađena je na endotelijumu krvnih sudova i glatkim mišićnim ćelijama miometrijuma, dok je NTPDaza 2 detektovana uglavnom na vezivnom tkivu i žlezdama endometrijuma (Martin-Satue et al., 2009). Iako autori nisu našli prisustvo NTPDaze 8, objašnjenje bi mogla da bude niska ekspresija gena *Entpd8* i samim tim mala zastupljenost ovog enzima u membranama uterusa, što je u skladu sa našim rezultatima (slika 3.13).

ATP i drugi purinski nukleotidi su parakrini signalni molekuli u vanćelijskom prostoru i vezivanjem za purino-receptore (P1 i P2) na ćelijskoj membrani učestvuju u kontroli kontrakcija uterusa i modulaciji imunog odgovora (Burnstock, 2014). Poremećaji kontraktilnosti uterusa mogu imati važnu ulogu u nastanku neplodnosti, dismenoreji i prevremenom porođaju. Lokalni imuni sistem igra suštinsku ulogu u menstruaciji i prilagođavanju uterusa tokom implantacije i trudnoće (odjeljak 1.2.1). Povećani nivoi ATP (Bakker et al., 2007) i adenzina (Escudero and Sobrevia, 2008) u plazmi, praćeni smanjenjem aktivnosti ekto-adenozina u endotelu krvnih sudova, javljaju se tokom preeklampsije, patofiziološkog stanja tokom trudnoće koje predstavlja najčešći uzrok smrtnosti majke i/ili ploda. Razgradnjom ATP i stvaranjem njegovih metabolita (ADP i adenzina), E-NTPDaze regulišu

purinergičku signalizaciju u različitim ćelijama uterusu. Na osnovu analize dobijenih kinetičkih parametara i genske i proteinske ekspresije, naši rezultati su pokazali da je E-NTPDaza 1 dominantni enzim koji hidrolizuje vanćelijske ATP i ADP u uterusu pacova. Učešće E-NTPDaza u reproduktivnoj fiziologiji, posebno u regulaciji kontrakcija uterusu, čini opravdanim dalje istraživanje uticaja potencijalnih lekova i štetnih jedinjenja iz životne sredine u cilju lečenja i prevencije patofizioloških stanja ženskih reproduktivnih organa.

U daljem toku naših istraživanja ispitan je efekat i mehanizma delovanja dvovalentnih jona teških (žive, kadmijuma) i prelaznih metala (bakra) na aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusu pacova. U literaturi uglavnom postoje podaci o *in vivo* i *in vitro* neurotoksičnim efektima jona teških metala i mikroelemenata na ekto-enzime koji inaktiviraju vanćelijski ATP i ADP u mozgu pacova (Oliveira et al., 1994; Barcellos et al., 1994; Schetinger et al., 1995; Carfagna et al., 1996; Vasić et al., 1999; Vasić et al., 2002; Vujisić et al., 2004; Carageorgiou et al., 2004; Krstić et al., 2005) i riba (Senger et al., 2006b; Senger et al., 2006a; Rosemberg et al., 2007), ali nema podataka o uticaju i mehanizmu ovih metalnih jona na ekto-enzime koji hidrolizuju vanćelijske nukleotide u reproduktivnim organima ženki sisara.

Ispitivanjem efekata kadmijum-hlorida na aktivnost E-NTPDaza u uterusu pacova zapaža se da je inhibicija enzima potpuna pri visokim koncentracijama inhibitora (5×10^{-2} M). IC_{50} vrednosti za hidrolizu ATP (0.52 ± 0.02 mM) i ADP (0.73 ± 0.01 mM) su u milimolarnom opsegu koncentracija (tabela 3.3), što je za red veličine veće od IC_{50} vrednosti (0.08 mM) dobijene za inhibiciju Mg^{2+} -ATPaze iz sinaptičkih membrana izolovanih iz celog mozga pacova (Vasić et al., 2009). Za razliku od prečišćenih sinaptičkih membrana, u neprečišćenom homogenatu celog mozga inhibicija od 40% postignuta je u prisustvu 1 mM $CdSO_4$ (Carageorgiou et al., 2004). U membranama mozga riba zebrića 0.5 mM kadmijum-acetata povećalo je ATPaznu aktivnost za ~50%, dok je ADPaznu aktivnost smanjilo za ~40%. Naši rezultati mogu se uporediti sa inhibicijom Mg^{2+} -ATPaze (~50%) na ćelijama glatkih mišića izolovanih iz karotidnih arterija pacova u prisustvu 0.5 mM kadmijum-hlorida (Tokushige et al., 1984). Vrednosti Hill-ovih koeficijenata (tabela 3.3) ukazuju da nema kooperativnosti u vezivanju jona kadmijuma tokom hidrolize ATP dok je za

hidrolizu ADP nađena blaga kooperativnost u interakciji jona kadmijuma sa enzimom(ima) u uterusu pacova. U sinaptičkim membranama mozga pacova nađen je izrazito negativan kooperativni efekat pri vezivanju jona kadmijuma za Mg^{2+} -ATPazu “visokog” afiniteta, dok je pri vezivanju kadmijuma za Mg^{2+} -ATPazu “niskog” afiniteta uočen blago kooperativni efekat (Vasić et al., 2002). Kadmijum, kao i ostali teški metali, može da se veže ireverzibilno za funkcionalne grupe enzima. Praćenjem promena aktivnosti E-NTPDaza u uterusu pacova, u zavisnosti od vremena preinkubacije sa jonima kadmijuma (slika 3.20), utvrđeno je da li je vezivanje jona kadmijuma za enzim ravnotežno. Rezultati pokazuju da je promena aktivnosti najveća tokom prvih 5 min, a ukupno smanjenje aktivnosti manje od 10% za 30 min. Izabrano vreme preinkubacije (15 min) je u delu krive gde se aktivnost E-NTPDaza nije značajno menjala, što ukazuje da je vezivanje jona kadmijuma za enzim ravnotežno i reverzibilno. Sličan trend promene aktivnosti enzima zabeležen za Na^+/K^+ -ATPazu iz sinaptičkih membrana mozga pacova, iako je ukupna promena aktivnosti enzima u prvih 5 minuta bila znatno veća (V. Vasić et al., 2007).

Analizom mehanizma inhibicije, naši rezultati su pokazali da se joni kadmijuma ponašaju kao mešoviti inhibitor E-NTPDaza iz uterusa pacova (tabela 3.6). Kadmijum može inhibirati E-NTPDaze na osnovu najmanje dva mehanizma: vezivanjem za fosfolipide membrane i funkcionalne grupe enzima, što može izazvati konformacione promene u proteinu, kao i stvaranjem kompleksa sa ATP i ADP (tabela 3.9), što može dovesti do smanjene raspoloživosti supstrata. S obzirom da se pri inhibiciji E-NTPDaza u prisustvu kadmijuma menjaju i V_{max} i K_m , mešovita inhibicija može da uključuje i delimično kompetitivno-nekompetitivno ponašanje (Petrović, 1998), pri čemu bi smanjenja aktivnosti mogla nastati usled kompeticije između nereaktivnog kompleksa $CdATP^{2-}$ i supstrata $MgATP^{2-}$, uz istovremeno vezivanje jona kadmijuma za funkcionalne grupe slobodnog enzima i/ili kompleksa enzim-supstrat. Na osnovu izračunatih koncentracija slobodnih jona kadmijuma i kompleksa $CdATP^{2-}$ i $MgATP^{2-}$, odnosno $CdADP^-$ i $MgADP^-$, može se videti da joni kadmijuma formiranjem kompleksa sa ATP i ADP istiskuju Mg^{2+} iz kompleksa $MgATP^{2-}$, odnosno $MgADP^-$, te inhibicija može nastati usled smanjenja dostupnosti supstrata (tabela 3.9). Takođe, jedan deo jona kadmijuma nalazi se slobodan u inkubacionom medijumu i može da interaguje sa funkcionalnim grupama slobodnog

enzima i/ili kompleksa ES. Iako je mešovita inhibicija konstatovana u prisustvu oba supstrata, uz smanjenje vrednosti V_{max} u odnosu na kontrolu, joni kadmijuma smanjili su afinitet enzima prema ATP, dok je afinitet enzima prema ADP povećan (tabela 3.6). Različit uticaj jona kadmijuma na afinitet E-NTPDaza prema supstratu mogao bi se objasniti različitim mehanizmom interakcije E-NTPDaza sa ATP i ADP (Chen and Guidotti, 2001) i konformacionim promenama pri vezivanju različitih supstrata. Mešovita inhibicija se može posmatrati kao jedan vid nekompetitivne inhibicije, koja je utvrđena kinetičkom analizom uticaja kadmijuma na E-NTPDaze na sinaptozomima kore mozga pacova (Barcellos et al., 1994) i sinaptičkim membranama celog mozga pacova (Vasić et al., 2002). Uslovi pod kojima su ovi autori određivali kinetičke parametre i tip inhibicije nisu isti kao u našim eksperimentima, pre svega usled nižih koncentracija jona kadmijuma ($\sim 10\times$ niže IC_{50} vrednosti) i viših koncentracija supstrata (2 mM) i jona magnezijuma (5 mM), što je moglo da znatno umanja efekat kadmijuma na dostupnost supstrata, kao i nastajanje nereaktivnih kompleksa $CdATP^{2-}$ i $CdADP^-$.

Dodavanjem helatora (EDTA, L-Cys) praćen je efekat uklanjanja jona kadmijuma iz inkubacionog medijuma pre inkubacije sa enzimom i nakon 15 minuta preinkubacije. S obzirom da joni kadmijuma potpuno inhibiraju E-NTPDaze u uterusu pacova pri visokim koncentracijama (50 mM), efekat 1 mM EDTA i 1 mM L-Cys na aktivnost enzima meren u prisustvu koncentracije jona kadmijuma koja odgovara IC_{50} vrednostima (0.5 mM za hidrolizu ATP, odnosno 0.7 mM za hidrolizu ADP). Na osnovu dobijenih rezultata (slika 3.31), može se reći da je 1 mM EDTA efikasniji od 1 mM L-Cys u sprečavanju inhibicije i obnavljanju ATPazne i ADPazne aktivnosti enzima. Naši rezultati se u velikoj meri poklapaju sa teorijskim proračunom koncentracije jona kadmijuma i kompleksa, u prisustvu EDTA ili L-Cys (tabela 3.9). EDTA je značajno smanjio koncentraciju slobodnih jona i kompleksa $CdATP^{2-}$ i $CdADP^-$, ali je istovremeno vezivanjem jona Mg^{2+} smanjio koncentraciju $MgATP^{2-}$. L-Cys je takođe smanjio koncentraciju slobodnih jona i kompleksa $CdATP^{2-}$ i $CdADP^-$, ali usled manjeg afiniteta prema jonima Mg^{2+} , koncentracije $MgATP^{2-}$ i $MgADP^-$ su povećane. Na osnovu teorijskih izračunavanja i eksperimentalno određenih aktivnosti enzima, može se zaključiti da je uklanjanje jona kadmijuma u prisutvu helatora imalo više uticaja na očuvanje i obnavljanje

aktivnosti E-NTPDaza od promena u koncentraciji supstrata. Veća efikasnost EDTA u očuvanju i obnavljanju enzimske aktivnosti može se objasniti većom konstantom stabilnosti kompleksa CdEDTA²⁻ u odnosu na CdCys (tabela 6.3). Veliki procenat obnovljene aktivnosti takođe je potvrda reverzibilnog vezivanja jona kadmijuma za NTPDaze u uterusu pacova za izabrano vreme inkubacije od 15 min.

U literaturi sličan *in vitro* efekat na očuvanje i obnavljanje aktivnosti Mg²⁺-ATP na ćelijama glatkih mišića iz karotida pacova zabeležen je u prisustvu 0.01 mM jona kadmijuma i 0.1 mM EDTA. EDTA je očuvao >90% aktivnost enzima kada je dodat pre enzima u inkubacionu smešu i obnovio ~80% aktivnost Mg²⁺-ATPaze nakon 20 min preinkubacije enzima sa jonima kadmijuma (Tokushige et al., 1984). L-Cys (0.83 mM) nije uticao na inhibiciju Mg²⁺-ATPaze u neprečišćenom homogenatu celog mozga, u prisustvu 1 mM kadmijum-sulfata (Carageorgiou et al., 2004). U *in vivo* uslovima, hroničan tretman (30 dana) Wistar pacova kadmijum-hloridom (2 mg/kg), različito je uticao na aktivnost E-NTPDaza u limfocitima, trombocitima i sinaptozomima kore mozga i hipokampusu. Ko-tretman sa N-acetil-Cys (150 mg/kg) sprečio je inhibirajući efekat kadmijuma na aktivnost E-NTPDaza u sinaptozomima kore mozga pacova, ali nije uticao na smanjenje aktivnosti E-NTPDaza na trombocitima (Goncalves et al., 2013).

Pri ispitivanju efekata živa(II)-hlorida uočava se da je aktivnost E-NTPDaza u uterusu pacova veoma otporna na uticaj jona Hg²⁺, a inhibicija nepotpuna (80-90%), čak i pri visokim koncentracijama inhibitora (~10⁻² M). IC₅₀ vrednosti za hidrolizu ATP (0.82±0.02 mM) i ADP (0.91±0.06 mM) su u milimolarnom opsegu koncentracija (tabela 3.4), što je za dva reda veličine veća koncentracija od IC₅₀ vrednosti (0.0036 mM) dobijene za inhibiciju Mg²⁺-ATPaze u sinaptičkim membranama izolovanim iz celog mozga pacova (Vasić et al., 2002; Krstić et al., 2005). Slična osetljivost na jone žive(II) nađena je i za E-ATPDazu iz sarkoleme srca pacova (Menezes de Oliveira E et al., 1997) i E-ATPDaza (CD39) iz aorte govečeta (Cote et al., 1992); aktivnost ovih enzima je inhibirana 65% u prisustvu 10 µM živa(II)-hlorida. Međutim, IC₅₀ inhibicija hidrolize ATP u ćelijskim membranama uterusu može se uporediti sa vrednostima inhibicije u ćelijskim membranama ovarijuma (IC₅₀=1.55 mM). Razlike u osetljivosti (IC₅₀ vrednostima) E-NTPDaza u ćelijskim membranama različitih tkiva na inhibiciju jonima žive(II) mogla bi se

objasniti različitim uslovima *in vitro* eksperimenta (količina proteina, koncentracija supstrata i divalentnih jona), ali i različitom zastupljenošću članova E-NTPDaza na ćelijama različitih tkiva pacova. Naime, pokazano je da su E-ATPDaza i E-ATPaza iz ćelija humanog hepatoma (Li-7A) različito osetljive na inhibiciju jona žive(II) (Knowles, 1988). U sinaptičkim membranama celog mozga pacova nađena je aktivnost dve Mg^{2+} -ATPaze, "visokog" ($ATP < 1 \text{ mM}$) i "niskog" afiniteta prema supstratu ($ATP > 2 \text{ mM}$), koje se razlikuju i po osetljivosti na inhibiciju metalnim jonima (Vasić et al., 2002; Krstić et al., 2005). Na osnovu rezultata PCR analize i imunoblota, u mozgu pacova eksprimirane su E-NTPDaze 1, 2 i 3 (Robson et al., 2006). Na membranama neurona pronađeno je prisustvo NTPDaze 1 (Boeck et al., 2002) i NTPDaze 2 (Braun et al., 2003), dok u nervnim završecima (sinaptozomima) preovladava prisustvo E-NTPDaze 3 (Cunha, 2001; Belcher et al., 2006), iako ima rezultata koji ukazuju da su E-NTPDaza 1 i 2 takođe prisutne u sinaptičkim membranama kaudalnog jedra i hipokampusa pacova (Nedeljkovic et al., 2003). U uterusu pacova pokazana je ekspresija NTPDaze 1 i 2, iako kinetički parametri ukazuju da je NTPDaza 1 dominantna izoforma (Milošević et al., 2012).

Vrednosti Hill-ovih koeficijenata za hidrolizu ATP i ADP u prisustvu jona žive(II) su oko 1 (tabela 3.4), što ukazuje na jedno mesto vezivanja, odnosno, na nepostojanje kooperativnosti u interakciji jona žive(II) sa enzimom(ima) u uterusu pacova. S obzirom da joni teških metala, pogotovo živa, mogu da se vežu velikim afinitetom i/ili ireverzibilno za funkcionalne grupe enzima, a naš cilj je bio ispitati mehanizam interakcije jona sa enzimom u ravnotežnim uslovima, praćena je promena aktivnosti E-NTPDaza u zavisnosti od vremena preinkubacije uzorka sa jonima žive(II) (slika 3.17). Rezultati su pokazali da je pad aktivnosti enzima mali i postepen, te je izabrano vreme preinkubacije (15 min) u delu krive gde se aktivnost E-NTPDaza nije značajno menjala, što ukazuje da je vezivanje jona žive(II) za enzim ravnotežno i reverzibilno.

Analizom mehanizma inhibitornog dejstva jona žive(II), naši rezultati su pokazali da se joni Hg^{2+} ponašaju kao mešoviti inhibitor hidrolize ATP, vezujući se za slobodan enzim ($K_i^{(app)} = 3.477 \pm 0.170 \text{ mM}$) i kompleks enzim-supstrat ($K_i^{(app)} = 0.705 \pm 0.001 \text{ mM}$). Mešovita inhibicija se može posmatrati kao jedan vid nekompetitivne inhibicije, pri čemu se prave na Lineweaver-Burk-ovom dijagramu

seku iznad ili ispod x-ose. Nekompetitivna inhibicija jonima Hg^{2+} pronađena je kod Mg^{2+} -ATPaze u ćelijskim membranama izolovanim iz uterusu (Horvat et al., 2009) i ovarijuma pacova (Milošević et al., 2005), ali pod različitim eksperimentalnim uslovima (5 mM Mg^{2+} , 2 mM ATP, 15 min trajanje enzimske reakcije) i nakon 30 min preinkubacije uzorka ćelijskih membrana sa jonima Hg^{2+} . Za razliku od inhibicije E-NTPDaza u tkivima pacova, u ćelijskim membranama mozga riba (*Danio rerio*), joni žive(II) su akompetitivni inhibitor hidrolize ATP i ADP (Senger et al., 2006a).

U prisustvu ADP kao supstrata, joni žive(II) bili su nekompetitivni inhibitor E-NTPDaza iz uterusu pacova ($K_i^{(app)}=1.126\pm 0.005$ mM). Ovaj mehanizma inhibicije je u skladu sa literaturnim podacima o nekompetitivnoj inhibiciji jonima žive(II) ATPaza (Na^+/K^+ -ATPaze i Mg^{2+} -ATPaze) iz sinaptičkih membrana mozga pacova (Vasić et al., 2009).

Joni žive(II) imaju veliki afinitet prema tiolnim grupama i smatra se da je glavni mehanizam njihovog delovanja vezivanje za sulfhidrilne grupe Cys na površini proteina. Međutim, E-NTPDaze nemaju slobodnih sulfhidrilnih grupa u vanćelijskom domenu, 10 Cys ostataka povezani su u disulfidne mostove, dok se dve slobodne SH grupe Cys nalaze u TM domenu i jedna na N-terminusu u citoplazmi (Kirley et al., 2006). Odsustvo slobodnih sulfhidrilnih grupa na vanćelijskom domenu enzimu moglo bi da objasni otpornost E-NTPDaza iz uterusu pacova na inhibiciju jonima žive(II). Zapažene razlike u IC_{50} vrednostima i mehanizmu inhibicije ATPazne i ADPazne aktivnosti u prisustvu jona žive(II) mogle bi se objasniti različitim mehanizmom interakcije E-NTPDaza sa ATP i ADP (Chen and Guidotti, 2001).

Kako joni žive(II) ne stupaju u interakciju sa supstratom, inhibitorni efekat na enzimsku aktivnost može se pripisati slobodnim jonima žive(II) (tabela 3.9). Dodavanjem EDTA i L-Cys u reakcionu smešu, praćen je efekat uklanjanja slobodnih jona žive(II) iz medijuma, pre inkubacije sa enzimom i nakon 15 minuta preinkubacije enzima sa jonima Hg^{2+} . Joni žive(II) ne izazivaju potpunu inhibiciju E-NTPDaza u uterusu pacova, ni pri visokim koncentracijama (10-20 mM) te je efekat 1 mM EDTA i 1 mM L-Cys na aktivnost enzima meren u prisustvu koncentracije jona žive(II) koja odgovara IC_{50} vrednostima (1 mM). Na osnovu dobijenih rezultata,

L-Cys je bio efikasniji od EDTA u sprečavanju inhibicije i obnavljanju ATPazne aktivnosti enzima u prisustvu 1 mM živa(II)-hlorida, dok su u slučaju ADPazne aktivnosti EDTA i L-Cys su bili podjednako, ali manje efikasni u sprečavanju inhibicije i obnavljanju aktivnosti enzima (slika 3.30). Naši rezultati se u velikoj meri poklapaju sa teorijskim proračunom koncentracije jona žive(II) i kompleksa, u prisustvu EDTA ili L-Cys (tabela 3.10). Veća efikasnost L-Cys u očuvanju i obnavljanju enzimske aktivnosti može se objasniti većom konstantom stabilnosti kompleksa HgCys u odnosu na HgEDTA²⁻. Veliki procenat obnovljene aktivnosti je takođe potvrda reverzibilnog vezivanje jona žive(II) za E-NTPDaze u uterusu pacova za izabrano vreme inkubacije od 15 min, određeno iz prethodnih eksperimenata (slika 3.17).

U literaturi ima malo podataka o *in vitro* uticaju EDTA i L-Cys na prevenciju i obnavljanje aktivnosti E-NTPDaza u prisustvu jona žive(II). Sličan efekat na sprečavanje inhibicije i obnavljanje aktivnosti E-NTPDaza iz mozga riba zebrića pokazan je u prisustvu 0.5 mM jona žive(II) i 1 mM ditionitrola (DTT), jedinjenja sa dve tiole grupe. DTT je potpuno očuvao aktivnost enzima kada je dodat pre enzima u inkubacionu smešu, ali je samo delimično obnovio aktivnost E-NTPDaza nakon inkubacije enzima sa jonima žive(II). Takođe, DTT je bio efikasniji u očuvanju i obnavljanju ATPazne u odnosu na ADPaznu aktivnost, što je skladu sa našim rezultatima. Na sinaptičkim membranama mozga pacova pokazano je da 1 mM EDTA, 10 mM L-Cys i 10 mM GSH dodati u inkubacionu smešu pre uzorka mogu da zaštite aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze i Mg²⁺-ATPaze od uticaja jona žive(II) (0.1 mM), ali je efekat obnavljanja aktivnosti izostao i kada su koncentracije helatora povećane preko 10 mM (Krstić et al., 2005).

Rezultati ispitivanja efekata bakar(II)-sulfata na aktivnost E-NTPDaza u uterusu pacova su pokazali da je inhibicija hidrolize ATP potpuna pri koncentraciji 1×10^{-3} M CuSO₄, dok je maksimalana inhibicija hidrolize ADP od 90% postignuta u prisustvu 3×10^{-3} M CuSO₄. IC₅₀ vrednosti za hidrolizu ATP (0.18±0.01 mM) i ADP (0.38±0.03 mM) su za red veličine veća od IC₅₀ vrednosti (0.042 mM) dobijenih za inhibiciju Mg²⁺-ATPaze iz sinaptičkih membrana izolovanih iz celog mozga pacova (Vasić et al., 2009). Za razliku od inhibicije zabeležene u sinaptičkim membranama pacova, u membranama mozga riba zebrića (*Danio rerio*) inhibicija ATPazne

aktivnosti od 48% postignuta je u prisustvu 1 mM CuSO₄ dok je ADPazna aktivnost bila značajno smanjena (41%) već pri koncentraciji od 0.25 mM (Rosemberg et al., 2007). Inhibicija ATPazne aktivnosti (52%) u prisustvu 0.050 mM bakar(II)-sulfata zabeležena je u ćelijskim membranama izolovanim iz digestivne žlezde šarenog puža (*Helix aspersa*) (de Souza Dahm et al., 2006). Razlike u IC₅₀ vrednostima inhibicije E-NTPDaza u ćelijskim membranama različitih tkiva mogla bi se objasniti različitim uslovima *in vitro* eksperimenta (količina proteina, koncentracija supstrata i dvovalentnih jona), kao i različitom zastupljenošću članova E-NTPDaza na ćelijama u različitim tkivima. U zavisnosti od sastava inkubacione smeše zabeležena je i promena IC₅₀ vrednosti inhibicije Mg²⁺-ATPa u ćelijskim membranama uterusu pacova u prisustvu jona bakra(II). U uslovima kada su supstrat i dvovalentni joni dodati u višku (2 mM ATP, 5 mM Mg²⁺) IC₅₀ vrednost je bila viša (5.56×10^{-4} M CuSO₄) u odnosu na IC₅₀ (1.15×10^{-4} M), izmerenu u optimalnim uslovima (1 mM ATP, 1 mM Mg²⁺) za maksimalnu aktivnost E-NTPDaza iz uterusu pacova (Milošević et al., 2009). Iako bi se moglo pretpostaviti da povećanje koncentracije jona magnezijuma ima zaštitni efekat, tokom ispitivanja optimalnih uslova za aktivnost E-NTPDaza iz uterusu pacova, povećanje koncentracije jona Mg²⁺ u prisustvu konstantne koncentracije ATP takođe izaziva inhibitorski efekat na enzimsku aktivnost (rezultati nisu prikazani).

Vrednosti Hill-ovih koeficijenata (tabela 3.6) ukazuju na postojanje pozitivne kooperativnosti u vezivanju jona bakra(II) tokom hidrolize ATP, dok je za hidrolizu ADP nađena blaga negativna kooperativnost u interakciji jona bakra(II) sa enzimom(ima) u uterusu pacova. S obzirom da joni bakra(II), kao i ostali teški metali, mogu da se vežu velikim afinitetom za funkcionalne grupe enzima, aktivnost E-NTPDaza iz uterusu pacova merena je u zavisnosti od vremena preinkubacije sa jonima bakra(II) (slika 3.23). Rezultati su pokazali da je smanjenje hidrolize ATP i ADP oko 25% nakon 40 min preinkubacije enzima sa jonima bakra(II). Izabrano vreme preinkubacije (15 min) je u delu krive gde se aktivnost E-NTPDaza nije značajno menjala, što ukazuje da je vezivanje jona bakra(II) za enzim ravnotežno. O uticaju vremena preinkubacije na inhibiciju E-NTPDaza jonima bakra(II) ima malo literaturnih podataka. Vreme preinkubacije od 10 min korišćeno je pri ispitivanju inhibicije ATPazne aktivnosti u ćelijskim membranama digestivne žlezde puža (de

Souza Dahm et al., 2006) i sinaptičkim plazma membranama mozga pacova (Vasić et al., 1999), dok je efekat CuSO_4 na NTPDaze iz ćelijskih membrana zebrića meren nakon 40 min preinkubacije (Rosemberg et al., 2007).

Analizom mehanizma inhibicije, naši rezultati su pokazali da se joni bakra ponašaju kao akompetitivni inhibitor ATPazne aktivnosti ($K_i^{(\text{app})}=0.068\pm 0.004$ mM) iz uterusu pacova, smanjujući vrednosti V_{max} i K_m (tabela 3.8). Joni bakra(II) mogu inhibirati E-NTPDaze na osnovu najmanje dva mehanizma: vezivanjem za funkcionalne grupe enzima, što može izazavati konformacione promene u proteinu, kao i stvaranjem kompleksa sa ATP i ADP (tabela 3.11), što može dovesti do smanjenja koncentracije supstrata i/ili kompeticije neaktivnog kompleksa CuATP^{2-} sa supstratom. Na osnovu tipa inhibicije E-NTPDaza u prisustvu CuSO_4 moglo bi se pretpostaviti da je glavni mehanizam inhibicije vezivanje jona bakra(II) za funkcionalne grupe kompleksa enzim-supstrat. U sinaptičkim membranama mozga pacova nađena je nekompetitivna inhibicija za Mg^{2+} -ATPazu "visokog" afiniteta. Vrednosti V_{max} u prisustvu jona bakra(II) bile su smanjene za obe Mg^{2+} -ATPaze ("visokog" i "niskog" afiniteta) u sinaptičkim plazma membranama, dok su vrednosti K_m , i $K_{0.5}$ ostale nepromenjene (Vasić et al., 1999). Uslovi pod kojima su autori određivali kinetičke parametre i tip inhibicije nisu isti kao u našim eksperimentima, pre svega usled nižih koncentracija jona bakra(II) ($\sim 10\times$ niže IC_{50} vrednosti) i viših koncentracija supstrata (2 mM) i jona magnezijuma (5 mM). Nekompetitivan tip inhibicije E-NTPDaza jonima bakra(II) zabeležen je i u ćelijskim membranama mozga zebrića (*Danio rerio*) (Rosemberg et al., 2007). U prisustvu ADP kao supstrata, joni bakra(II) bili su mešoviti inhibitor E-NTPDaza u uterusu pacova, vezujući se za slobodan enzim ($K_i^{(\text{app})}=0.182\pm 0.002$ mM) i kompleks enzim-supstrat ($K_i'^{(\text{app})}=0.285\pm 0.002$ mM).

Na osnovu izračunatih koncentracija slobodnih jona bakra(II) i kompleksa CuATP^{2-} i MgATP^{2-} , odnosno CuADP^- i MgADP^- , može se videti da joni bakra(II) formiranjem kompleksa sa ATP i ADP istiskuju Mg^{2+} iz kompleksa MgATP^{2-} , odnosno MgADP^- , te inhibicija može nastati usled smanjenja dostupnosti supstrata (tabela 3.11). Takođe, jedan deo jona bakra(II) nalazi se slobodan u inkubacionom medijumu i može da interaguje sa funkcionalnim grupama slobodnog enzima i/ili kompleksa enzim-supstrat iako je mešovita inhibicija konstatovana samo u prisustvu

ADP, uz smanjenje vrednosti V_{max} i afiniteta enzima u odnosu na kontrolu (tabela 3.8). Različiti parametri inhibicije (IC_{50} , kooperativnost i tip inhibicije) u prisustvu jona bakra(II) za ATPazu i ADPazu aktivnost mogu nastati kao rezultat različitog mehanizma interakcije E-NTPDaza sa ATP i ADP (Chen and Guidotti, 2001) i/ili promenom konformacije enzima pri vezivanju različitih supstrata.

Dodavanjem helatora (EDTA, L-Cys) praćen je efekat uklanjanja jona bakra(II) iz inkubacionog medijuma pre inkubacije sa enzimom i nakon 15 minuta preinkubacije. Efekat 1 mM EDTA i 1 mM L-Cys na aktivnost enzima merenje je u prisustvu koncentracije jona bakra(II) koja odgovara IC_{50} vrednostima (0.1 mM za hidrolizu ATP, odnosno 0.3 mM za hidrolizu ADP). Na osnovu dobijenih rezultata (slika 3.32), može se reći da je 1 mM EDTA efikasniji od 1 mM L-Cys u sprečavanju inhibicije i obnavljanju ATPazne i ADPazne aktivnosti enzima. Na osnovu izračunatih koncentracije jona bakra(II) i kompleksa sa helatorima i supstratima (tabela 3.11) vidi se da je EDTA značajno smanjio koncentraciju slobodnih jona i kompleksa $CuATP^{2-}$ i $CuADP^-$, ali je istovremeno vezivanjem jona magnezijuma smanjio i koncentraciju $MgATP^{2-}$ i $MgADP^-$. L-Cys je takođe smanjio koncentraciju slobodnih jona i kompleksa Cu^{2+} sa ATP i ADP, ali je usled manjeg afiniteta prema jonima magnezijuma manje uticao na promenu koncentracija $MgATP^{2-}$ i $MgADP^-$. Na osnovu teorijskih izračunavanja i eksperimentalno određenih aktivnosti enzima, može se zaključiti da uklanjanje jona bakra u prisutvu helatora više utiče na očuvanje i obnavljanje aktivnosti E-NTPDaza od promena u koncentraciju supstrata. Veća efikasnost EDTA u očuvanju i obnavljanju enzimske aktivnosti može se objasniti većom konstantom stabilnosti kompleksa $CuEDTA^{2-}$ u odnosu na $CuCys$ (tabela 6.3). Veliki procenat obnovljene aktivnosti takođe je potvrda reverzibilnog vezivanje jona bakra(II) za NTPDaze u uterusu pacova za izabrano vreme preinkubacije od 15 min.

Sličan efekat EDTA na očuvanje i obnavljanje aktivnosti Mg^{2+} -ATPaze iz sinaptičkih plazma membrana mozga pacova pokazan je u prisustvu 0.042 mM $CuSO_4$ (Vasić et al., 1999). Prisustvo 1 mM EDTA u inkubacionom medijumu sprečilo je inhibiciju Mg^{2+} -ATPaze pri koncentracijama Cu^{2+} manjim od 1 mM, a IC_{50} vrednost se povećala za dva reda veličine (1.3×10^{-3} M $CuSO_4$) u odnosu na IC_{50} vrednost (4.19×10^{-5} M) kada EDTA nije bio dodat u reakcionom medijumu pre početka

reakcije. Kada je EDTA dodat u reakcionu smešu nakon 10 minuta preinkubacije enzima sa 5×10^{-5} M CuSO_4 , aktivnost je potpuno obnovljena pri koncentracijama EDTA od 10^{-4} i 10^{-3} M (Vasić et al., 1999). Ispitivanjem efekta 1 mM EDTA na aktivnost Mg^{2+} -ATPaze u ćelijskim membranama uterusa nađeno je da prisustvo helatora povećava IC_{50} vrednost za red veličine ($\text{IC}_{50}=1.15 \times 10^{-4}$ M bez EDTA, $\text{IC}_{50}=1.71 \times 10^{-3}$ M u prisustvu 1 mM EDTA) (Milošević et al., 2009).

Rezultati dobijeni u ovom radu pokazali su da se joni žive(II), kadmijuma i bakra(II) ponašaju kao inhibitori aktivnosti E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova, pri čemu je bakar najefektivniji inhibitor, zatim kadmijum, a najmanje živa. Opadajuća efikasnost pomenutih jona pri inhibiciji enzima mogla bi da se dovede u korelaciju sa veličinom jonskog radijusa koji opada u nizu $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Hg}^{2+}$. Takođe, zapažene su razlike u IC_{50} vrednostima, kooperativnim efektima i mehanizmu inhibicije ATPazne i ADPazne aktivnosti u prisustvu jona ispitivanih metala. Podaci iz literature pokazali su da i drugi inhibitori E-NTPDaza imaju različit uticaj na hidrolizu ATP i ADP. Inhibicija prečišćenih E-ATPDaza iz kokošijeg jajovoda fluoridom (2 mM), pirofosfatom (2 mM), vanadatom (0.2 mM) i azidom (10 mM) zavisi od supstrata. Na primer, u prisustvu azida smanjuju se i K_m i V_{\max} ADPazne aktivnosti, dok se u slučaju hidrolize ATP menja jedino K_m (Knowles and Nagy, 1999). Različite IC_{50} vrednosti i tip inhibicije hidrolize ATP i ADP u prisustvu jona gadolinijuma zabeležene su kod E-NTPDaze izolovane iz električnog organa raže (*Torpedo*) i apiraze iz krompira (Escalada et al., 2004).

Iako katalitički mehanizam E-NTPDaza nije u potpunosti poznat, literaturni podaci ukazuju na različit mehanizam interakcije enzima sa ATP i ADP (Chen and Guidotti, 2001). Na osnovu rezultata EPR (engl. electron paramagnetic resonance) spektra, dobijenog u prisustvu vanadil (VO^{2+}) jona umesto jona Mg^{2+} ili Ca^{2+} , autori su pokazali da je interakcija enzima (solubilne CD39 prečišćene iz kulture ćelija insekata) različita sa ATP u odnosu na ADP. U zavisnosti od prisustva/odsustva ATP ili ADP u medijumu, pronađene su čak četiri različite konformacije sCD39. Smatra se da su u prisustvu ATP ligandi za interakciju sa vanadil jonom karboksilna i amino grupa enzima, dok su u prisustvu ADP karboksilna i hidroksilna grupa. U odsustvu supstrata, vanadil joni vezuju se za dve hidroksilne grupe sCD39 i dva molekula vode koji su vodoničnim vezama vezani za aminokiselinske ostatke aktivnog mesta

enzima. Aminokiselinski ostaci iz ACR (“apiraznih regiona”) enzima učestvuju u formiranju aktivnog mesta i pozicioniranju supstrata pri katalitičkoj reakciji, ali za razliku od drugih membranskih enzima, transmembranski domeni regulišu formiranje oligomera, aktivnost i afinitet E-NTPDaza prema supstratima (Grinthal and Guidotti, 2002). Na osnovu kristalne strukture NTPDaze 2 pacova u prisustvu analoga ATP (β , γ -imidoadenozin-trifosfata) i jona Ca^{2+} , kao i efekta mutageneze aminokiselinskih ostataka u aktivnom mestu enzima, predloženi mehanizam hidrolize odvija se nukleofilnim napadom molekula vode na γ -fosfatnu grupu ATP. Glu165 iz ACR3 regiona aktivira molekul vode dok dvovalentni metalni jon (Mg^{2+} ili Ca^{2+}) i His50 (ACR1) imaju ulogu u smanjenju negativnog naelektrisanja terminalne fosfatne grupe. Negativno naelektrisanje prelaznog stanja stabilizovano je vodoničnim vezama sa amidnim grupama polipeptidnog lanca (Gly204, Ala205) i hidroksilnim ostacima aminokiselina koje predstavljaju donore protona (Ser48) (Zimmermann et al., 2012). Uzevši u obzir uticaj transmembranskih heliksa E-NTPDaza na konformaciju aktivnog mesta i afinitet prema različitim nukleotidima (Robson et al., 2006), inhibicija enzima može biti posledica vezivanje jona metala za funkcionalne grupe aktivnog mesta ali i fosfolipide ćelijske membrane ili aminokiselinske ostatke u blizini TM domena.

Naši rezultati su pokazali da je *in vitro* aktivnost E-NTPDaza iz uterusu pacova manje osetljiva na uticaj jona žive, kadmijuma i bakra u odnosu na ekto-enzime iz sinaptičkih membrana mozga pacova, što ukazuje na manji stepen toksičnosti ispitivanih jona na uterus u odnosu na mozak. Usled različitog afiniteta P2 receptora, koji se kreće u opsegu od nanomolarnih (P2Y receptori) do milimolarnih koncentracija vanćelijskih nukleotida (P2X₇ receptor), male promene u aktivnosti ekto-enzima mogu da utiču na odnos ATP i njegovih proizvoda hidrolize (ADP, adenzina) u vanćelijskom prostoru i dovedu do izmenjene aktivacije purinoceptora u uterusu. Pored inhibicije aktivnosti E-NTPDaza, joni teških i prelaznih metala su takođe alosterni modulatori pojedinih P2 receptora (Coddou et al., 2011).

EDTA je jedno od najčešće korišćenih jedinjenja u terapiji akutnog i hroničnog trovanja teškim metalima. Zbog velikog afiniteta jona teških metala prema -SH grupama u biomolekulima, L-cistein je izabran kao model jedinjenje za ispitivanje zaštitnog efekta tiolnih jedinjenja (GSH, NAC, DMSA, DMPS, DTT) koja se koriste

u prevenciji i/ili terapiji intoksikacije teškim metalima. Koncentracije EDTA i L-Cys korišćene u našim eksperimentima su odabrane na osnovu literaturnih podataka o *in vitro* efektu pomenutih jedinjenja na aktivnost membranskih ATPaza u prisustvu jona teških metala. EDTA (1 mM) u *in vitro* uslovima je značajno sprečila inhibiciju i obnovila aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze i Mg^{2+} -ATPaze iz sinaptičkih membrana pacova, u prisustvu jona cinka, bakra, gvožđa i kobalta (Vasić et al., 1999; Krstić et al., 2005). Iako je ranije pokazano da je 10 mM L-Cys uspešno štitio *in vitro* sinaptičku aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze i Mg^{2+} -ATPaze (Krstić et al., 2005) od uticaja teških metala, u našim eksperimentima korišćena je (niža) koncentracija L-Cys (1 mM) koja više odgovara fiziološkim vrednostima nađenim u krvnoj plazmi ljudi koji su uzimali L-Cys kao suplement (0.5 g dnevno, *per os*) (Murakami and Webb, 1981).

Rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazali su da EDTA i L-cistein u *in vitro* uslovima mogu da preduprede i otklone efekat žive(II)-hlorida, kadmijuma-hlorida i bakra(II)-sulfata na aktivnost E-NTPDaza iz uterusu pacova, što otvara mogućnost ispitivanja ovih ili sličnih jedinjenja u prevenciji i terapiji toksičnog delovanja (ispitivanih) metala na purinergičku signalizaciju u reproduktivnim organima sisara.

5 ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih i prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Hidrolizu vanćelijskog ATP i ADP u uterusu pacova katalizuju enzimi iz familije E-NTPDaza. To potvrđuju rezultati: neosetljivosti na inhibitore drugih membranskih ATPaza (oligomicin, ouabain, teofilin i levamisol); inhibicija suraminom; pH optimum za maksimalnu aktivnost enzima na alkalnom pH (8.0-8.5) za oba supstrata; zavisnost enzimske aktivnosti od dvovalentnih jona.
2. Slične K_m vrednosti za ATP i ADP, odnos početnih brzina hidrolize ATP/ADP, Chevillard-ova kriva kompeticije ATP i ADP, kao i inhibicija milimolarnim koncentracijama natrijum-azida (5-10 mM) ukazuju da je E-NTPDaza 1 dominantni enzim koji hidrolizuje vanćelijske nukleotide u uterusu pacova.
3. RT-PCR analizom pokazana je ekspresija gena *Entpd* 1, 2 i 8 u uterusu pacova a Western blot analizom detektovano je prisustvo NTPDaze 1 i 2 u ćelijskim membranama uterusa pacova. Zbog male genske ekspresije NTPDaze 8, može se smatrati da je njena zastupljenost u membranama uterusa mala u odnosu na NTPDazu 1 i 2.
4. Poređenjem IC_{50} vrednosti metalnih jona (Hg^{2+} , Cd^{2+} i Cu^{2+}) na aktivnost E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova, uočeno je da je redosled efikasnosti inhibitora bakar(II)>kadmijum>živa(II). ATPazna aktivnost je osetljivija na prisustvo pomenutih jona metala u odnosu na ADPaznu aktivnost.
5. Mehanizam inhibicije jonima metala i promena kinetičkih parametara se razlikuju u prisustvu ATP i ADP. Za jone bakra(II) nađena je akompetitivna (ATP) i mešovita inhibicija (ADP); joni kadmijuma su mešoviti inhibitor u prisustvu oba supstrata a za živa(II) utvrđena je mešovita (ATP) i nekompetitivna inhibicija (ADP) aktivnosti E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa pacova.

6. EDTA je bio efikasniji od L-Cys u sprečavanju inhibicije i obnavljanju enzimske aktivnosti u prisustvu jona bakra(II) i kadmijuma. U slučaju inhibicije jonima žive(II) efekat EDTA i L-Cys bio je približno isti. Oba jedinjenja su bila efikasnija u prevenciji i obnavljanju ATPazne u odnosu na ADPaznu aktivnost enzima.

7. Aktivnost E-NTPDaza iz uterusu pacova je bila bolje zaštićena kada su EDTA ili L-Cys dodati u inkubacionu smešu pre kontakta sa jonima teških metala. Ovakav rezultat pokazuje da su EDTA i L-Cys, gradeći komplekse sa jonima metala, smanjili količinu slobodnih jona koji bi mogli da se vežu za enzim. Efekat EDTA i L-Cys na obnavljanje aktivnosti E-NTPDaza bio je takođe značajan, ali od 3% do 15% manji od zaštitnog efekta.

6 EKSPERIMENTALNI DEO

6.1 Hemikalije i reagensi

Sve hemikalije korišćene u eksperimentalnom radu bile su p.a. stepena čistoće. Hemikalije su nabavljene od sledećih proizvođača:

- ✓ Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA): Tris baza, natrijum-dodecil-sulfat (SDS), ATP dinatrijum so, ADP natrijumova so, Tween-20, etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA), MES, Folin-Ciocalteu-ov reagens, bakar(II)-sulfat pentahidrat, natrijum-hlorid, natrijum-hidroksid, anhidrovani natrijum-karbonat, natrijum-kalijum-tartarat, L-cistein, benzen, natrijum-ortovanadat, teofilin, suramin, oligomicin, ouabain, natrijum-fluorid, levamisol, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), β -merkaptioetanol (β -ME), 3,3'-diaminobenzidina (DAB), bromfenol plavo;
- ✓ Serva electrophoresis (Heidelberg, Germany): Tris, albumin goveđeg seruma (BSA), akrilamid/bisakrilamid (AA-bis), amonijum-persulfat (APS), glicin, Ponceau S, dietilpirokarbonat (DEPC), agaroza, etidijum-bromid, borna kiselina;
- ✓ VWR International (Dublin, Ireland): metanol, amonijum-molibdat, natrijum-hidrogen-fosfat, dinatrijum-hidrogen-fosfat;
- ✓ Merck (New Jersey, USA): natrijum-acetat, perhlorna kiselina (PCA), kalijum-hidrogen-fosfat, živa(II)-hlorid, kadmijum-hlorid i nikel-hlorid;
- ✓ ICN Biomedicals (Irvine, CA, USA): magnezijum-hlorid i ADP-trilitijum so;
- ✓ LACH-NER (Brno, Czech Republic): n-butanol, sumporna kiselina, kalaj-hlorid;
- ✓ Lachema (Brno, Czech Republic): saharoza;
- ✓ Zorka Pharma (Šabac, Srbija): hlorovodonična kiselina, perhlorna kiselina, vodonik peroksid, sirćetna kiselina, kalijum-hlorid, hloroform.

Za Western blot korišćene su nitrocelulozne membrane (*Hybond ECL Nitrocellulose Membrane*) firme GE Healthcare (Little Chalfont, UK) i PVDF membrane (*Immobilon-P*) firme Milipore (Billerica, MA. USA).

U Western blot analizi korišćena su sledeća primarna antitela:

- ✓ kozije anti-CD39 poliklonalno IgG antitelo (A-16), proizvod Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA);

- ✓ zečiji anti E-NTPDaza 2 serum (BZ3-4F), poklon PhD Jean Sevigny (Department of microbiology, infectious diseases and immunology, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, Canada);
- ✓ zečije anti E-NTPDaza 2 antitelo (KLH5), poklon od PhD Terry Kirley (Department of Pharmacology and Cell Biophysics, University of Cincinnati, USA).

Kao sekundarna antitela korišćena su anti-zečije IgG i anti-kozije IgG antitelo, konjugovana sa peroksidazom iz rena (HRP) nabavljena od firme Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Proteinski markeri, *Protein plus Prestained Ladder* i SDS-pufer za uzorke, *Protein Loading Buffer* je proizvod firme Fermentas (Vilnius, Lithuania).

Za izolaciju RNK korišćen je TRI Reagens, proizvod firme Ambion (Applied Biosystems, EU). Sve hemikalije korišćene za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimeraze (PCR), kao što su *First strand cDNA Syntesis Kit*, *Taq* polimeraza, dNTP, MgCl₂ 10× *TrueStart Taq* pufer i *O`GeneRuler 50 bp DNA Ladder* su nabavljeni od Fermentas (Vilnius, Lithuania). Prajmere za PCR je sintetisala firma Metabion International (Martinsried, Germany).

Rastvori za izolovanje ćelijskih membrana iz uterusu

Fiziološki rastvor (FR): 0.9% rastvor natrijum-hlorida;

Medijum za izolovanje (MI): 0.32 M saharoza u 5mM Tris-HCl puferu pH 7.4;

Pufer za liziranje: 5mM Tris-HCl, pH 7.4;

Rastvori za saharozni gradijent:

- ✓ 0.8 M saharoza, 5mM Tris-HCl pH 7.4;
- ✓ 1.0 M saharoza, 5mM Tris-HCl pH 7.4;
- ✓ 1.2 M saharoza, 5mM Tris-HCl pH 7.4.

Reagensi i rastvori za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Rastvor A: 1 M natrijum-hidroksid

Reagens B: 4% bakar(II)-sulfata

Reagens C: 2% natrijum-karbonat, 1% SDS, 0.16% Na, K-tartarat

Reagens D: 1 mL reagensu B, dopuni se do 100 mL reagensom C

(pravi se neposredno pre upotrebe)

Reagens F: Folin & Ciocalteu's Phenol reagens se razblaži sa biH_2O (v/v 1:1).

Standard: 10 mg/mL BSA

Rastvori za ispitivanje enzimske aktivnosti

1 M Tris-HCl (pH 7.4)

1 M MES-HCl (pH 5.5)

1.9675 M magnezijum-hlorid

20 mM kalcijum-hlorid

20 mM ATP

20 mM ADP

3 M PCA

100 mM natrijum-azid

20 mM natrijum-fluorid

20 mM teofilin

10 mM ouabain

0.025% oligomicin

1 mM natrijum-ortovanadat

40 mM levamisol

10 mM suramin

0.1 M živa(II)-hlorida

0.05 M kadmijuma-hlorid

0.1 M bakar(II)-sulfat

20 mM EDTA

20 mM L-Cys

Rastvori za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije neorganskog fosfata

1-butanol/benzen (v/v 1:1)

1% amonijum-molibdata

0.28 M sumporna kiselina

1.5 M sumporna kiselina

3.4% sumporna kiselina u etanolu

0.5% kalaj-hlorid u 1.5 M sumpornoj kiselini

Standard: 5 mM kalijum-dihidrogen-fosfata

Rastvori za izolovanje RNK i elektroforetsko razdvajanje nukleinskih kiselina na agaroznom gelu

DEPC voda: 0.1% dietilpirokarbonat (v/v)

3 M natrijum-acetat pH 5.0

TBE: 89 mM Tris-borat pH 7.8, 2 mM EDTA

Pufer za uzorke (6×): 0.25% bromofenol plavo u 30% glicerolu

Rastvori za elektroforetsko razdvajanje proteina membranske frakcije na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Rastvor SDS-a: 10% (w/v)

Pufer za koncentrujući gel: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Pufer za razdvajajući gel: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Inicijator polimerizacije: 10% APS (w/v)

SDS-pufer za elektroforezu: 25 mM Tris, 0.192 M glicin, 0.1% SDS, pH 8.3

Rastvori za Western blot:

Pufer za transfer: 25 mM Tris, 0.192 M glicin, 20% metanol, pH 8.3

Ponceau S: 0.1% rastvor u 5% sirćetnoj kiselini

TBS: 20 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl

TBS-T (TBS-Tween 20): 0.1% Tween u TBS puferu

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4

PBS-T (PBS-Tween 20): 0.15% Tween-20 u PBS puferu

4% DAB

8% niki-hlorid

6.2 Instrumenti i oprema

Aparatura za horizontalnu elektroforezu	<i>Mini-Sub cell GT</i> , Bio-Rad, Germany
Aparatura za vertikalnu elektroforezu	Mini PROTEAN, Bio-Rad, Germany
Aparatura za transfer	Mini Trans-blot Transfer Cell, Bio-Rad Germany
Centrifuge / rotori	Beckman J2-21 / JA - 20 Beckman L8-80M / Ti 60 Beckman L5-50B / Sw 41 Eppendorf 5417, Hamburg, Germany Eppendorf MiniSpin plus, Hamburg, Germany
Digitalna vaga	Chyo MK-500C, Japan
UV detekcioni sistem za vizuelizaciju gelova	Gel Doc 1000 system, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules CA, USA
Homogenizeri	Spindler&Hoyer, Gottingen, Germany Ultra Turrex, Ika Werk, Janke & Kunkel, Germany
Instrumenti za disekciju	Allgaler Instrumente, Germany
Ledomat	Icematic D100
Magnetna mešalica	Cimarec 2, USA
MiliQ Sistem	MiliQ Reagent Water System, Millipore, USA
pH Metri	HM-30S, Japan PHS-3BW, China
Spektrofotometri	LKB Ultrospec II Boeco S-22 UV/VIS, Hamburg, Germany NanoDrop 1000, ThermoScientific, Wilmington, USA
PCR aparat	Thermal Cycler, Eppendorf, Hamburg, Germany
Vodeno kupatilo	FMU, Sutjeska, YU
Vortex	Ika Vibra Fix, Germany Maxi Mix II, USA

6.3 Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćene ženke pacova soja Wistar, starosti 2.5-3 meseca, težine 250-300 g. Životinje su uzgajane u vivarijumu Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ pod standardnim laboratorijskim uslovima: temperatura od $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, svetlosni režim 12h svetlo/12h mrak, slobodan pristup hrani i vodi. Pravo na korišćenje životinja u eksperimentalne svrhe tokom izrade doktorske disertacije odobrio je lokalni Etički komitet za upotrebu eksperimentalnih životinja. Svi eksperimenti su izvedeni u saglasnosti sa principima propisanim u publikaciji *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 80-23).

6.4 Priprema tkiva

Životinje su žrtvovane dekapitacijom pomoću giljotine (*Harvard Apparatus*) u periodu između 8 i 10 časova. Izolovani uterusu su očišćeni od masnog tkiva, presečeni uzdužno a endometrijum je sastrugan skalpelom. Tkivo je dobro isprano u FR i zamrznuto na -70°C ili odmah korišćeno za izolovanje ćelijskih membrana.

6.5 Izolovanje ćelijskih membrana iz uterusa pacova

Homogenizacija i sve ostale faze pripreme tkiva rađene su na ledu (4°C). Izolovani uterusu su prvo isitnjeni makazama, a zatim homogenizovani u po 2 mL MI, u staklenim kivetama tipa Correx (1 kiveta sadrži homogenat uterusa tri životinje), na *UltraTurrex* homogenizeru, 3×60 s sa pauzama od 60 s. Dobijenom homogenatu dodato je po 5 mL MI po kiveti i iznova je homogenizovan u teflonskom homogenizeru, 20 zaveslaja na 900 rpm, a nakon toga suspenzija je proceđena kroz trostruku sterilnu gazu, kako bi se odbacilo nehomogenizovano tkivo (Turi and Torok, 1985).

Ćelijske membrane uterusa su izolovane iz homogenata prema modifikovanoj metodi (Krall and Korenman, 1979). Dobijenom homogenatu dodato je još 5 mL MI (do konačne zapremine od 12 mL po epruveti), sadržaj je prebačen u kivete za centrifugu i centrifugiran 10 min na $1000\times g$ (3000 rpm, Beckman J2-21) čime se talože jedra i nehomogenizovano tkivo. Dobijeni supernatant je izdvojen pasterovom pipetom i prebačen u druge kivete, a talog suspendovan u 10 mL MI i centrifugiran još 10 minuta na $1000\times g$. Dobijeni supernatanti su pažljivo odvojeni i spojeni sa prethodnim i smeša je centrifugirana u Beckman J2-21 centrifugi 20 min na $10000\times g$

(9800 rpm). Talog predstavlja frakciju sačinjenu uglavnom od mitohondrija. Supernatant se centrifugira na Beckman L8-80M centrifugi (rotor Ti60) 60 min na $100000\times g$, a dobijeni talog (frakcija neprečišćenih ćelijskih membrana) se rastvori u puferu za liziranje i zaledi na -20°C preko noći. Supernatant nakon ovog centrifugiranja predstavlja citosolnu frakciju i odbacuje se.

Odleđeni lizat se dobro promeša na Vortex-u a potom homogenizuje ručnim homogenizerom sa 10 zaveslaja, i nanese se na diskontinuirani gradijent od 0.8, 1.0 i 1.2 M saharoze, puferisane sa 5 mM Tris-HCl, pH 7.4. Prečišćene ćelijske membrane uterusa dobijaju se centrifugiranjem tokom 2h na $90000\times g$ (23000 rpm), u ultracentrifugi Beckman L5-50B (rotor SW Ti41). Citosol ostaje na vrhu saharoznog gradijenta, a ćelijske membrane se nalazi u interfazi 1.2/1.0 M i 1.0/0.8 M saharoze. Prečišćene ćelijske membrane se suspenduju u oko 20 mL 5 mM Tris-HCl, pH 7.4 i talože u Beckman centrifugi J2-21 (rotor JA-20) 35 min na $15000\times g$ (11000 rpm), čime se ispiraju od saharoze. Dobijeni talog se rastvori u 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, homogenizuje u ručnom homogenizeru i nakon određivanja koncentracije proteina razliva u alikvete i čuva na -70°C . Pre korišćenja, koncentracija proteina u uzorku ćelijskih membrana uterusa se podešava dodavanjem 5 mM Tris-HCl, pH 7.4.

6.6 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je kolorimetrijskom metodom (Lowry et al., 1951) prilagođenom za određivanje membranskih proteina (Markwell et al., 1978). Modifikacija se odnosi na dodavanje SDS-a u alkalni reagens i povećanje koncentracije bakar-tartarata, što omogućava primenu ove metode na uzorke koji sadrže saharozu i EDTA, a to je uobičajeno pri izolovanju subćelijskih (membranskih) frakcija. SDS sprečava i taloženje denaturisanih proteina unutar kivete za merenje, što omogućava merenje većeg broja proba u nizu.

Slepa proba (blank) sadrži 900 μL biH_2O , dok se u ostale epruvete dodaje po 10 μL uzorka i biH_2O do finalne zapremine od 900 μL . U epruvete se zatim dodaje po 100 μL rastvora A, sadržaj se promeša na Vortex-u i inkubira na sobnoj temperaturi 10 min. Nakon toga se dodaje 3 mL rastvora D, opet promeša i ostavi da stoji 20 min. Po isteku ovog vremena, dodaje se 0.3 mL reagensa F, sadržaj se dobro promeša na Vortex-u odmah po dodavanju reagensa i inkubira na sobnoj temperaturi još 45 min, do razvijanja plave boje. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 750

nm. Koncentracija proteina se određuje iz standardne prave, koja se dobija merenjem serije razblaženja od 0.2 do 10 mg BSA/mL.

6.7 Ispitivanje enzimske aktivnosti E-NTPDaze

Metoda za određivanje enzimske aktivnosti E-NTPDaze u preparatu prečišćenih ćelijskih membrana uterusu pacova (uzorak) zasnovana je na modifikovanoj metodi (Seals et al., 1978). Sadržaj inkubacione smeše za određivanje enzimske aktivnosti E-NTPDaza dat je u tabeli 6.1.

Tabela 6.1 Sadržaj smeše za određivanje enzimske aktivnosti E-NTPDaza

	Ukupna zapremina 200 μ L
Tris-HCl pH 7.4 (1 M)	10 μ L
MgCl ₂ (20 mM)	10 μ L
uzorak	7 μ g
miliQ H ₂ O	do 180 μ L
ATP ili ADP (10 mM)	20 μ L

Standardna inkubaciona smeša za ispitivanje aktivnosti enzima E-NTPDaze sadržala je 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM MgCl₂, i odgovarajuću zapreminu miliQ H₂O kako bi finalna zapremina bila 200 μ L. Inkubaciona smeša je preinkubirana 5 min u vodenom kupatilu, na temperaturi od 37°C, a zatim je dodato 7 μ g uzorka. Enzimska reakcija otpočinje dodavanjem 1 mM ATP ili ADP. Prilikom dodavanja svakog od reagenasa, sadržaj epruvete dobro je promućkan na vorteksu. Nakon isteka optimalnog vremena trajanja (10 min), reakcija je zaustavljena dodavanjem 22 μ L hladne 3 M PCA. Epruvete se odmah prebace na led i nakon 15 min se određuje koncentracija oslobođenog neorganskog fosfata, modifikovanom metodom po Pennial-u (Penniall, 1966). U svakom eksperimentu urađena je slepa proba (blank), koja ima isti sastav kao inkubaciona smeša, samo ne sadrži MgCl₂. Nakon dodavanja PCA, u blank je dodata ista količina uzorka kao u ostale epruvete. Na taj način sprečeno je odvijanje enzimske reakcije, a može se izmeriti spontana hidroliza ATP-a ili ADP-a. Svi eksperimenti urađeni su najmanje tri puta u triplikatu, sa ćelijskim membranama iz tri posebna izolovanja. Specifična aktivnost enzima izražena je kao količina oslobođenog neorganskog fosfata po minuti po miligramu proteina (μ mol Pi/min/mg).

U cilju određivanja optimalnih uslova za aktivnost E-NTPDaza u uzorcima, merena je ATPazna i ADPazna aktivnost variranjem: temperature (20-40°C), količine dodatog uzorka (2-50 µg proteina) i vremena trajanja reakcije (0.5-30 min). Uticaj pH na maksimalnu aktivnost E-NTPDaza ispitana je u rasponu pH 5.5-9.0 pri čemu su korišćena dva pufera: MES-HCl (5.5-7.0) i Tris-HCl (7.0-9.0). Zavisnost aktivnosti E-NTPDaza od prisustva dvovalentnih jona ispitana je u reakcionoj smesi bez dodatka dvovalentnih jona, kao i smeši bez dodatih jona u prisustvu 1 mM EDTA. Uticaj dvovalentnih jona na aktivnost E-NTPDaza određen je dodavanjem različitih koncentracija jona magnezijuma ili kalcijuma (0.5, 1.0 i 2.0 mM). Moguća kompeticija u vezivanju za enzim između jona Ca^{2+} i Mg^{2+} ispitana je u inkubacionoj smeši koja je istovremeno sadržala oba jona, koncentracije 1 mM.

6.7.1 Uticaj inhibitora membranskih ATPaza na aktivnost E-NTPDaza

S obzirom da izolovani uzorak iz tkiva uterusa predstavlja frakciju ćelijskih membrana, da bi se procenio doprinos ostalih membranskih ATPaza u hidrolizi ATP i ADP pod datim eksperimentalnim uslovima, korišćeni su sledeći inhibitori: natrijum-azid (inhibitor mitohondrijalnih ATPaza i alkalne fosfataze), oligomicin (inhibitor mitohondrijalnih ATPaza), natrijum-ortovanadat (inhibitor transportnih ATPaza i kiselih i baznih fosfataza), ouabain (specifični inhibitor Na^+/K^+ -ATPaze), teofilin (inhibitor fosfodiesteraza i alkalnih fosfataza), natrijum-fluorid (inhibitor fosfataza), levamisol (specifični inhibitor alkalnih fosfataza), suramin (inhibitor P2 receptora i E-NTPDaza) i EDTA (helirajući agens i inhibitor E-NTPDaza).

6.7.2 Uticaj jona teških i prelaznih metala na aktivnost E-NTPDaza

Aktivnost E-NTPDaza je praćena u standardnoj inkubacionoj smeši (odeljak 6.7) u prisustvu rastućih koncentracija jona žive(II), kadmijuma i bakra(II) (10^{-7} - 10^{-2} M) do postizanja maksimalne inhibicije enzimske aktivnosti. Uzorak (7 µg proteina iz ćelijskih membrana uterusa pacova) je preinkubiran 15 min na 37°C sa odgovarajućom koncentracijom inhibitora. Enzimska reakcija je otpočinjala dodavanjem supstrata (1 mM ATP ili ADP) i trajala je 10 min. Da bi se ispitalo da li je inhibicija E-NTPDaza metalnim jonima reverzibilna, enzimska aktivnost je merena u zavisnosti od vremena preinkubacije uzorka i jona metala (1-40 min).

Mehanizam inhibicije hidrolize ATP i ADP u prisustvu jona žive(II), kadmijuma i bakra(II) ispitan je merenjem aktivnosti enzima u zavisnosti od koncentracije supstrata (0.1-3.0 mM) bez inhibitora (kontrola) i u prisustvu koncentracije jona teških metala koja dovodi do 50% inhibicije enzimske aktivnosti (IC_{50}).

Efekat EDTA, odnosno L-Cys, na inhibiciju aktivnosti E-NTPDaza metalnim jonima ispitan je u standardnoj inkubacionoj smeši (poglavlje 3.7) koja je sadržala 1 mM EDTA ili L-Cys i koncentracije soli $HgCl_2$, $CdCl_2$ ili $CuSO_4$, koje dovode do ~50% inhibicije enzimske aktivnosti (IC_{50}). Efekat sprečavanja inhibicije (*engl. prevention*) enzimske aktivnosti je ispitan tako što je 1 mM EDTA ili L-Cys dodat u inkubacionu smešu pre inkubacije uzorka sa jonima teških metala. Obnavljanje enzimske aktivnosti (*engl. recovery*) praćeno je dodavanjem 1 mM EDTA ili L-Cys nakon 15 minuta preinkubacije uzorka sa jonima teških metala.

6.7.3 Određivanje kinetičkih parametara aktivnosti E-NTPDaza

Afinitet prema supstratu i maksimalna brzina enzimske reakcije ispitivanih E-NTPDaza u ćelijskim membranama uterusa određene su grafički na osnovu Michaelis-Mentenove (MM) krive, koja se dobija nanošenjem vrednosti koncentracija supstrata na apscisu i početne brzine enzimske reakcije V_0 (μmol oslobođenog Pi kao proizvoda enzimske reakcije) na ordinatu koordinatnog sistema. MM grafik ima oblik hiperbole čija je jednačina:

$$\frac{V_0}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Horizontalna asimptota krive (plato) predstavlja maksimalnu brzinu enzimske reakcije (V_{\max}), dok je mera afiniteta enzima prema supstratu data MM konstantom (K_m), koja predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj se postiže polovina V_{\max} . S obzirom da je sa pomenutog grafika nemoguće precizno odrediti parametre enzimske aktivnosti, primenjena je jedna od linearnih transformacija MM jednačine (Eadie, 1952; Hofstee, 1952). Linearizacija po Eadie-Hofstee-u se grafički konstruiše nanošenjem vrednosti $V_0/[S]$ na ordinatu i V_0 na apscisu koordinatnog sistema. V_{\max} predstavlja odsečak na ordinati dok je K_m nagib prave.

$$V_0 = V_{\max} - K_m \frac{V_0}{[S]}$$

S obzirom da enzimi iz familije E-NTPDaza hidrolizuju (najmanje) dva supstrata, odnos početnih brzina hidrolize ATP i ADP predstavlja karakterističnu osobinu svakog člana familije. Početna brzina se može odrediti grafički, iz nagiba tangente povučene iz tačke $t=0$ na hiperbolu ili računski, na osnovu dobijenih kinetičkih parametara K_m i V_{max} . Pri niskim koncentracijama supstrata, kada je $S \ll K_m$, MM jednačina se može napisati kao:

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m} E_0 S$$

Odnos k_{cat}/K_m je prividna konstanta brzine drugog reda i predstavlja meru katalitičke efikasnosti enzima. Za neprečišćene ili delimično prečišćene enzime, prividna $k_{cat}^{(app)}$ se može izračunati deljenjem V_{max} sa zapreminom uzorka enzima. Kako je $V_{max} = k_{cat} E_0$, izraz za početnu brzinu enzimske reakcije se može napisati kao:

$$V_0 = \frac{V_{max}}{K_m} S$$

gde odnos V_{max}/K_m predstavlja konstantu specifičnosti ili katalitičku efikasnost enzima. Na osnovu odnosa konstanti specifičnosti može se uporediti efikasnost enzima prema različitim supstratima u fiziološkim uslovima male zasićenosti supstratom. U slučajevima kada postoji različit stepen kooperativnosti u vezivanju supstrata ($n_H^A \neq n_H^B$), odnos konstanti specifičnosti se može izračunati korišćenjem parametara dobijenih Hill-ovom linearizacijom, n_H i $K_{0.5}$ (Cornish-Bowden and Cardenas, 2010), na osnovu sledeće jednačine:

$$\frac{V_A}{V_B} = \frac{V_{max}^A}{K_{0.5}^{n_H^A}} \cdot \frac{K_{0.5}^{n_H^B}}{V_{max}^B}$$

6.7.3.1 Obrada rezultata uticaja teških metala na aktivnost E-NTPDaza

U eksperimentima u kojima je ispitivan uticaj jona žive(II), kadmijuma i bakra(II) na aktivnost E-NTPDaza, rezultati su predstavljeni semilogaritamskim grafikonomima, nanošenjem vrednosti specifičnih aktivnosti enzima na ordinatu i koncentracije inhibitora na apscisu koordinatnog sistema. Dobijene inhibicione krive su sigmoidalno fitovane. Vrednost IC_{50} , tj. ona koncentracija inhibitora koje izaziva 50% inhibicije enzimske aktivnosti, određena je kao prevojna tačka sigmoide inhibicione krive. Inhibicione krive su dalje obrađene Hill-ovom linearizacijom (Hill, 1910).

Parametri prave fitovane metodom linearne regresije pružaju podatke o Hill-ovom koeficijentu i vrednosti IC_{50} , na osnovu jednačine:

$$\log\left(\frac{V_0}{V_{\max}-V_0}\right) = \log K_i - n_H \log[I]$$

Na apscisu se nanose vrednosti $\log[I]$, a na ordinatu vrednosti $\log(V_0/V_{\max}-V_0)$. Nagib prave „ n_H “ predstavlja zbirni teorijski broj vezujućih mesta i njihov afinitet za ligand po molekulu enzima. Vrednost $n_H=1$ ukazuje na postojanje jednog mesta za vezivanje liganda za molekul enzima, odnosno na nepostojanje kooperativnosti ukoliko postoji više mesta vezivanja. Vrednost $n_H<1$ ukazuje na postojanje više mesta vezivanja sa različitim afinitetom za ligand ili negativne kooperativnosti u vezivanju liganda. Vrednost $n_H>1$ ukazuje da se ligand pozitivno kooperativno vezuje za enzim. Kada je inhibicija enzimske aktivnosti 50%, $\log(V_0/V_{\max}-V_0)$ je jednak nuli, a vrednost $\log[IC_{50}]$ se može očitati na preseku prave sa x-osom.

Za određivanje tipa inhibicije, kinetičkih parametara i konstanti disocijacije enzim-inhibitor kompleksa (K_i), korišćena je linearizacija po Lineweaver-Burk-u (Lineweaver and Burk, 1934). Lineweaver-Burk-ovu linearizacija se grafički dobija nanošenjem recipročnih vrednosti supstrata na apscisu i recipročnih vrednosti brzine na ordinatu koordinatnog sistema, bez i u prisustvu inhibitora.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

U tabeli 6.2 dati su različiti tipovi reverzibilne inhibicije, sa odgovarajućim izrazima za konstante ravnoteže (K_i) i brzinu enzimske reakcije (V).

Tabela 6.2 Različiti tipovi reverzibilne inhibicije

kompetitivna	$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$	$V = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + [S]}$	$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$
nekompetitivna	$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$	$V = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + \alpha [S]}$	$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$
akompetitivna	$K_i' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$	$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + \alpha' [S]}$	$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'}$
mešovita	$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$ $K_i' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$	$V = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]}$	$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$ $\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'}$

Kod kompetitivne inhibicije, supstrat i inhibitor se nadmeću oko istog mesta vezivanja i ne mogu se istovremeno vezati za enzim. Inhibitor se vezuje za enzim formirajući nereaktivni kompleks [EI] sa konstantom ravnoteže K_i . Vrednost V_{max} se ne menja dok se K_m povećava za faktor α , tako da izgleda kao da je smanjen afinitet enzima za supstrat. Prave na dijagramu, dobijene LB linearizacijom, seku se na y-osi.

Nekompetitivni inhibitor ne utiče na vezivanje supstrata i ne vezuje za aktivni centar enzima već za neke druge hemijske grupe važne za enzimsku aktivnost. Inhibitor se vezuje i za slobodan enzim [E] i za kompleks enzim-supstrat [ES], sa konstantom ravnoteže K_i (tabela 6.1). U prisustvu nekompetitivnog inhibitora ne dolazi do promene K_m već se V_{max} smanjuje za faktor α . Dobijene prave na LB dijagramu seku se na x-osi.

Kod akompetitivne inhibicije inhibitor se vezuje samo za kompleks [ES], ali ne i za slobodan enzim [E], formirajući nereaktivni kompleks [ESI] sa konstantom ravnoteže K_i' . Vrednosti K_m i V_{max} smanjuju se za faktor α' , dok odnos K_m/V_{max} ostaje nepromenjen. Dobijene prave na LB dijagramu su paralelne.

Mešoviti inhibitor se, poput nekompetitivnog, vezuje za slobodan enzim [E] i za kompleks enzim-supstrat [ES], pri čemu konstante (K_i i K_i') ova dva kompleksa nisu iste. Mešovita inhibicija utiče i na K_m i na V_{max} , pri čemu se V_{max} smanjuje za faktor α' , dok se K_m povećava ili smanjuje za odnos α'/α . Prave dobijene LB linearizacijom, seku se ispod ili iznad x-ose.

Za izračunavanje koncentracija slobodnih jona i kompleksa koji nastaju u interakciji između dvovalentnih jona, supstrata, EDTA i L-Cys, korišćen je program JONCONC (Institut za nuklearne nauke Vinča). U tabeli 6.3 su dat su literaturni podaci za konstante stabilnosti kompleksa (Storer and Cornish-Bowden, 1976; Sillen and Martell, 1971).

Tabela 6.3 Konstante stabilnosti kompleksa dvovalentnih jona (Mg^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} i Cu^{2+}) sa ATP, ADP, EDTA i L-Cys

	logK			
	ATP	ADP	EDTA	L-Cys
Mg^{2+}	4.54	3.20	8.69	4
Hg^{2+}	-	-	21,8	14.4
Cd^{2+}	4.55	3.58	16,4	10.3
Cu^{2+}	6.13	5.90	18.8	19.2

6.8 Određivanje koncentracije neorganskog fosfata

Metoda za određivanje aktivnosti E-NTPDaza zasniva se na kolorimetrijskom određivanju količine oslobođenog neorganskog fosfata (Pi), kao proizvoda enzimske hidrolize ATP i ADP-a (Penniall, 1966). U osnovi metode je reakcija između Pi, amonijum-molibdata i kalaj-hlorida u kiseloj sredini, pri čemu kao proizvod reakcije nastaje kalaj-fosfomolibdatni kompleks plave boje.

Nakon završenog enzimskog esej, u epruvete se dodaje po 3 mL smeše n-butanol-benzena, 0.5 mL 1% amonijum-molibdata i 0.5 mL 0.28 M H₂SO₄. Svaka epruveta se vorteksuje po 30 s kako bi se omogućila ekstrakcija oslobođenog neorganskog fosfata iz vodene u organsku fazu. Epruvete se zatim inkubiraju na sobnoj temperaturi, 45 min; to je vreme potrebno da bi se razdvojili vodeni i organski sloj. Po isteku tog vremena, uzima se po 1 mL organskog sloja iz svake epruvete i prebacuje u čiste epruvete, gde se dodaje 4 mL 3.4% H₂SO₄ u etanolu i 0.5 mL SnCl₂ u 1.5 M H₂SO₄. Svaka se epruveta blago promeša na Vortex-u i inkubira 45 min na sobnoj temperaturi do razvijanja boje. ApSORBANCA je merena na talasnoj dužini od 700 nm. Koncentracija Pi određuje iz standardne prave, koja se dobija merenjem serije razblaženja od 0.125 do 5 mM (0.025-1 μmol) KH₂PO₄.

6.9 RT-PCR

6.9.1 Izolovanje i određivanje RNK

Ukupna RNK iz uterusa je izolovana po delimično modifikovanoj metodi koja se zasniva na ekstrakciji guanidinium tiocijanata/fenol/hloroformom (Chomczynski and Sacchi, 1987). Postupak izolovanja se sastoji iz nekoliko koraka:

Homogenizacija – tkivu koje je prethodno zamrznuto u tečnom azotu, dodat je TRI Reagens (1 mL na 100 mg tkiva). Uzorak je homogenizovan u ručnom homogenizeru teflon-staklo na ledu.

Razdvajanje faza - Homogenat je centrifugiran na 12000×g, 10 min na 4°C (11900 rpm). Supernatant je inkubiran 5 minuta na 30°C, a zatim je dodato 0.2 mL hloroforma na 1 mL supernatanta. Uzorci su snažno ručno promućkani 15 s, inkubirani 5 min na 30°C i zatim centrifugirani na 12000×g 10 min na 4°C. Vodena (gornja) faza je pažljivo odvojena i dodat je 3 M Na-acetat pH 5.0, u odnosu 1:10.

Taloženje RNK – Nakon što je ručno promućkan 15 s, uzorku su dodate dve zapremine 96% etanola. Uzorak je ostavljen preko noći na -20°C da se RNK istaloži.

Ispiranje RNK - Sutradan je izolovani uzorak odmrznut i centrifugiran na $12000\times g$, 10 min na 4°C , supernatant je odbačen, a talog je ispran 75% etanola u DEPC tretiranoj vodi. Nakon kratkog centrifugiranja (3-5 min) na $12000\times g$, etanol je odliven, a talog osušen na sobnoj temperaturi. Izolovana RNK je rastvorena u DEPC vodi (100 μL na 1 mL TRI Reagensa) i ostavljena preko noći na -20°C . Sutradan je određena koncentracija, čistoća i kvalitet izolovane RNK.

Sadržaj RNA je spektrofotometrijski određen merenjem absorbance na talasnoj dužini od 260 nm, direktnim nanošenjem 2 μL uzorka na aparat NanoDrop 1000. Čistoća izolovane RNK procenjena je merenjem odnosa absorbanci na talasnim dužinama od 260 i 280 nm. Kvalitet izolovanih molekula RNK proveren je elektroforetskim razdvajanjem na 2% TBE agaroznom gelu, Uzorak za elektroforezu je pripremljen tako što je 3 μg ukupnih RNK razblaženo DEPC vodom do 10 μL i dodato je 2 μL $6\times$ pufera za uzorke. Ukupna izolovana RNK je podeljena u alikvote koji su čuvani do upotrebe na -70°C .

6.9.2 Reverzna transkripcija ukupnih RNK

U reakciji reverzne transkripcije, na osnovu RNK molekula kao matrice, sintetiše se komplementarni lanac molekula DNK (*eng. complementary DNA – cDNA*). Za sintezu cDNK iz izolovane RNK korišćen je komercijalni *First strand cDNA Synthesis Kit*, prema uputstvu proizvođača (*Fermentas*). Sadržaj smeše za reakciju reverzne transkripcije dat je u tabeli 6.4.

Tabela 6.4 Sadržaj smeše za reakciju reverzne transkripcije

	Ukupna zapremina 20 μL
Izolovana RNK	2.5 μg
<i>Random hexamer</i> prajmer	1 μL
Dejonizovana voda	do 11 μL
$5\times$ reakcioni pufer	4 μL
Inhibitor ribonukleaze <i>Ribolock</i> (20 U/ μL)	1 μL
dNTP miks (10 mM)	2 μL
MMuLV reverzna transkriptaza (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2 μL

Odgovarajuća zapremina ukupne RNK (2.5 µg) i 1 µL *random hexamer* prajmera se dopune dejonizovanom vodom do ukupne zapremine od 11 µL i inkubira na 70°C, 5 min. Smeša se ohladi na ledu i kratko centrifugira. Zatim se dodaju sledeće komponente: 5× reakcioni puffer, inhibitor ribonukleaze i dNTP miks, blago promeša i kratko centrifugira. Reakciona smeša se inkubira na 25°C, 5 min, doda se MMuLV reverzna transkriptaza i inkubiranje se nastavi na 25°C, 5 min, a zatim na 37°C, 60 min. Reakcija je zaustavljena zagrevanjem uzorka na 70°C, 10 min i potom hlađenjem na ledu. Ovako dobijena cDNK je odmah korišćena za reakciju lančanog umnožavanja ili je zamrznuta na -20°C do upotrebe. U negativne kontrole dodata je dejonizovana voda umesto RNK, a pozitivne kontrole su sadržale RNK iz jetre (za E-NTPDazu 8) i kore mozga pacova (za E-NTPDazu 1, 2 i 3).

6.9.3 Reakcija lančanog umnožavanja cDNK (PCR analiza)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) zasniva se na seriji lančanih reakcija kojima se umnožava ciljna sekvenca na DNK (Saiki et al., 1988). Proces umnožavanja se izvodi u seriji cikličnih izmena temperatura čime se obezbeđuje denaturacija molekula DNK, hibridizacija amplimera sa matricom i njegova elongacija. Za uspešno umnožavanje svake ciljne sekvence moraju se optimizovati uslovi, kao što su temperatura hibridizacije prajmera (*engl. annealing*), koncentracije MgCl₂, prajmera, cDNK i ukupni broj ciklusa umnožavanja (Kramer and Coen, 2001). Za određivanje genske ekspresije različitih E-NTPDaza korišćena je reakcija lančanog umnožavanja cDNK upotrebom specifičnih prajmera za gene pacova Entpd 1, 2, 3 i 8 (Furstenau et al., 2010). Sadržaj PCR smeše dat je u tabeli 6.5.

Tabela 6.5 Sadržaj smeše za lančanu reakciju polimeraze

Ukupna zapremina 25 µL	
10x TrueStart Taq pufer	2.5 µL
dNTP miks (10 mM)	0.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2.1 µL
Taq Polimeraza (5 U/µL)	0.2 µL
Uzvodni prajmer (6.25 µM)	1 µL
Nizvodni prajmer (6.25 µM)	1 µL
cDNK (200 ng)	2 µL
Dejonizovana voda	15.7 µL

Uslovi za amplifikaciju (tabela 6.6) i sekvence za gene pacova Entpd1, 2, 3, 8 i Gapdh sa optimalnim temperaturama za hibridizaciju prajmera i dužinom produkata amplifikacije prikazani su tabelarno (tabela 6.7). Uzvodni prajmeri obeleženi su sa F (*eng. forward*), a nizvodni prajmeri sa R (*eng. reverse*).

Tabela 6.6 Uslovi za amplifikaciju

Korak	Temperatura (°C)	Vreme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	1	
Denaturacija	94	1	
Hibridizacija prajmera	zavisno od prajmera	1	30
Elongacija prajmera	72	1	
Finalna elongacija	72	10	

Tabela 6.7 Sekvence prajmera, optimalne temperature za hibridizaciju i dužina produkata amplifikacije za gene pacova Entpd1, 2, 3, 8 i Gapdh

gen	sekvencija prajmera	T(°C)	bp
Entpd1 (CD39)	F 5'-GATCATCACTGGGCAGGAGGAAGG-3'	65	543
	R 5'-AAGACACCGTTGAAGGCACACTGG-3'		
Entpd2	F 5'-GCTGGGTGGGCCCGGTGGATACG-3'	66	331
	R 5'-ATTGAAGGCCCGGGACGCTGAC-3'		
Entpd3 (CD39L3)	F 5'-CGGGATCCTTGCTGTGCGTGGCATTCTT-3'	65	267
	R 5'-TCTAGAGGTGCTCTGGCAGGAATCAGT-3'		
Entpd8	F 5'-CCACACTGTCACTGGCTTCCTTG-3'	65	394
	R 5'-ACGAGGATGTATAGGCCTGAGG-3'		
Gapdh	F 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3'	58	308
	R 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'		

Produkti PCR reakcije su razdvojeni horizontalnom elektroforezom na 1.5% agaroznom gelu koji je sadržao etidijum bromid (0.5 µg/mL) (Aaij and Borst, 1972). Uzorci DNK su pomešani sa 6× bojom za uzorke u odnosu 5:1 i naneti na gel. Kao molekularni marker korišćen je *O`GeneRuler 50bp DNA Ladder* (2.5 µL). Elektroforeza je trajala 30 minuta, pri konstantnom naponu od 100 V. Gelovi su zatim snimljeni pod UV svetlom u aparatu GelDoc 1000.

6.10 Elektroforetsko razdvajanje proteina i Western blot analiza

Proteini iz ćelijskih membrana uterusa razdvojeni su elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (Laemmli, 1970). Poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) zasniva se na denaturaciji proteina u linearne polipeptidne lance uz pomoć anjonskog detergenta SDS-a i na njihovom razdvajanju prema molekulskim masama.

6.10.1 Priprema uzoraka

Za pripremu uzoraka korišćen je 5× pufer za obradu uzoraka - *Protein Loading Buffer*. U uzorke za detekciju proteina u redukujućim uslovima, dodato je 2-5 µL β-ME. Svi uzorci su prokuvani 5 min na 100°C.

6.10.2 Elektroforeza na SDS - poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Poliakrilamidni gelovi odgovarajućeg stepena polimerizacije napravljeni su na način prikazan u tabeli 6.8. Na gel je nanošeno 10, 20 ili 40 µg proteina. Elektroforeza je trajala 2 h na konstantnom naponu od 100 V. Kao molekulski marker korišćen je *ProteinPlus Prestained Ladder*.

Tabela 6.8 Sastav gelova za SDS PAGE elektroforezu

Gel za koncentrovanje (<i>engl. stacking gel</i>)		Gel za razdvajanje (<i>engl. running gel</i>)	
5% poliakrilamidni gel, pH 6.8 (2 mL/1 gel)		8% poliakrilamidni gel, pH 8.8, (5mL/1 gel)	
destilovana voda	1.4 mL	destilovana voda	2.3 mL
0.5 M Tris, pH 6.8	0.25 mL	1.5 M Tris, pH 8.8	1.3 mL
10% SDS	20 µL	10% SDS	50 µL
30% AA-bis	0.33 mL	30% AA-bis	1.3 mL
10% APS	20 µL	10% APS	50 µL
TEMED	2 µL	TEMED	3 µL

6.10.3 Western blot

Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su elektrotransferom prebačeni na nitroceluloznu ili PVDF membranu (Burnette, 1981). PVDF membrana je prethodno aktivirana potapanjem u 100% metanol 15 s, zatim 2 min u miliQ H₂O i na kraju najmanje 5 min u puferu za transfer. Transfer je trajao 2 h, pri konstantnoj naponu od 75 V. Po završenom transferu membrane su isprane 5 min sa miliQ H₂O i bojene

rastvorom Ponceau S 15 s. Na ovaj način se proverava da li je transfer bio uspešan a količina proteina ujednačena. Boja se ispira prvo vodom, a zatim TBS-T.

Membrane su inkubirane u odgovarajućem puferu za blokiranje, kako bi se umanjilo nespecifično vezivanje antitela, a zatim su isprane 3×10 min u TBS-T (ili PBS-T) i inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelom (tabela 6.9).

Tabela 6.9 Primarna i sekundarna antitela korišćena u Western blot analizi

Primarna antitela			
	anti-CD39 At (G-16)	anti E-NTPDaze2 At (BZ-34F)	anti E-NTPDaza2 At (KLH5)
Uslovi pripreme uzoraka	redukujući	neredukujući	neredukujući
Pufer za blokiranje	5% BSA u TBS	2.5% nemasno mleko u PBS-T	2.5% nemasno mleko u PBS-T
Vreme inkubacije	45 min	1h na sobnoj T ili preko noći na +4C	1h na sobnoj T ili preko noći na +4C
Razblaženje	1:2000	1:1000	1:500
Pufer	TBST	2.5% nemasno mleko u PBS-T,	2.5% nemasno mleko u PBS-T,
Vreme inkubacije	preko noći na +4°C	1.5 h na sobnoj T	1.5 h na sobnoj T
Sekundarna antitela			
	anti-kozije IgG-HRP (sc-2020)	anti-zečije IgG-HRP (sc-2030)	anti-zečije IgG-HRP (sc-2030)
Razblaženje	1:7500	1:5000	1:5000
Pufer	TBS-T	0.5% nemasno mleko u PBS-T	PBS-T
Vreme inkubacije	2h	1 h	1 h

Nakon ispiranja u TBS-T ili PBS-T, 5×10 min, membrane se inkubiraju 1.5 h u sekundarnim antitelima konjugovanim sa HRP, a potom ponovo ispiraju u TBS-T ili PBS-T (3×15 min). Za vizuelizaciju specifičnih traka primenjeno je bojenje DAB metodom. Pre bojenja membrane se potope 5 min u 100 mM Tris HCl pH 7.5. Reagens za bojenje dobija se mešanjem 5 mL 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 µL rastvora NiCl₂, 1.5 µL 3% H₂O₂ i 100 µL rastvora DAB. Bojenje membrana traje par minuta u mraku, nakon čega se ispiraju biH₂O.

6.11 Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata urađena je na rezultatima najmanje tri nezavisna eksperimenta rađena u triplikatu.

Za statističku analizu korišćen je program Origin 6.1 (OriginLab, Northampton, MA, USA). Određena je srednja vrednost, standardna devijacija i statistička greška. Statistička značajnost je određena jednofaktorskom analizom varijanse (*one way ANOVA*), sa nivoom značajnosti: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Rezultati su prikazani na graficima ili histogramima, sa standardnom greškom i nivoima značajnosti.

7 LITERATURA

1. Acuna-Castillo, C., Coddou, C., Bull, P., Brito, J., and Huidobro-Toro, J. P. (2007) Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X7 purinergic receptor, *J. Neurochem.* 101, 17-26.
2. Agteresch, H. J., Dagnelie, P. C., van den Berg, J. W., and Wilson, J. H. (1999) Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications, *Drugs* 58, 211-232.
3. Aguilar, H. N., and Mitchell, B. F. (2010) Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility, *Hum. Reprod. Update* 16, 725-744.
4. Ahn, H. J., Yang, H., An, B. S., Choi, K. C., and Jeung, E. B. (2011) Expression and regulation of Enpp2 in rat uterus during the estrous cycle, *J Vet Sci* 12, 379-385.
5. Aitken, H., Poyser, N. L., and Hollingsworth, M. (2001) The effects of P2Y receptor agonists and adenosine on prostaglandin production by the guinea-pig uterus, *Br J Pharmacol* 132, 709-721.
6. Aliagas, E., Torrejon-Escribano, B., Lavoie, E. G., de Aranda, I. G., Sevigny, J., Solsona, C., and Martin-Satue, M. (2010) Changes in expression and activity levels of ecto-5'-nucleotidase/CD73 along the mouse female estrous cycle, *Acta Physiol (Oxf)* 199, 191-197.
7. Aliagas, E., Vidal, A., Torrejon-Escribano, B., Taco Mdel, R., Ponce, J., de Aranda, I. G., Sevigny, J., Condom, E., and Martin-Satue, M. (2013) Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium, *Purinergic Signal* 9, 227-237.
8. Bakker, W. W., Donker, R. B., Timmer, A., van Pampus, M. G., van Son, W. J., Aarnoudse, J. G., van Goor, H., Niezen-Koning, K. E., Navis, G., Borghuis, T., Jongman, R. M., and Faas, M. M. (2007) Plasma hemopexin activity in pregnancy and preeclampsia, *Hypertens Pregnancy* 26, 227-239.
9. Bansode, F. W., Chauhan, S. C., Makker, A., and Singh, M. M. (1998) Uterine luminal epithelial alkaline phosphatase activity and pinopod

- development in relation to endometrial sensitivity in the rat, *Contraception* 58, 61-68.
10. Barcellos, C. K., Schetinger, M. R., Battastini, A. M., Silva, L. B., Dias, R. D., and Sarkis, J. J. (1994) Inhibitory effect of cadmium acetate on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5; apyrase) from adult rat cerebral cortex, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 1111-1115.
 11. Bardini, M., Lee, H. Y., and Burnstock, G. (2000) Distribution of P2X receptor subtypes in the rat female reproductive tract at late pro-oestrus/early oestrus, *Cell Tissue Res* 299, 105-113.
 12. Battastini, A. M., Oliveira, E. M., Moreira, C. M., Bonan, C. D., Sarkis, J. J., and Dias, R. D. (1995) Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes, *Biochem Mol Biol Int* 37, 209-219.
 13. Belcher, S. M., Zsarnovszky, A., Crawford, P. A., Hemani, H., Spurling, L., and Kirley, T. L. (2006) Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors, *Neuroscience* 137, 1331-1346.
 14. Beukers, M. W., Kerkhof, C. J., van Rhee, M. A., Ardanuy, U., Gurgel, C., Widjaja, H., Nickel, P., AP, I. J., and Soudijn, W. (1995) Suramin analogs, divalent cations and ATP gamma S as inhibitors of ecto-ATPase, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 351, 523-528.
 15. Blackburn, M. R., Gao, X., Airhart, M. J., Skalko, R. G., Thompson, L. F., and Knudsen, T. B. (1992) Adenosine levels in the postimplantation mouse uterus: quantitation by HPLC-fluorometric detection and spatiotemporal regulation by 5'-nucleotidase and adenosine deaminase, *Dev Dyn* 194, 155-168.
 16. Boeck, C. R., Sarkis, J. J., and Vendite, D. (2002) Kinetic characterization and immunodetection of ecto-ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in cultured hippocampal neurons, *Neurochem Int* 40, 449-453.
 17. Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., and Dagnelie, P. C. (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous

- signaling molecules in immunity and inflammation, *Pharmacol Ther* 112, 358-404.
18. Braun, N., Fengler, S., Ebeling, C., Servos, J., and Zimmermann, H. (2000) Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family, *Biochem J* 351 Pt 3, 639-647.
 19. Braun, N., Sevigny, J., Mishra, S. K., Robson, S. C., Barth, S. W., Gerstberger, R., Hammer, K., and Zimmermann, H. (2003) Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain, *Eur J Neurosci* 17, 1355-1364.
 20. Bucci, M., and Murphy, C. R. (1999) Differential alterations in the distribution of three phosphatase enzymes during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells in the rat, *Cell Biol Int* 23, 21-30.
 21. Buffon, A., Ribeiro, V. B., Wink, M. R., Casali, E. A., and Sarkis, J. J. (2007) Nucleotide metabolizing ecto-enzymes in Walker 256 tumor cells: molecular identification, kinetic characterization and biochemical properties, *Life Sci* 80, 950-958.
 22. Burnstock, G. (1972) Purinergic nerves, *Pharmacol Rev* 24, 509-581.
 23. Burnstock, G. (2006a) Purinergic signalling, *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S172-181.
 24. Burnstock, G. (1976) Purinergic receptors, *J Theor Biol* 62, 491-503.
 25. Burnstock, G. (2007) Purine and pyrimidine receptors, *Cell Mol Life Sci* 64, 1471-1483.
 26. Burnstock, G. (2014) Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease, *Purinergic Signal* 10, 157-187.
 27. Burnstock, G. (2006b) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling, *Pharmacol Rev* 58, 58-86.
 28. Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D., and Smythe, A. (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut, *Br. J. Pharmacol.* 40, 668-688.

29. Burnstock, G., and Verkhatsky, A. (2009) Evolutionary origins of the purinergic signalling system, *Acta Physiol (Oxf)* 195, 415-447.
30. Buxton, I. L. (2004) Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation, *Mol Pharmacol* 65, 1051-1059.
31. Byrne, C., Divekar, S. D., Storchan, G. B., Parodi, D. A., and Martin, M. B. (2009) Cadmium--a metallohormone?, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 266-271.
32. Carageorgiou, H., Tzotzes, V., Pantos, C., Mourouzis, C., Zarros, A., and Tsakiris, S. (2004) In vivo and in vitro effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities: protection by L-cysteine, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 94, 112-118.
33. Carfagna, M. A., Ponsler, G. D., and Muhoberac, B. B. (1996) Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals, *Chem. Biol. Interact.* 100, 53-65.
34. Carrera, F., Proverbio, T., Marin, R., and Proverbio, F. (2000) Ca-ATPase of human myometrium plasma membranes, *Physiol Res* 49, 331-338.
35. Casali, E. A., da Silva, T. R., Gelain, D. P., Kaiser, G. R., Battastini, A. M., Sarkis, J. J., and Bernard, E. A. (2001) Ectonucleotidase activities in Sertoli cells from immature rats, *Braz J Med Biol Res* 34, 1247-1256.
36. Chan, H. C., Liu, C. Q., Fong, S. K., Law, S. H., Wu, L. J., So, E., Chung, Y. W., Ko, W. H., and Wong, P. Y. (1997) Regulation of Cl⁻ secretion by extracellular ATP in cultured mouse endometrial epithelium, *J Membr Biol* 156, 45-52.
37. Chang, S. J., Tzeng, C. R., Lee, Y. H., and Tai, C. J. (2008) Extracellular ATP activates the PLC/PKC/ERK signaling pathway through the P2Y2 purinergic receptor leading to the induction of early growth response 1 expression and the inhibition of viability in human endometrial stromal cells, *Cell Signal* 20, 1248-1255.
38. Chang, S. J., Wang, T. Y., Lee, Y. H., and Tai, C. J. (2007) Extracellular ATP activates nuclear translocation of ERK1/2 leading to the induction of

- matrix metalloproteinases expression in human endometrial stromal cells, *J Endocrinol* 193, 393-404.
39. Chen, W., and Guidotti, G. (2001) The metal coordination of sCD39 during ATP hydrolysis, *BMC Biochem* 2, 9.
40. Chevillard, C., Cardenas, M. L., and Cornish-Bowden, A. (1993) The competition plot: a simple test of whether two reactions occur at the same active site, *Biochem J* 289 (Pt 2), 599-604.
41. Chiang, W. C., and Knowles, A. F. (2008) Transmembrane domain interactions affect the stability of the extracellular domain of the human NTPDase 2, *Arch Biochem Biophys* 472, 89-99.
42. Christoforidis, S., Papamarcaki, T., Galaris, D., Kellner, R., and Tsolas, O. (1995) Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase, *Eur J Biochem* 234, 66-74.
43. Chung, M. K., Baek, S. S., Lee, S. H., Kim, H., Choi, K., and Kim, J. C. (2009) Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicities of copper monochloride in rats, *Environ Toxicol* 24, 315-326.
44. Coddou, C., Codocedo, J. F., Li, S., Lillo, J. G., Acuna-Castillo, C., Bull, P., Stojilkovic, S. S., and Huidobro-Toro, J. P. (2009) Reactive oxygen species potentiate the P2X2 receptor activity through intracellular Cys430, *J. Neurosci.* 29, 12284-12291.
45. Coddou, C., Lorca, R. A., Acuna-Castillo, C., Grauso, M., Rassendren, F., and Huidobro-Toro, J. P. (2005) Heavy metals modulate the activity of the purinergic P2X4 receptor, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202, 121-131.
46. Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., and Stojilkovic, S. S. (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels, *Pharmacol. Rev.* 63, 641-683.
47. Čolovic, M. B., Bajuk-Bogdanovic, D. V., Avramovic, N. S., Holclajtner-Antunovic, I. D., Bosnjakovic-Pavlovic, N. S., Vasic, V. M., and Krstic, D. Z. (2011) Inhibition of rat synaptic membrane Na⁺/K⁺-ATPase and ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases by 12-tungstosilicic and 12-tungstophosphoric acid, *Bioorg Med Chem* 19, 7063-7069.

48. Cornish-Bowden, A., and Cardenas, M. L. (2010) Specificity of non-Michaelis-Menten enzymes: necessary information for analyzing metabolic pathways, *J Phys Chem B* 114, 16209-16213.
49. Corti, F., Olson, K. E., Marcus, A. J., and Levi, R. (2011) The expression level of ecto-NTP diphosphohydrolase1/CD39 modulates exocytotic and ischemic release of neurotransmitters in a cellular model of sympathetic neurons, *J Pharmacol Exp Ther* 337, 524-532.
50. Cote, Y. P., Ouellet, S., and Beaudoin, A. R. (1992) Kinetic properties of type-II ATP diphosphohydrolase from the tunica media of the bovine aorta, *Biochim Biophys Acta* 1160, 246-250.
51. Critchley, H. O., Kelly, R. W., Brenner, R. M., and Baird, D. T. (2001) The endocrinology of menstruation--a role for the immune system, *Clin Endocrinol (Oxf)* 55, 701-710.
52. Cunha, R. A. (2001) Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals, *Neurochem Res* 26, 979-991.
53. Danscher, G., Horsted-Bindslev, P., and Rungby, J. (1990) Traces of mercury in organs from primates with amalgam fillings, *Exp. Mol. Pathol.* 52, 291-299.
54. Danylovyh, H. V., and Kosterin, S. O. (2004) Kinetic regularities of the proceeding and possible reaction mechanism of Mg^{2+} -dependent enzymatic hydrolysis of ATP in the fraction of plasmatic membranes of the smooth muscle, *Ukr. Biokhim. Zh.* 76, 142-150.
55. Darbre, P. D. (2006) Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast, *J. Appl. Toxicol.* 26, 191-197.
56. Davis, B. J., Price, H. C., O'Connor, R. W., Fernando, R., Rowland, A. S., and Morgan, D. L. (2001) Mercury vapor and female reproductive toxicity, *Toxicol. Sci.* 59, 291-296.
57. de Souza Dahm, K. C., Ruckert, C., Tonial, E. M., and Bonan, C. D. (2006) In vitro exposure of heavy metals on nucleotidase and cholinesterase activities from the digestive gland of *Helix aspersa*, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 143, 316-320.

58. Demenis, M. A., Furriel, R. P., and Leone, F. A. (2003) Characterization of an ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 activity in alkaline phosphatase-depleted rat osseous plate membranes: possible functional involvement in the calcification process, *Biochim. Biophys. Acta* 1646, 216-225.
59. Di Virgilio, F. (2000) Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP, *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 59-63.
60. Drury, A. N., and Szent-Gyorgyi, A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart, *J Physiol* 68, 213-237.
61. Escalada, A., Navarro, P., Ros, E., Aleu, J., Solsona, C., and Martin-Satue, M. (2004) Gadolinium inhibition of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in Torpedo electric organ, *Neurochem. Res.* 29, 1711-1714.
62. Escudero, C., and Sobrevia, L. (2008) A hypothesis for preeclampsia: adenosine and inducible nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelium, *Placenta* 29, 469-483.
63. Faas, M. M., van der Schaaf, G., Borghuis, T., Jongman, R. M., van Pampus, M. G., de Vos, P., van Goor, H., and Bakker, W. W. (2010) Extracellular ATP induces albuminuria in pregnant rats, *Nephrol Dial Transplant* 25, 2468-2478.
64. Fernley, H. N., and Walker, P. G. (1970) Inhibition of alkaline phosphatase by L-phenylalanine, *Biochem J* 116, 543-544.
65. Filippini, A., Riccioli, A., De Cesaris, P., Paniccia, R., Teti, A., Stefanini, M., Conti, M., and Ziparo, E. (1994) Activation of inositol phospholipid turnover and calcium signaling in rat Sertoli cells by P2-purinergic receptors: modulation of follicle-stimulating hormone responses, *Endocrinology* 134, 1537-1545.
66. Foresta, C., Rossato, M., Nogara, A., Gottardello, F., Bordon, P., and Di Virgilio, F. (1996) Role of P2-purinergic receptors in rat Leydig cell steroidogenesis, *Biochem J* 320 (Pt 2), 499-504.

67. Fraser, L. R. (2010) The "switching on" of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation, *Mol Reprod Dev* 77, 197-208.
68. Frassetto, S. S., Dias, R. D., and Sarkis, J. J. (1995) Inhibition and kinetic alterations by excess free ATP and ADP of the ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets, *Biochem Mol Biol Int* 35, 499-506.
69. Frieberg L, Piscator M, Nordberg GF, and T, K. (1974) *Cadmium in the environment* CRC Press, Cleveland.
70. Furstenau, C. R., Ramos, D. B., Vuaden, F. C., Casali, E. A., Monteiro Pde, S., Trentin Dda, S., Gossenheimer, A. N., Bogo, M. R., Bonan, C. D., Barreto-Chaves, M. L., Sarkis, J. J., and Wofchuk, S. T. (2010) L-NAME-treatment alters ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats, *Life Sci.* 87, 325-332.
71. Gendron, F. P., Benrezzak, O., Krugh, B. W., Kong, Q., Weisman, G. A., and Beaudoin, A. R. (2002) Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition, *Curr Drug Targets* 3, 229-245.
72. Gerhard, I., Monga, B., Waldbrenner, A., and Runnebaum, B. (1998a) Heavy metals and fertility, *J Toxicol Environ Health A* 54, 593-611.
73. Gerhard, I., Waibel, S., Daniel, V., and Runnebaum, B. (1998b) Impact of heavy metals on hormonal and immunological factors in women with repeated miscarriages, *Hum. Reprod. Update* 4, 301-309.
74. Gillman, T. A., and Pennefather, J. N. (1998) Evidence for the presence of both P1 and P2 purinoceptors in the rat myometrium, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25, 592-599.
75. Glass, R., Bardini, M., Robson, T., and Burnstock, G. (2001) Expression of nucleotide P2X receptor subtypes during spermatogenesis in the adult rat testis, *Cells Tissues Organs* 169, 377-387.
76. Goding, J. W., Grobben, B., and Slegers, H. (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide

- pyrophosphatase/phosphodiesterase family, *Biochim Biophys Acta* 1638, 1-19.
77. Goncalves, J. F., Spanevello, R. M., Fiorenza, A. M., Mazzanti, C. M., Bagatini, M. D., da Rosa, C. S., Becker, L. V., da Costa, P., Abdalla, F. H., Morsch, V. M., and Schetinger, M. R. (2013) NTPDase and 5'-nucleotidase activities from synaptosomes and platelets of rats exposed to cadmium and treated with N-acetylcysteine, *Int. J. Dev. Neurosci.* 31, 69-74.
78. Gorodeski, G. I., and Hopfer, U. (1995) Regulation of the paracellular permeability of cultured human cervical epithelium by a nucleotide receptor, *J Soc Gynecol Investig* 2, 716-720.
79. Grinthal, A., and Guidotti, G. (2002) Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras, *Biochemistry* 41, 1947-1956.
80. Heine, P., Braun, N., Heilbronn, A., and Zimmermann, H. (1999) Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells, *Eur J Biochem* 262, 102-107.
81. Henson, M. C., and Chedrese, P. J. (2004) Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction, *Exp Biol Med (Maywood)* 229, 383-392.
82. Henz, S. L., Furstenu, C. R., Chiarelli, R. A., and Sarkis, J. J. (2007) Kinetic and biochemical characterization of an ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (EC 3.1.4.1) in cells cultured from submandibular salivary glands of rats, *Arch Oral Biol* 52, 916-923.
83. Henz, S. L., Ribeiro, C. G., Rosa, A., Chiarelli, R. A., Casali, E. A., and Sarkis, J. J. (2006) Kinetic characterization of ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in cells cultured from submandibular salivary glands of rats, *Cell Biol Int* 30, 214-220.
84. Hicks-Berger, C. A., Chadwick, B. P., Frischauf, A. M., and Kirley, T. L. (2000) Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2), *J Biol Chem* 275, 34041-34045.

85. Horvat, A., Milosević, M., and Demajo, M. (2009) Effects of metal ions on Mg^{2+} -ATPase activity in plasma membranes isolated from the rat uterus, *Environmental Chemistry Letters* 7, 41-44.
86. Huff, J., Lunn, R. M., Waalkes, M. P., Tomatis, L., and Infante, P. F. (2007) Cadmium-induced cancers in animals and in humans, *Int. J. Occup. Environ. Health* 13, 202-212.
87. Huidobro-Toro, J. P., Lorca, R. A., and Coddou, C. (2008) Trace metals in the brain: allosteric modulators of ligand-gated receptor channels, the case of ATP-gated P2X receptors, *Eur. Biophys. J.* 37, 301-314.
88. Hutchings, G., Gevaert, T., Deprest, J., Nilius, B., Williams, O., and De Ridder, D. (2009) The effect of extracellular adenosine triphosphate on the spontaneous contractility of human myometrial strips, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 143, 79-83.
89. Ikeda, M., Koizumi, S., Nakazawa, K., Inoue, K., and Ito, K. (1996) Potentiation by cadmium ion of ATP-evoked dopamine release in rat phaeochromocytoma cells, *Br. J. Pharmacol.* 117, 950-954.
90. Jabbour, H. N., Kelly, R. W., Fraser, H. M., and Critchley, H. O. (2006) Endocrine regulation of menstruation, *Endocr Rev* 27, 17-46.
91. Jacobson, K. A., and Gao, Z. G. (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets, *Nat Rev Drug Discov* 5, 247-264.
92. Johnson, M. D., Kenney, N., Stoica, A., Hilakivi-Clarke, L., Singh, B., Chepko, G., Clarke, R., Sholler, P. F., Lirio, A. A., Foss, C., Reiter, R., Trock, B., Paik, S., and Martin, M. B. (2003) Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland, *Nat. Med.* 9, 1081-1084.
93. Jomova, K., and Valko, M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology* 283, 65-87.
94. Kaczmarek, E., Koziak, K., Sevigny, J., Siegel, J. B., Anrather, J., Beaudoin, A. R., Bach, F. H., and Robson, S. C. (1996) Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase, *J Biol Chem* 271, 33116-33122.

95. Keen, C. L., Uriu-Hare, J. Y., Hawk, S. N., Jankowski, M. A., Daston, G. P., Kwik-Urbe, C. L., and Rucker, R. B. (1998) Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome, *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1003S-1011S.
96. Kegel, B., Braun, N., Heine, P., Maliszewski, C. R., and Zimmermann, H. (1997) An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain, *Neuropharmacology* 36, 1189-1200.
97. Kettlun, A. M., Alvarez, A., Quintar, R., Valenzuela, M. A., Collados, L., Aranda, E., Banda, A., Chayet, L., Chiong, M., Mancilla, M., and et al. (1994) Human placental ATP-diphosphohydrolase: biochemical characterization, regulation and function, *Int J Biochem* 26, 437-448.
98. King, B. F., Wildman, S. S., Ziganshina, L. E., Pintor, J., and Burnstock, G. (1997) Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor, *Br J Pharmacol* 121, 1445-1453.
99. Kirley, T. L., Crawford, P. A., and Smith, T. M. (2006) The structure of the nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) as revealed by mutagenic and computational modeling analyses, *Purinergic Signal* 2, 379-389.
100. Knowles, A. F. (1988) Differential expression of ectoMg²⁺-ATPase and ectoCa²⁺-ATPase activities in human hepatoma cells, *Arch Biochem Biophys* 263, 264-271.
101. Knowles, A. F. (2011) The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions, *Purinergic Signal* 7, 21-45.
102. Knowles, A. F., and Nagy, A. K. (1999) Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide, *Eur J Biochem* 262, 349-357.
103. Knowles, A. F., Nagy, A. K., Strobel, R. S., and Wu-Weis, M. (2002) Purification, characterization, cloning, and expression of the chicken liver ecto-ATP-diphosphohydrolase, *Eur J Biochem* 269, 2373-2382.
104. Komoszynski, M., and Wojtczak, A. (1996) Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases, *Biochim Biophys Acta* 1310, 233-241.

105. Koshi, R., Coutinho-Silva, R., Cascabulho, C. M., Henrique-Pons, A., Knight, G. E., Loesch, A., and Burnstock, G. (2005) Presence of the P2X7 purinergic receptor on immune cells that invade the rat endometrium during oestrus, *J Reprod Immunol* 66, 127-140.
106. Kosterin, S. A., Bratkova, N. F., and Zimina, V. P. (1995) Kinetic uniformity of the ATP hydrolysis reaction catalyzed by Mg²⁺-ATPase in smooth muscle cell membrane, *Biokhimiia* 60, 1450-1459.
107. Kovacic, P., and Jacintho, J. D. (2001) Reproductive toxins: pervasive theme of oxidative stress and electron transfer, *Curr. Med. Chem.* 8, 863-892.
108. Koziak, K., Kaczmarek, E., Kittel, A., Sevigny, J., Blusztajn, J. K., Schulte Am Esch, J., 2nd, Imai, M., Guckelberger, O., Goepfert, C., Qawi, I., and Robson, S. C. (2000) Palmitoylation targets CD39/endothelial ATP diphosphohydrolase to caveolae, *J Biol Chem* 275, 2057-2062.
109. Krall, J. F., and Korenman, S. G. (1979) Smooth muscle cell sarcolemma. Purification and properties of plasma membranes from the rat uterus, *Biochim Biophys Acta* 556, 105-111.
110. Krstić, D., Krinulović, K., and Vasić, V. (2005) Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase by metal ions and prevention and recovery of inhibited activities by chelators, *J Enzyme Inhib Med Chem* 20, 469-476.
111. Kukulski, F., and Komoszynski, M. (2003) Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes, *Eur J Biochem* 270, 3447-3454.
112. Kukulski, F., Levesque, S. A., Lavoie, E. G., Lecka, J., Bigonnesse, F., Knowles, A. F., Robson, S. C., Kirley, T. L., and Sevigny, J. (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8, *Purinergic Signal* 1, 193-204.
113. Kumcu, E. K., Buyuknacar, H. S., Gocmen, C., Evruke, I. C., and Onder, S. (2009) Differential effect of neocuproine, a copper(I) chelator, on contractile activity in isolated ovariectomized non-pregnant rat, pregnant rat and pregnant human uterus, *Eur. J. Pharmacol.* 605, 158-163.

114. Lafuente, A., Cano, P., and Esquifino, A. (2003) Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH levels, dose-dependent?, *BioMetals* 16, 243-250.
115. Lai, J. C., Guest, J. F., Leung, T. K., Lim, L., and Davison, A. N. (1980) The effects of cadmium, manganese and aluminium on sodium-potassium-activated and magnesium-activated adenosine triphosphatase activity and choline uptake in rat brain synaptosomes, *Biochem Pharmacol* 29, 141-146.
116. Latini, C., Frontini, A., Morroni, M., Marzioni, D., Castellucci, M., and Smith, P. G. (2008) Remodeling of uterine innervation, *Cell Tissue Res* 334, 1-6.
117. Leal, D. B., Streher, C. A., Neu, T. N., Bittencourt, F. P., Leal, C. A., da Silva, J. E., Morsch, V. M., and Schetinger, M. R. (2005) Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes, *Biochim Biophys Acta* 1721, 9-15.
118. LeBel, D., Poirier, G. G., Phaneuf, S., St-Jean, P., Laliberte, J. F., and Beaudoin, A. R. (1980) Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas, *J Biol Chem* 255, 1227-1233.
119. Levesque, S. A., Lavoie, E. G., Lecka, J., Bigonnesse, F., and Sevigny, J. (2007) Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases, *Br J Pharmacol* 152, 141-150.
120. Lorca, R. A., Coddou, C., Gazitua, M. C., Bull, P., Arredondo, C., and Huidobro-Toro, J. P. (2005) Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor modulation, *J. Neurochem.* 95, 499-512.
121. Magocsi, M., and Penniston, J. T. (1991) Ca²⁺ or Mg²⁺ nucleotide phosphohydrolases in myometrium: two ecto-enzymes, *Biochim Biophys Acta* 1070, 163-172.
122. Maliszewski, C. R., Delespesse, G. J., Schoenborn, M. A., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G. R., Poindexter, K., Birks, C., and et al. (1994) The CD39 lymphoid cell activation antigen.

- Molecular cloning and structural characterization, *J Immunol* 153, 3574-3583.
123. Marti, E., Canti, C., Gomez de Aranda, I., Miralles, F., and Solsona, C. (1996) Action of suramin upon ecto-apyrase activity and synaptic depression of Torpedo electric organ, *Br J Pharmacol* 118, 1232-1236.
124. Martin-Satue, M., Lavoie, E. G., Pelletier, J., Fausther, M., Csizmadia, E., Guckelberger, O., Robson, S. C., and Sevigny, J. (2009) Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract, *Histochem Cell Biol* 131, 615-628.
125. Martin, M. B., Reiter, R., Pham, T., Avellanet, Y. R., Camara, J., Lahm, M., Pentecost, E., Pratap, K., Gilmore, B. A., Divekar, S., Dagata, R. S., Bull, J. L., and Stoica, A. (2003) Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells, *Endocrinology* 144, 2425-2436.
126. Maybin, J. A., Critchley, H. O., and Jabbour, H. N. (2011) Inflammatory pathways in endometrial disorders, *Mol Cell Endocrinol* 335, 42-51.
127. Menezes de Oliveira E, Oliveira Battastini AM, Meirelles MN, Menezes Moreira C, Dutra Dias R, and JJ., F. S. (1997) Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in sarcolemmal membrane from rat heart, *Mol Cell Biochem.* 170, 115-123.
128. Mesiano, S. (2009) The Endocrinology of Human Pregnancy and Fetoplacental Neuroendocrine Development, *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology-Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management Chapter 11*, 249–281.
129. Milošević, M., Petrović, S., Demajo, M., and Horvat, A. (2005) Effects of metal ions on plasma membrane Mg^{2+} -atpase in rat uterus and ovaries, *Ann N Y Acad Sci* 1048, 445-448.
130. Milošević, M., Petrović, S., Stanojević, I., Drakulić, D., Veličković, N., and Horvat, A. (2009) Effect of EDTA on copper-induced inhibition of rat miometrial ecto-ATPase activity, *Russ J Phys Chem A+* 83 1592-1595.
131. Milošević, M., Petrović, S., Velickovic, N., Grković, I., Ignjatović, M., and Horvat, A. (2012) ATP and ADP hydrolysis in cell membranes from rat myometrium, *Mol Cell Biochem* 371, 199-208.

132. Missiaen, L., Wuytack, F., and Casteels, R. (1988) Effect of ovarian steroids on membrane ATPase activities in microsomes (microsomal fractions) from rat myometrium. Inhibition of a component of the Mg^{2+} -activated ATPase by Ca^{2+} -calmodulin and by oxytocin, *Biochem J* 250, 571-577.
133. Miyoshi, H., Yamaoka, K., Urabe, S., Kodama, M., and Kudo, Y. (2010) Functional expression of purinergic P2X7 receptors in pregnant rat myometrium, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298, R1117-1124.
134. Moritoki, H., Takei, M., Kasai, T., Matsumura, Y., and Ishida, Y. (1979) Possible involvement of prostaglandins in the action of ATP on guinea-pig uterus, *J Pharmacol Exp Ther* 211, 104-111.
135. Mulero, J. J., Yeung, G., Nelken, S. T., Bright, J. M., McGowan, D. W., and Ford, J. E. (2000) Biochemical characterization of CD39L4, *Biochemistry* 39, 12924-12928.
136. Mulero, J. J., Yeung, G., Nelken, S. T., and Ford, J. E. (1999) CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates, *J Biol Chem* 274, 20064-20067.
137. Muller, C. E., Iqbal, J., Baqi, Y., Zimmermann, H., Rollich, A., and Stephan, H. (2006) Polyoxometalates--a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett* 16, 5943-5947.
138. Murakami, M., and Webb, M. (1981) A morphological and biochemical study of the effects of L-cysteine on the renal uptake and nephrotoxicity of cadmium, *Br. J. Exp. Pathol.* 62, 115-130.
139. Murphy, A. J., and Coll, R. J. (1992) Fluoride is a slow, tight-binding inhibitor of the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum, *J Biol Chem* 267, 5229-5235.
140. Nedeljkovic, N., Banjac, A., Horvat, A., Stojiljkovic, M., and Nikezic, G. (2003) Ecto-ATPase and ecto-ATP-diphosphohydrolase are co-localized in rat hippocampal and caudate nucleus synaptic plasma membranes, *Physiol Res* 52, 797-804.
141. Nedeljković, N., Bjelobaba, I., Subašić, S., Lavrnja, I., Peković, S., Stojkov, D., Vjestica, A., Rakić, L., and Stojiljković, M. (2006) Up-regulation of

- ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rats, *Cell Biol Int* 30, 541-546.
142. Nedeljković, N., Nikezić, G., Horvat, A., Peković, S., Stojiljković, M., and Martinović, J. V. (1998) Properties of Mg^{2+} -ATPase rat brain synaptic plasma membranes, *Gen Physiol Biophys* 17, 3-13.
143. Nikezic, G., Horvat, A., Nedeljkovic, N., Todorovic, S., Nikolic, V., Kanazir, D., Vujisic, L., and Kopecni, M. (1998) Influence of pyridine and urea on the rat brain ATPase activity, *Gen Physiol Biophys* 17, 15-23.
144. Oliveira, E. M., Rocha, J. B., and Sarkis, J. J. (1994) In vitro and in vivo effects of $HgCl_2$ on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from cerebral cortex of developing rats, *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 102, 251-254.
145. Oses, J. P., Cardoso, C. M., Germano, R. A., Kirst, I. B., Rucker, B., Furstenau, C. R., Wink, M. R., Bonan, C. D., Battastini, A. M., and Sarkis, J. J. (2004) Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum, *Life Sci.* 74, 3275-3284.
146. Ostuni, M. A., Egido, P., Peranzi, G., Alonso, G. L., Lacapere, J. J., and Gonzalez, D. A. (2009) Characterization of a functional NTPDase in the endoplasmic reticulum of rat submandibular salivary gland, *Physiol Res* 58, 843-854.
147. Park, D. W., Cho, T., Kim, M. R., Kim, Y. A., Min, C. K., and Hwang, K. J. (2003) ATP-induced apoptosis of human granulosa luteal cells cultured in vitro, *Fertil Steril* 80, 993-1002.
148. Patrick, L. (2002) Mercury toxicity and antioxidants: Part 1: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity, *Altern. Med. Rev.* 7, 456-471.
149. Pecoraro, V. L., Hermes, J. D., and Cleland, W. W. (1984) Stability constants of Mg^{2+} and Cd^{2+} complexes of adenine nucleotides and thionucleotides and rate constants for formation and dissociation of MgATP and MgADP, *Biochemistry* 23, 5262-5271.

150. Penefsky, H. S. (1985) Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1589-1593.
151. Petrović, Đ. N. (1998) *Osnovi enzimologije*, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
152. Pilla, C., Emanuelli, T., Frassetto, S. S., Battastini, A. M., Dias, R. D., and Sarkis, J. J. (1996) ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets, *Platelets* 7, 225-230.
153. Plesner, L. (1995) Ecto-ATPases: identities and functions, *Int Rev Cytol* 158, 141-214.
154. Reed, M. C., Lieb, A., and Nijhout, H. F. (2010) The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions, *Bioessays* 32, 422-429.
155. Rico, E. P., Senger, M. R., Fauth Mda, G., Dias, R. D., Bogo, M. R., and Bonan, C. D. (2003) ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*), *Life Sci* 73, 2071-2082.
156. Rittiner, J. E., Korboukh, I., Hull-Ryde, E. A., Jin, J., Janzen, W. P., Frye, S. V., and Zylka, M. J. (2012) AMP is an adenosine A1 receptor agonist, *J Biol Chem* 287, 5301-5309.
157. Robson, S. C., Sevigny, J., and Zimmermann, H. (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance, *Purinergic Signal* 2, 409-430.
158. Rosati, A. M., and Traversa, U. (1999) Mechanisms of inhibitory effects of zinc and cadmium ions on agonist binding to adenosine A1 receptors in rat brain, *Biochem. Pharmacol.* 58, 623-632.
159. Rosemberg, D. B., Rico, E. P., Senger, M. R., Arizi Mde, B., Dias, R. D., Bogo, M. R., and Bonan, C. D. (2007) Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain membranes, *Toxicology* 236, 132-139.
160. Sanborn, B. M. (2007) Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics, *Semin Cell Dev Biol* 18, 305-314.

161. Sanborn, B. M., Ku, C. Y., Shlykov, S., and Babich, L. (2005) Molecular signaling through G-protein-coupled receptors and the control of intracellular calcium in myometrium, *J Soc Gynecol Investig* 12, 479-487.
162. Savegnago, L., Nogueira, C. W., Fachineto, R., and Rocha, J. B. (2005) Characterization of ATP and ADP hydrolysis activity in rat gastric mucosa, *Cell Biol Int* 29, 559-566.
163. Schetinger, M. R., Wyse, A. T., Da Silva, L. B., Barcellos, C. K., Dias, R. D., and Sarkis, J. J. (1995) Effects of aluminum chloride on the kinetics of rat cortex synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5), *Biol. Trace Elem. Res.* 50, 209-219.
164. Schicker, K., Hussl, S., Chandaka, G. K., Kosenburger, K., Yang, J. W., Waldhoer, M., Sitte, H. H., and Boehm, S. (2009) A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides, *Biochim Biophys Acta* 1793, 325-334.
165. Schreiber, H. M., and Kannan, S. (2004) Regulatory role of E-NTPase/E-NTPDase in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ transport via gated channel, *Theor Biol Med Model* 1, 3.
166. Schwiebert, E. M. (2000) Extracellular ATP-mediated propagation of Ca^{2+} waves. Focus on "mechanical strain-induced Ca^{2+} waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation", *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C281-283.
167. Schwiebert, E. M., and Zsembery, A. (2003) Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells, *Biochim Biophys Acta* 1615, 7-32.
168. Senger, M. R., Rico, E. P., de Bem Arizi, M., Frazzon, A. P., Dias, R. D., Bogo, M. R., and Bonan, C. D. (2006a) Exposure to Hg^{2+} and Pb^{2+} changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*), *Toxicology* 226, 229-237.
169. Senger, M. R., Rosemberg, D. B., Rico, E. P., de Bem Arizi, M., Dias, R. D., Bogo, M. R., and Bonan, C. D. (2006b) In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain, *Toxicol In Vitro* 20, 954-958.

170. Seigny, J., Levesque, F. P., Grondin, G., and Beaudoin, A. R. (1997) Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques, *Biochim Biophys Acta* 1334, 73-88.
171. Seigny, J., Sundberg, C., Braun, N., Guckelberger, O., Csizmadia, E., Qawi, I., Imai, M., Zimmermann, H., and Robson, S. C. (2002) Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation, *Blood* 99, 2801-2809.
172. Sillen, L. G., and Martell, A. E. (1971) Stability constants of metal ion complexes. , *London: Chemical Society, Special Publication No.25*
173. Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., and Gupta, R. (2011) Heavy metals and living systems: An overview, *Indian J Pharmacol* 43, 246-253.
174. Slater, M., Murphy, C. R., and Barden, J. A. (2002) Purinergic receptor expression in the apical plasma membrane of rat uterine epithelial cells during implantation, *Cell Calcium* 31, 201-207.
175. Slater, N. M., Barden, J. A., and Murphy, C. R. (2000) Distributional changes of purinergic receptor subtypes (P2X 1-7) in uterine epithelial cells during early pregnancy, *Histochem J* 32, 365-372.
176. Smith, T. M., and Kirley, T. L. (1999) Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily, *Biochemistry* 38, 321-328.
177. Soloff, M. S., and Sweet, P. (1982) Oxytocin inhibition of (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity in rat myometrial plasma membranes, *J Biol Chem* 257, 10687-10693.
178. Sorensen, R. G., and Mahler, H. R. (1982) Localization of endogenous ATPases at the nerve terminal, *J Bioenerg Biomembr* 14, 527-547.
179. Stout, J. G., and Kirley, T. L. (1996) Control of cell membrane ecto-ATPase by oligomerization state: intermolecular cross-linking modulates ATPase activity, *Biochemistry* 35, 8289-8298.

180. Strobel, R. S., Nagy, A. K., Knowles, A. F., Buegel, J., and Rosenberg, M. D. (1996) Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase. Purification and characterization, *J Biol Chem* 271, 16323-16331.
181. Tai, C. J., Chang, S. J., Chien, L. Y., Leung, P. C., and Tzeng, C. R. (2005) Adenosine triphosphate induces activation of caspase-3 in apoptosis of human granulosa-luteal cells, *Endocr J* 52, 327-335.
182. Tokushige, A., Higashino, H., Searle, B. M., Tamura, H., Kino, M., Bogden, J. D., and Aviv, A. (1984) Cadmium effect on the Na,K-ATPase system in cultured vascular smooth muscle cells, *Hypertension* 6, 20-26.
183. Turi, A., and Torok, K. (1985) Myometrial ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-activated ATPase and its Ca^{2+} sensitivity, *Biochim Biophys Acta* 818, 123-131.
184. Urabe, S., Miyoshi, H., Fujiwara, H., Yamaoka, K., and Kudo, Y. (2009) Enhanced expression of P2X4 and P2X7 purinergic receptors in the myometrium of pregnant rats in preterm delivery models, *Reprod Sci* 16, 1186-1192.
185. V. Vasić, D. Kojić, K. Krinulović, M. Čolović, A. Vujačić, and Stojić, D. (2007) Time-Dependent Inhibition of Na^+/K^+ -ATPase Induced by Single and Simultaneous Exposure to Lead and Cadmium, *Russian Journal of Physical Chemistry A* 81, 1402-1406.
186. Valenzuela, M. A., Collados, L., Kettlun, A. M., Mancilla, M., Lara, H., Puente, J., Aranda, E., Chayet, L., Alvarez, A., and Traverso-Cori, A. (1992) Changes in apyrase activity in uterus and mammary gland during the lactogenic cycle, *Comp Biochem Physiol B* 103, 113-118.
187. Van Belle, H. (1972) Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues, *Biochim Biophys Acta* 289, 158-168.
188. Vasić, V., Jovanović, D., Horvat, A., Momić, T., and Nikezić, G. (2002) Effect of Cd^{2+} and Hg^{2+} on the activity of Na^+/K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase adsorbed on polystyrene microtiter plates, *Anal. Biochem.* 300, 113-120.
189. Vasić, V., Jovanović, D., Krstic, D., Nikezić, G., Horvat, A., Vujisić, L., and Nedeljković, N. (1999) Prevention and recovery of CuSO_4 -induced inhibition of Na^+/K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase in rat brain synaptosomes by EDTA, *Toxicol. Lett.* 110, 95-104.

190. Vasić, V. M., Čolović, M. B., and Krstić, D. Z. (2009) Mechanism of Na^+/K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase inhibition by metal ions and complexes, *Hem Ind* 63, 499-509.
191. Verdugo, P., Latorre, R., Alvarez, O., Medel, M., and Benos, D. (1981) Effects of copper and zinc on rat uterine muscle contraction and rabbit blastocyst fluid accumulation, *Biol. Reprod.* 25, 502-510.
192. Vial, C., and Evans, R. J. (2001) Smooth muscle does not have a common P2x receptor phenotype: expression, ontogeny and function of P2x1 receptors in mouse ileum, bladder and reproductive systems, *Auton Neurosci* 92, 56-64.
193. Vieira, V. L., Morsch, V. M., Lermen, C. L., da Silva, A. C., Tabaldi, L. A., and Schetinger, M. R. (2004) ATP and ADP hydrolysis in the kidney and liver of fish, chickens and rats, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139, 713-720.
194. Vigers, G. A., and Ziegler, F. D. (1968) Azide inhibition of mitochondrial ATPase, *Biochem Biophys Res Commun* 30, 83-88.
195. Voet D. (1996) *Biochemistry*.
196. Volonte, C., Apolloni, S., Skaper, S. D., and Burnstock, G. (2012) P2X7 receptors: channels, pores and more, *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11, 705-721.
197. Volonte, C., and D'Ambrosi, N. (2009) Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters, *FEBS J* 276, 318-329.
198. Vujisić, L., Krstić, D., Krinulović, K., and Vasić, V. (2004) The influence of transition and heavy metal ions on ATPase activity in rat synaptic plasma membranes, *J. Serb. Chem. Soc.* 69, 541-547.
199. Wang, T. F., and Guidotti, G. (1998) Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase, *J Biol Chem* 273, 11392-11399.
200. Wang, T. F., Ou, Y., and Guidotti, G. (1998) The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure, *J Biol Chem* 273, 24814-24821.

201. Wang, X. F., and Chan, H. C. (2000) Adenosine triphosphate induces inhibition of Na⁺ absorption in mouse endometrial epithelium: a Ca²⁺-dependent mechanism, *Biol Reprod* 63, 1918-1924.
202. Watjen, W., and Beyersmann, D. (2004) Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress, *BioMetals* 17, 65-78.
203. Wu, Y., Sun, X., Kaczmarek, E., Dwyer, K. M., Bianchi, E., Usheva, A., and Robson, S. C. (2006) RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity, *Biochem J* 396, 23-30.
204. Xiong, K., Peoples, R. W., Montgomery, J. P., Chiang, Y., Stewart, R. R., Weight, F. F., and Li, C. (1999) Differential modulation by copper and zinc of P2X2 and P2X4 receptor function, *J. Neurophysiol.* 81, 2088-2094.
205. Yalin, S., Comelekoglu, U., Bagis, S., Sahin, N. O., Ogenler, O., and Hatungil, R. (2006) Acute effect of single-dose cadmium treatment on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in ovariectomized rats, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 140-144.
206. Yegutkin, G. G. (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade, *Biochim Biophys Acta* 1783, 673-694.
207. Yegutkin, G. G., and Burnstock, G. (2000) Inhibitory effects of some purinergic agents on ecto-ATPase activity and pattern of stepwise ATP hydrolysis in rat liver plasma membranes, *Biochim Biophys Acta* 1466, 234-244.
208. Yoshioka, K., Hosoda, R., Kuroda, Y., and Nakata, H. (2002) Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains, *FEBS Lett* 531, 299-303.
209. Young, R. C., Schumann, R., and Zhang, P. (2002) The signaling mechanisms of long distance intercellular calcium waves (far waves) in cultured human uterine myocytes, *J Muscle Res Cell Motil* 23, 279-284.
210. Zhang, X., Wang, Y., Zhao, Y., and Chen, X. (2008) Experimental study on the estrogen-like effect of mercuric chloride, *BioMetals* 21, 143-150.

211. Ziganshin, A. U., Vafina, Z. R., and Fatkullin, I. F. (2008) Contrasting effects of P2 receptor agonists on spontaneous contractility of human fallopian tubes with and without acute inflammation, *Pharmacol Res* 57, 56-59.
212. Ziganshin, A. U., Zaitcev, A. P., Khasanov, A. A., Shamsutdinov, A. F., and Burnstock, G. (2006) Term-dependency of P2 receptor-mediated contractile responses of isolated human pregnant uterus, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 129, 128-134.
213. Žikić, R., Štajn, A., Saičić, Z., Spasić, S. a., and Milovanović, S. (2000) *Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja*, PMF Kragujevac.
214. Zimmermann, H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 299-309.
215. Zimmermann, H., and Braun, N. (1999) Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system, *Prog Brain Res* 120, 371-385.
216. Zimmermann, H., Zebisch, M., and Strater, N. (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases, *Purinergic Signal* 8, 437-502.

BIOGRAFIJA AUTORA

Maja S. Milošević rođena je 28.10.1975. godine u Zrenjaninu. Zrenjaninsku gimnaziju završila je 1994. i iste godine upisala Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer biohemija. Diplomirala je 13.12.2001. sa srednjom ocenom 9.09 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Diplomski rad «Efekti nitrendipina i vitamina E na aktivnost katalaze u jetri pacova» uradila je pod rukovodstvom dr Mihajla Spasića, na Institutu sa biološka istraživanja «Siniša Stanković». Magistarske studije na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta upisala je novembra 2002. godine. Školske 2007/2008 upisala je drugu godinu doktorskih studija na Hemijskom fakultetu. Od juna 2002. do 30.06.2005. bila je stipendista Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine. Od 01.07.2005. zaposlena je u Institutu za nuklearne nauke «Vinča», kao istraživač pripravnik. Zvanje istraživač saradnik stekla je 17.12.2008. godine, (reizabrana 2011).

U toku dosadašnjeg naučnog rada učestvovala na četiri projekta koji su finansirani od Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije: Adaptivni procesi, hormonska regulacija i programirana ćelijska smrt u sisara - 1956 (2003-2005) i Signalni putevi delovanja steroidnih hormona i uticaj endogenih i egzogenih faktora na modulaciju procesa u ćelijama sisara - 143044B (2006-2010). Trenutno je angažovana na projektima Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije: Molekulski mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama centralnog nervnog sistema i perifernih tkiva kod sisara – OI 173044 (2011-2014) i Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju - III 41014 (2011-2014)

Maja Milošević je koautor 13 naučnih radova i većeg broja saopštenja, prezentovanih na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Effects of Metal Ions on Plasma Membrane Mg^{2+} -ATPase in Rat Uterus and Ovaries

MAJA MILOŠEVIĆ, SNJEŽANA PETROVIĆ, MIROSLAV DEMAJO, AND ANICA HORVAT

Institute of Nuclear Sciences "Vinča," Laboratory for Molecular Biology and Endocrinology, Belgrade, Serbia and Montenegro

ABSTRACT: The *in vitro* effects of cadmium and mercury were investigated on the Mg^{2+} -ATPase activity of plasma membranes from the rat ovary and uterus. ATP hydrolyzing activities were significant and dose-dependent—inhibited in both plasma membrane preparations by both metals. According to the IC_{50} and apparent K_i , Cd^{2+} was most potent in the ovary, while Hg^{2+} was most potent in the uterus. In ovaries and uterus, Cd^{2+} inhibits competitively, while Hg^{2+} inhibits noncompetitively in both organs. The observed inhibition was a consequence of direct action of the chosen metal ions on the enzyme protein and by decreasing ATP hydrolysis, Hg^{2+} and Cd^{2+} may affect mammalian fertility.

KEYWORDS: Mg^{2+} -ATPase; ecto-ATPase; cadmium; mercury; ovary; uterus; rat

The magnesium-activated adenosine triphosphatase (Mg^{2+} -ATPase) is an integral membrane protein that, in the presence of Mg^{2+} , hydrolyzes the extracellular nucleoside, since its nucleotide-hydrolyzing site is outwardly orientated. This enzyme is termed as ecto-ATPase (EC 3.6.1.3).¹ Extracellular ATP is coreleased with the neurotransmitter from nerve endings by exocytosis.² After binding to a G protein-coupled P2Y purinoceptor, ATP activates the intracellular signaling cascade.³ ATP has been shown to activate the phospholipase C/diacylglycerol/protein kinase C (PKC) pathway and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway.⁴ Activation of PLC by ATP results in the production of inositol triphosphate, which in turn mobilizes intracellular Ca^{2+} . Activation of ionotropic P2X receptor also results in the increase of Ca^{2+} concentration in the cytoplasm.⁵ Thereafter, ATP may participate in various types of physiological responses, including secretion, membrane potential, cell proliferation, and muscle contraction. Considering that the ovary and uterus are well innervated organs, coreleased ATP from nerve endings may play a role in the regulation of their functions. Also, the existence of P2 purinoreceptors in the ovary and uterus was confirmed.⁶ Since, by hydrolyzing ATP, the ecto-ATPase becomes the major inactivating agent in purine triphosphate signaling, we investi-

Address for correspondence: Dr. Anica Horvat, Laboratory for Molecular Biology and Endocrinology, Institute of Nuclear Sciences "Vinča," P.O.B. 522, 11001 Belgrade, Serbia and Montenegro. Voice: 381 11 34 43 619; fax: 381 11 24 55 561.
ahorvat@vin.bg.ac.yu

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1048: 445–448 (2005). © 2005 New York Academy of Sciences.
doi: 10.1196/annals.1342.061

TABLE 1. Inhibition and kinetic parameters of Mg^{2+} -ATPases from ovary and uterus without and in the presence of Cd^{2+} or Hg^{2+}

Tissue	IC_{50} (mM)	K_i (mM)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{molPi}/\text{mg}/\text{min}$)
Ovary				
Control			0.28 ± 0.001	0.107 ± 0.008
Cd^{2+}	0.819	1.029	0.21 ± 0.02	0.018 ± 0.001
Hg^{2+}	1.551	4.266	0.28 ± 0.009	0.023 ± 0.001
Uterus				
Control			0.271 ± 0.048	2.422 ± 0.160
Cd^{2+}	7.014	11.047	0.184 ± 0.016	1.284 ± 0.013
Hg^{2+}	0.513	2.842	0.239 ± 0.011	1.666 ± 0.018

gated the *in vitro* effects of heavy metals Cd^{2+} and Hg^{2+} as major pollutants on ATP hydrolyzing enzyme activity in rat ovaries and uterus.

Isolated plasma membranes from ovaries (70 μg) and uteri (7 μg) were incubated in the absence and presence of increasing concentrations (1×10^{-6} – 5×10^{-1} M) of $CdCl_2$ and $HgCl_2$ separately for 30 min at 37°C in the enzyme assay buffer. The enzyme assay was started by adding 2 mM ATP and lasted for an additional 15 min. Both metals decreased the enzyme activity in the plasma membrane isolated from ovary (OPM) and from uterus (UPM) in a dose-dependent manner (FIG. 1). According to IC_{50} , the chosen metals inhibit Mg^{2+} -ATPase activity in the following order: $Cd^{2+} > Hg^{2+}$ for OPM and $Hg^{2+} > Cd^{2+}$ for UPM (TABLE 1). Both chosen heavy metals inhibited enzyme activity from OPM by 100%, while in UPM, the enzyme activity was totally inhibited by Hg^{2+} , while only 60% in the presence of 0.5 M Cd^{2+} . Significant inhibitions of enzyme activity in both plasma membranes with Hg^{2+} were achieved in the presence of concentrations higher than 10^{-5} M, while in the case of Cd^{2+} , in the presence of concentrations higher than 10^{-4} M. To determine the type of Mg^{2+} -ATPase inhibition by chosen metal ions, substrate-dependence of enzyme activation were performed in the absence or presence of IC_{50} concentrations of metals. Under control conditions, the enzyme activity was higher in the uterus than in the ovary. The observed inhibition of the substrate was higher in the uterus than in the ovary. In ovaries and uterus, Cd^{2+} inhibits competitively the enzyme activity, decreasing both V_{max} and affinity for ATP, while Hg^{2+} inhibits noncompetitively, decreasing only V_{max} of the enzyme. Values of V_{max} and K_m are presented in TABLE 1. From our results, it may be concluded that the sites of action of ions are different.

These results indicate that Hg^{2+} and Cd^{2+} in micromolar concentrations may affect the quantity of ATP in the ovary as well as in the uterus by decreasing or even inhibiting the ATP-hydrolyzing enzyme. The effects of these heavy metals on reproductive organs were mostly examined under *in vivo* conditions, but there was no evidence of *in vitro* effects on Mg^{2+} -ATPase activity in isolated membranes from the rat ovary and uterus. According to the type of inhibition of these two metals, we propose that Cd^{2+} inhibition is a consequence of action on enzyme protein changing its

conformation or it replaces Mg^{2+} in substrate Mg -ATP. Hg^{2+} as a large ion by binding to -SH or S-S groups could inhibit the enzyme activity. Besides their effect found under *in vitro* experiments by decreasing Mg^{2+} -ATPase activity, Hg^{2+} and Cd^{2+} may affect mammalian fertility by increased P2 purinoceptor evoked intracellular events, since P2 receptor signaling appears to be involved in short-term and long-term events, such as secretion, cell growth, proliferation, and death.

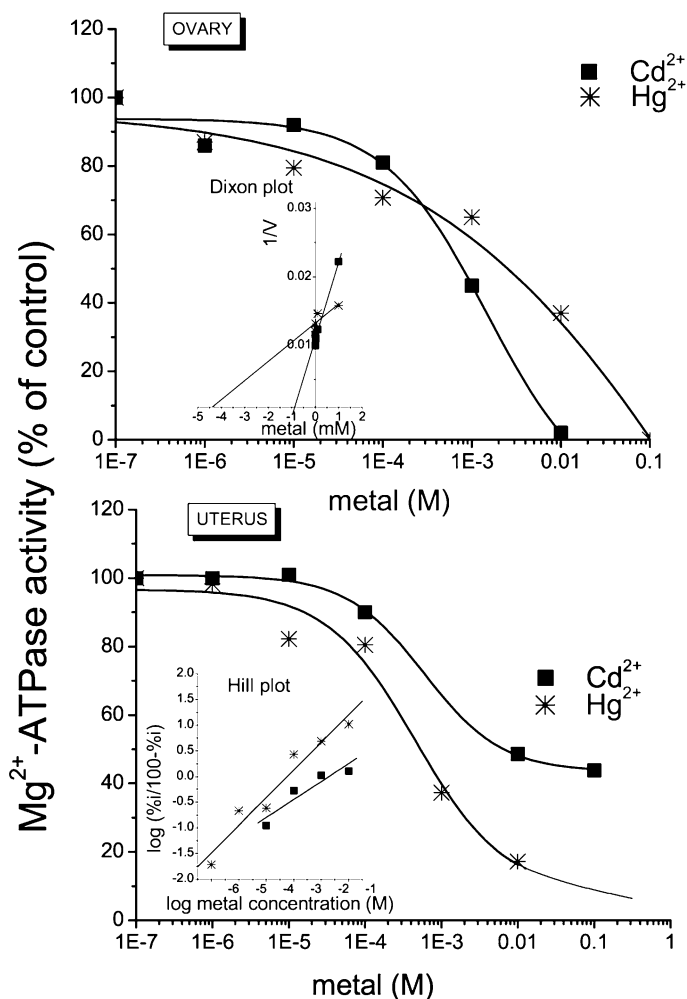


FIGURE 1. Inhibition of Mg^{2+} -ATPase activity from plasma membranes of ovary and uterus by $CdCl_2$ (■) and $HgCl_2$ (*). Plasma membranes (70 μg for ovary and 7 μg for uterus) were incubated in the absence and presence of increasing concentrations of $CdCl_2$ and $HgCl_2$ separately for 30 min at 37°C. Enzyme activity was expressed as a percentage of control values of mean values of three experiments done in triplicate. Dixon plot of data from ovary and Hill plot of data from uterus are presented as insets.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Serbian Ministry of Sciences and Environmental Protection, Project No. 1956.

REFERENCES

1. NAGY, A. 1986. Enzymatic characteristics and possible role of synaptosomal ecto-ATPases from mammalian brain. *In Cellular Biology of Ecto-Enzymes (Proceedings in Life Sciences)*. G.W. Kreutzberg, M. Reddington & H. Zimmermann, Eds.: 49–59. Springer-Verlag, Heidelberg.
2. ZIMMERMANN, H. 1996. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev. Res.* **39**: 337–352.
3. GENDRON, F.P. *et al.* 2002. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr. Drug Targets* **3**: 229–245.
4. TAI, C.-J. *et al.* 2001. Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in human granulosa-luteal cell. *Endocrinology* **142**: 1554–1560.
5. PANKROTOV, Y. *et al.* 1998. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 3898–3902.
6. BARDINI, M., H.Y. LEE & G. BURNSTOCK. 2000. Distribution of P2X receptor subtypes in the rat female reproductive tract at late pro-oestrus/early oestrus. *Cell Tissue Res.* **299**: 105–113.

Effects of metal ions on Mg^{2+} -ATPase activity in plasma membranes isolated from the rat uterus

A. Horvat · M. Milošević · M. Demajo

Received: 30 March 2006 / Accepted: 21 November 2007 / Published online: 16 January 2008
© Springer-Verlag 2007

Abstract In this study, we investigated the *in vitro* effects of metal ions on Mg^{2+} -ATPase activity in isolated membranes from rat uterus. The effects of increasing concentrations of metal salts ($CrCl_2$, $CuSO_4$, $HgCl_2$ and $ZnSO_4$) show sigmoidal and almost complete inhibition relative to the control enzyme activity. According to the IC_{50} , the ATPase possesses greater sensibility to $Zn^{2+} > Cu^{2+} \cong Cr^{3+} \cong Hg^{2+}$, while other metal salts exhibit the following inhibition: $CdCl_2$ 55%, $CsCl$ 64.5% and $SrCl_2$ 58%. Here we demonstrated that the physico-chemical properties of these metals are of importance in defining possible mechanisms of binding and decrease of enzyme activity.

Keywords Mg^{2+} -ATPase · Uterus · Membrane · Metal ions · Rat

Introduction

In mammals, a major source of exposure to hazardous environmental pollutants is derived from various human activities. Pollutants represent health risks because of bioaccumulation and biomagnification of toxicity by entering the food chain through environmental contamination of soil and water. Many studies classify mercury,

cadmium, chromium, copper and several other metals as reproductive toxicants (e.g. Kovacic and Jacintho 2001; Milošević et al. 2005). It is known that exposure to lead reveals signs of functional disturbance of spermatozoa, gonadal hypofunction and decrease in fertility (Jockenhovel et al. 1990). Some metals in small quantities are necessary for cell functioning (Cu, Zn, Mg, Na, Mn, K) but large doses may be toxic. It is known that some metals such as Rb and Cs have therapeutic application in treatment of uteri carcinoma or Zn and Se as scavengers of reactive oxygen species, but the effects of metal ions on membrane enzymes in mammalian tissues were less investigated. Cd exposure and accumulation modifies endocrine pathways, tends to delay the timing of vaginal opening and perturbs the estrous cycles of the female rats. Perinatal Cd exposure, even at low levels, affects the Zn and Cu concentrations of neonates and the reproductive functions of female offspring (Ishitobi and Watanabe 2005). The effects of various metal ions on reproductive organs were mostly examined under *in vivo* conditions but the results of their effect *in vitro* on Mg^{2+} activated ecto-ATPase are very poor.

The magnesium-activated adenosine triphosphatase, Mg^{2+} -ATPase (ecto-ATPase, EC3.6.1.3), is an integral membrane protein that in the presence of Mg^{2+} hydrolyses extracellular ATP to ADP and phosphate. Ecto-ATPase represents the major inactivating agent in purine-triphosphate signaling. The main product of this inactivation-signaling is ADP, that at the same time also represents the substrate of ecto-ATP diphosphohydrolase, the product of which, AMP, becomes then the substrate of 5'-nucleotidase. Hence, the final product of these reactions is extracellular adenosine. Ecto-ATPase, ecto-ATP-diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase by controlling extracellular concentrations of ATP and adenosine may influence several P1 and P2 receptor-mediated processes (Zimmermann et al. 1998;

Selected article from the Sixth European Meeting on Environmental Chemistry, Belgrade, Serbia, December 2005 (Abstract Book p. 182), organized by Dr. Branimir Jovancevic.

A. Horvat (✉) · M. Milošević · M. Demajo
Laboratory for Molecular Biology and Endocrinology,
“Vinča” Institute of Nuclear Sciences, P.O.Box 522,
11001 Belgrade, Serbia
e-mail: ahorvat@vin.bg.ac.yu

Bruno et al. 2002). In reproductive organs, activation of purinoreceptors may influence proper uteri and ovarian cell functions, capacitation of spermatozoa, fertilization and embryonal implantation, proliferative activity of the trophoblast cells and uterine muscle cell contractility.

In this study we examined in vitro effects of various metal salts as potent environmental pollutants on the activity of ecto-enzyme, Mg^{2+} -ATPase from isolated plasma membranes (PM) of the rat uterus. Extended investigations were performed with the aim to define types of enzyme inhibitions.

Experimental

Experiments were performed on 3-month-old (300–350 g) female albino Wistar rats obtained from the local colony. After decapitation, the uteri (6 per pool) were rapidly excised for immediate isolation of PM. PM were obtained from cell lysate (obtained by differential centrifugation of tissue homogenate) after centrifugation on discontinuous sucrose density gradient according to the modified method of Krall and Korenman (1979). In brief, the tissue homogenate was centrifuged 10 min at $1,000\times g$ and the resulting pellet recentrifuged. The membranes were separated from mitochondria from pooled supernatants by centrifugation at $90,000\times g$ for 120 min on discontinuous (0.8, 1.0, 1.2 mol/L) sucrose density gradient. PM were collected from the interface of 1.2/1.0 and 0.8/1.0 mol/L sucrose and pelleted in 5×10^{-3} mol/L Tris-HCl, pH 7.4 for 30 min at $12,000\times g$. All steps of isolation were performed at $4^{\circ}C$. All animal experiments were performed in accordance with the current European convention and were approved by the Ethical Committee of the Institute.

Measurements of Mg^{2+} -ATPase activity were carried out in a reaction medium containing (in 1×10^{-3} mol/L): 50 Tris-HCl (pH 7.4), 1 EGTA (to prevent an activation of the Ca^{2+} -ATPase), 5 $MgCl_2$, 7 μg PM proteins and ATP in a final volume of 200 μl . Reaction mixtures were preincubated at $37^{\circ}C$ in the absence of ATP for 10 min and for additional 30 min in the presence or absence of the metal salts investigated. After this period, the enzyme reaction was started by the addition of ATP and stopped after 15 min by the addition of 22 μl of ice-cold trichloroacetic acid. The samples were kept on ice for further 15 min, and used for assay of the liberated inorganic phosphate (P_i), by using the method of Pennial (1966) and KH_2PO_4 as the reference standard. Results are given as mean \pm SEM (standard error of the mean) of at least three independent experiments done in triplicate. Specific activities of the enzymes are expressed in $\mu mol P_i mg prot^{-1} min^{-1}$, the inhibition by ions is expressed in % of the control activity.

The data were analyzed by means of the Student's *t* test, the values of $p < 0.05$ were considered as significant.

Results and discussion

In isolated PM the activities of other ATPases representing intrinsic components of the PM fraction and/or a contamination of the fraction by mitochondrial membranes (Na, K-ATPase, mitochondrial ATPase and the nonspecific phosphatases) were determined in the presence of their inhibitors (1×10^{-3} mol/L ouabain, 5 NaN_3 , 1 teophylline, 1 NaF or 100 μg oligomycin mg^{-1} PM protein). Results revealed that the activity of all other ATP splitting enzymes together, did not exceeded 15% of the total ATPase activity of the preparation.

The influence of $CrCl_2$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $SrCl_2$, $CdCl_2$, $CsCl$, and $HgCl_2$ on Mg^{2+} -ATPase activity was investigated by a single exposure to metal salts in the concentration range from 1×10^{-6} to 0.1 mol/L. All metal ions induced the inhibition of the enzyme activity in a concentration dependent manner. As can be seen from Figs. 1 and 2, all elements from the transition group (Cr, Co, Cu, Zn, Cd and Hg) exert sigmoidal shaped inhibition starting from concentrations higher than 1×10^{-4} mol/L ($p < 0.05$). Almost complete inhibition of the enzyme activity was observed in the presence of Zn, Cu, Cr and Hg (Fig. 1) while Cd, as well as metal ions of Cs and Sr (at investigated concentrations) inhibit enzyme activity by about 60% (Fig. 2). We have detected previously similar inhibition of plasma membrane enzyme activity with metal ions on rat brain synaptosomal membranes (Vasić et al. 2002) and rat ovary (Milošević et al. 2005) but with different sensibility. According to IC_{50} (concentration of ions which inhibit 50% of maximal enzyme activity) values, the

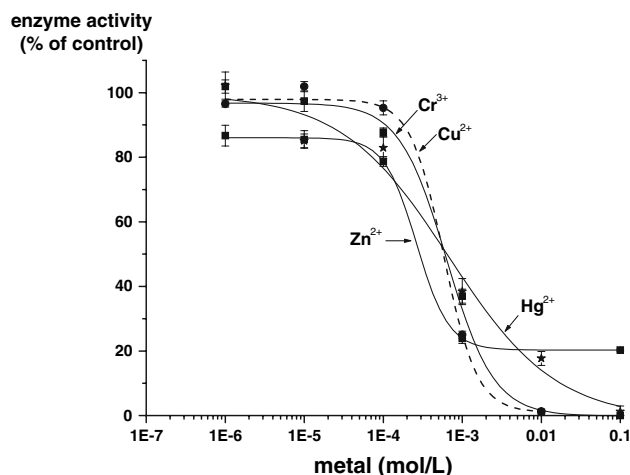


Fig. 1 Inhibition of uteri plasma membrane Mg^{2+} -ATPase activity in the presence of $CrCl_2$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$ and $HgCl_2$

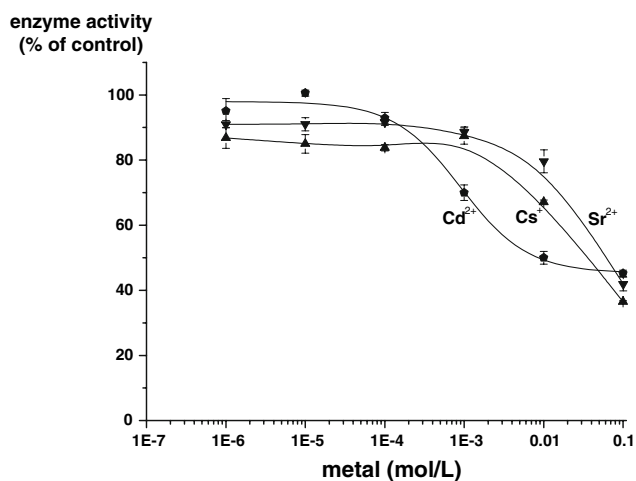


Fig. 2 Partial inhibition of Mg^{2+} -ATPase activity in of uterine plasma membranes by $CsCl$, $SrCl_2$ and $CdCl_2$

enzyme from uteri plasma membrane was most sensible to $Zn > Cu \cong Cr \cong Hg > Cd > Cs > Sr$ (Table 1).

Additional studies investigated inhibition constants (K_i) of the applied ions. From the Dixon plot of enzyme activity inhibition (Fig. 3) in the presence of ions and Hill plots of the obtained results, we conclude that inhibition was: noncompetitive for Hg^{2+} and uncompetitive for Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} . The values of K_i and type of inhibition of the investigated metals are summarized in Table 2. According to results from this study, we may propose that Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} inhibition is a consequence of metal action on enzyme protein on the different site than the substrate binding site, or may replace Mg^{2+} in substrate Mg - ATP^{2-} . Hg^{2+} as a large ion, by binding to $-SH$ or $S-S$ groups, could sterically hinder substrate binding or catalytically inactivate the enzyme–substrate–inhibitor complex.

There are variety of data indicating metals from the transient group as carcinogens, DNA damaging and apoptotic influencing agents. Toxic mechanisms include interaction with cell membranes, binding to DNA and transcriptional factors, enzyme inhibition and production of

Table 1 IC_{50} values and percentage of maximum inhibition ($\% I_{max}$) of PM Mg^{2+} -ATPase activity in the presence of metal salts (mol/L)

Metal salt	IC_{50} (mol/L)	Percentage of I_{max}
$ZnCl_2$	2.55×10^{-4}	80 at 1×10^{-3} mol/L
$CuCl_2$	5.56×10^{-4}	100 at 5×10^{-3} mol/L
$CrCl_2$	6.34×10^{-4}	100 at 1×10^{-2} mol/L
$HgCl_2$	7.33×10^{-4}	100 at 5×10^{-2} mol/L
$CdCl_2$	1.05×10^{-3}	55 at 1×10^{-2} mol/L
$SrCl_2$	7.23×10^{-2}	58 at 0.1 mol/L
$CsCl$	4.05×10^{-2}	64 at 0.1 mol/L

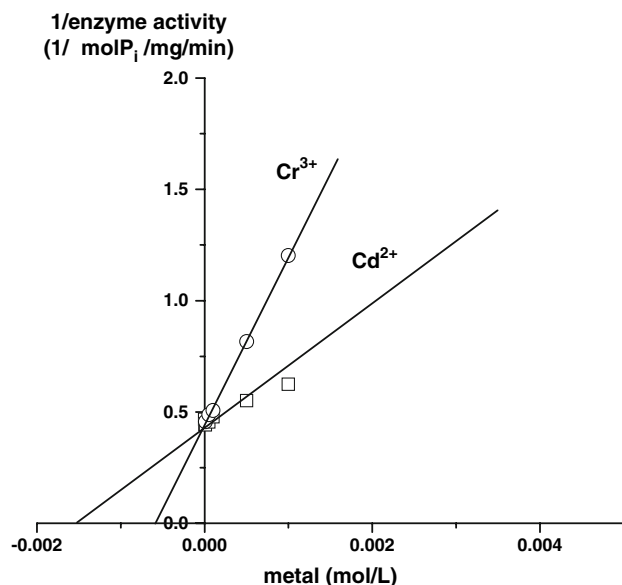


Fig. 3 Dixon plot of uteri PM Mg^{2+} -ATPase activity in the presence of increasing concentrations of $CdCl_2$ and $CrCl_2$, as representative metal ions

reactive oxygen species (Vasić et al. 2002; Antonio Garcia and Corredor 2004; Rudolf and Cervinka 2005).

Chromium taken up from the cells has been reduced in potential DNA damaging species and inducers of apoptosis. Cd may prevent apoptosis by inhibiting caspase-3 activity, a central mediator of apoptosis (Yuan et al. 2000) as well as Zn (Chai et al. 1999). Experimental results obtained in vivo, indicate that Cd and Hg affect growth of oocytes and ovarian maturation by inhibiting gonad-stimulating hormones (Reddy et al. 1997; Rodriguez et al. 2000). By inhibiting or decreasing uterine Mg^{2+} -ATPase (ecto-ATPase) activity, as shown in our study, the investigated ions decrease ATP hydrolysis and in this way may increase extracellular ATP concentrations in the uterus and consequently activate P2 receptors, while at the same time diminish concentration of adenosine. Activation of P2 receptors may lead to increased intracellular Ca^{2+} concentrations and potentiation of contractility of uterine muscle cells. From the literature data, it has been shown that at the time of implantation, the number of P2 receptors

Table 2 Constants of inhibition (K_i) and type of Mg^{2+} -ATPase inhibition in the presence of metal ions

Metal ions	K_i (10^{-3} mol/L)	Type of inhibition
Zn^{2+}	0.209 ± 0.040	Uncompetitive
Cu^{2+}	0.462 ± 0.027	Uncompetitive
Cr^{2+}	0.585 ± 0.016	Uncompetitive
Hg^{2+}	0.713 ± 0.096	Noncompetitive
Cd^{2+}	1.485 ± 0.082	Uncompetitive

increased, while an additional increase of extracellular ATP may disturb implantation of the fetus. Consequently, increased intracellular calcium ions may induce uterine cell apoptosis.

Summarizing, it may be suggested that the investigated ions, with different potency may influence mammalian fertility.

Conclusion

The investigated ions from the transition group of metals dose-dependently inhibit uterine ecto-Mg²⁺-ATPase activity of rats, achieving almost total inhibition (except Cd) at sub-milimolar concentrations. The potencies of metal inhibitions are: Zn > Cu ≅ Cr > Hg > Cd. All metals exhibit uncompetitive inhibition except Hg, which non-competitively inhibits enzyme activity. The metal ions, Cs and Sr possess weak potency at very high concentrations, which may be neglected in respect to toxicology. Physico-chemical properties of these metals are of importance in defining possible mechanisms of binding and decrease of enzyme activity. Taking into account the tissue accumulation of ions from the environment, the investigated ions with different potency may influence fertility in female mammals.

Acknowledgment This study was supported by the Ministry of Science of the Republic of Serbia, Project No 143044B.

References

- Antonio Garcia T, Corredor L (2004) Biochemical changes in the kidney after perinatal intoxication with lead and/or cadmium and their antagonistic effects when coadministered. *Ecotoxicol Environ Safe* 57:184–189
- Bruno AN, Bonan CD, Wofchuk ST, Sarkis JFF, Battastini AMO (2002) ATP diphosphohydrolase (NTPDase 1) in rat hippocampal slices and effect of glutamate on the enzyme activity in different phases of development. *Life Sci* 71:215–225
- Chai F, Troung-Tran AQ, Ho LH, Zalewski PD (1999) Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation. *Immunol Cell Biol* 77:272–278
- Ishitobi H, Watanabe C (2005) Effects of low-dose perinatal cadmium exposure on tissue zinc and copper concentrations in neonatal mice and on the reproductive development of female offspring. *Toxicol Lett* 159:38–46
- Jockenhovel F, Bals-Pratsch M, Bertram HP, Nieschlag E (1990) Seminal lead and copper in fertile and infertile men. *Andrologia* 22:503–511
- Kovacic P, Jacintho JD (2001) Reproductive toxins: pervasive theme of oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem* 8:863–892
- Krall JF, Korenman SG (1979) Smooth muscle cell sarcolemma. Purification and properties of plasma membranes from the rat uterus. *Biochim Biophys Acta* 556:105–111
- Milošević M, Petrović S, Demajo M, Horvat A (2005) Effects of metal ions on plasma membrane Mg²⁺-ATPase in rat uterus and ovaries. *Ann N Y Acad Sci* 1048:445–448
- Pennial R (1966) An improved method for determination of inorganic phosphate by isobutanol-benzene extraction procedure. *Anal Biochem* 14:87–90
- Reddy PS, Tuberty SR, Fingerman M (1997) Effect of cadmium and mercury on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol Environ Saf* 37:62–65
- Rodriguez EM, Lopez Greco LS, Fingerman M (2000) Inhibition of ovarian growth by cadmium in the fiddler crab, *Uca pugilator* (Decapoda, Ocypodidae). *Ecotoxicol Environ Saf* 46:202–206
- Rudolf E, Cervinka M (2005) The role of biomembranes in chromium (III)-induced toxicity in vitro. *Altern Lab Anim* 33:249–259
- Vasić V, Jovanović D, Horvat A, Momić T, Nikezić G (2002) Effects of Cd²⁺ and Hg²⁺ on the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase adsorbed on polystyrene micro titer plates. *Anal Biochem* 300:113–120
- Yuan C, Kadiiska M, Achanzar WE, Mason RP, Waalkes MP (2000) Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockage of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 164:321–329
- Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P (1998) New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int* 32:421–425

Effect of EDTA on Copper-Induced Inhibition of Rat Myometrial ecto-ATPase Activity*

M. Milošević, S. Petrović, I. Stanojević, D. Drakulić, N. Veličković, and A. Horvat

Laboratory for Molecular Biology and Endocrinology,
"Vinča" Institute of Nuclear Sciences, P.O. Box 522, 11001 Belgrade, Serbia
e-mail: mmilosevic@vinca.rs

Abstract—The aim of this study was to examine in vitro chelator's ability to prevent copper-induced inhibition of rat myometrial ecto-ATPase activity. The effects of increasing CuSO_4 concentrations, in the absence and presence of 1 mmol/l EDTA, showed sigmoidal and complete inhibition relative to the control enzyme activity. IC_{50} values, 1.15×10^{-4} and 1.71×10^{-3} mol/l in the absence and presence of EDTA, respectively, were determined by Hill analysis from experimental curves. According to the results presented in this work, 1 mmol/l EDTA increased by one order of magnitude CuSO_4 concentration for half-maximal inhibition (IC_{50}), by decreasing Cu^{2+} concentrations, available to form inactive CuATP^{2-} complex.

DOI: 10.1134/S0036024409090313

INTRODUCTION

ATP and other nucleotides/nucleosides in extracellular medium express signaling roles, via nucleotide selective P1 and P2 receptors, controlling the various physiological processes in brain, heart, lungs, gastrointestinal tract, liver, urogenital and immune system [1]. For proper functioning of cells, after signal transduction, extracellular nucleotides should be rapidly inactivated. Ecto-ATPases (EC 3.6.1.3) is a family of cation dependent enzymes that hydrolyzes extracellular nucleoside tri- and/or diphosphates. The members of this family are highly glycosylated cell surface enzymes, ubiquitously expressed on plasma membranes of almost all organisms [2]. By controlling extracellular ATP concentration, ecto-ATPase family enzymes are important modulators of purinergic signaling cascade.

ATP exerts different responses in various cells of the female reproductive system. In uterus, purinergic signaling has role in regulating uterine fluid microenvironment [3], prostaglandin secretion, uterine smooth muscle contraction [4], preparation and remodeling of uterine tissue before implantation and events during early pregnancy [5, 6]. The physiological source of extracellular nucleotides in the uterine tract is autonomic nerves, platelets and semen.

Copper is essential trace element, required for the activation of enzymes associated with iron metabolism, elastin and collagen formation, melanin production, proper immune response and central nervous system integrity. There are also data that indicate importance of copper in embryonic and fetal development [7]. Copper toxicosis is usually due to occupa-

tional exposure, accidental agricultural overspray, excessive supplementation, contamination of food and water in contact with copper vessels and external exposure such as copper intrauterine devices and elevated levels of estrogens. Its toxicity is an important contributor to at least a hundred different symptoms and disease conditions. Copper ions catalyze peroxide decomposition, resulting in ROS formation and oxidative damage of lipids, proteins and DNA. Although the copper toxic action is mainly attributed to binding of Cu^{2+} ions to functional sulfhydryl ($-\text{SH}$) group, it also may interact with $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ groups of membrane proteins or compete with Mg^{2+} in the MgATP^{2-} complex and in that way decreases Mg^{2+} -dependent enzyme activity.

The literature data classify copper as a reproductive toxicant [8, 9]. Our previous study showed that Cu^{2+} ions induce inhibition of uterine plasma membrane ecto-ATPase activity [10]. Copper is also able to act as an allosteric modulator of ionotropic P2X receptors [11, 12]. These results suggest that alterations in purinergic signaling could be one of mechanisms for copper-induced toxicity on reproductive organs in mammals.

EDTA, one of the strongest metal ion chelators, has been used for years as a drug of choice for metal overload, but also as a model substance for in vitro studies of ATPase activity prevention and recovery in the presence of heavy metals [13, 14]. The present study examines in vitro CuSO_4 effect on ecto-ATPase activity in uterine plasma membranes, in the presence and absence of EDTA. Chelating copper ions, EDTA decreases free ion concentrations, which may interact with the enzyme protein or ATP. Since ATP has a higher affinity for Cu^{2+}

*The article is published in the original.

than Mg^{2+} , and EDTA may bind both, copper and magnesium ions, concentrations of all free ions and complexes were calculated using computer-base program JONCONC.

EXPERIMENTAL

Animals. Experiments were performed on 3-months-old female Wistar albino rats obtained from the local colony. Animals were held under standard laboratory conditions and "Protocol of the Vinca institute on care and treatment of laboratory animals" were followed.

Isolation of plasma membranes. Myometrial plasma membranes (MPM) were isolated by the modified Krall method [15]. Animals were decapitated and the uteri were trimmed of fat, minced and homogenized in isolation buffer (5 mmol/l Tris, pH 7.4, 0.32 mol/l sucrose) using an UltraTurex homogenizer. In second step, the suspension was further homogenized with 20 strokes in Potter homogenizer, with teflon pestile at 900 rpm. Homogenate was filtrated through surgical gauze and centrifuged for 10 min at 1000g. The supernatant was saved and pellet was resuspended in 10 ml of the same medium and centrifuged for a second time under the same conditions. The supernatants were pooled and centrifuged at 10000g for 35 min at 4°C. Obtained supernatant was recentrifugated for 60 min at 50000g and the pellet was resuspended in 5 mmol/l Tris-HCl and refrigerated at -20°C, over night.

Next day, the suspension was homogenized with 10 strokes of a manual homogenizer and placed on the top of discontinuous gradient of sucrose. The gradient was centrifuged for 120 min at 100000g, in ultracentrifuge at 8°C. The interface of 1.2–1.0 mol/l and 1.0–0.8 mol/l sucrose, containing plasma membrane were pooled, diluted by 5 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4) and pelleted by centrifugation for 35 min at 11000g in order to eliminate sucrose present in sample. The membrane pellets were resuspended in 5 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4) and then homogenized with manual homogenizer. The membrane preparations were kept at -70°C until use.

Protein determination. Protein was measured according to the modified Lowry procedure for protein determination in membrane and lipoprotein samples [16].

Enzyme assays. NTPDase activity was determined by the measuring the amount of liberated inorganic phosphate from hydrolyzed ATP. The P_i was assayed according to Penniel method [17]. The incubation mixture contained 1 mmol/l $MgCl_2$, 7 μg membrane protein and 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4 in a final volume of 200 μl . The reaction medium was preincubated for 30 min at 37°C without or with copper sulphate (1×10^{-7} to 5×10^{-2} mol/l). The assay was initiated by adding the substrate, 1 mmol/l ATP. Incubation lasted 10 min at 37°C in water bath and reaction was

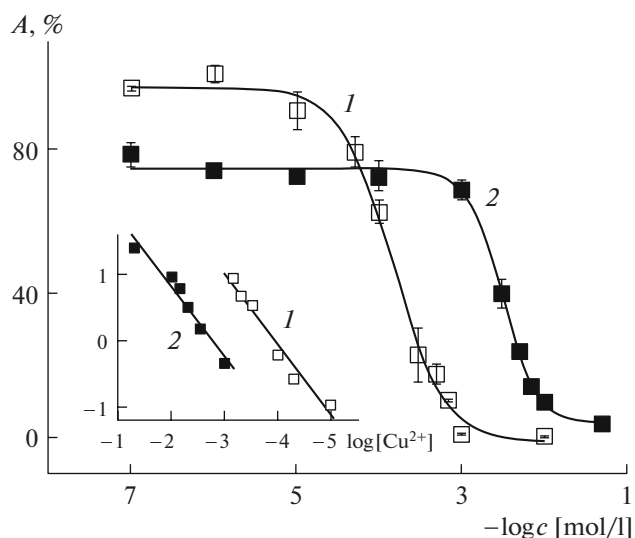


Fig. 1. Ecto-ATPase activity inhibition by $CuSO_4$ (1) in the absence and (2) in presence of 1×10^{-3} mol/l EDTA. The values given are the mean percentage in respect to the control enzyme activity (A) of at least three experiments \pm S.E.M.; c is concentration of added Cu^{2+} . Inset: Hill plot of experimental data.

stopped with 22 μl of 3 mol/l perchloric acid and chilled on ice for 15 min. The inorganic phosphate concentration, liberated from the hydrolysis of ATP, was determined by spectrophotometric method on 700 nm. The effects of increasing concentrations of Cu^{2+} were measured in the absence and presence of 1 mmol/l EDTA. Experiments were repeated at least three times in triplicate with different enzyme preparations. The results are expressed as a mean percent enzyme activity compared to corresponding control value.

Statistical analysis. The data were analyzed by means of the Student t test; the values of $p < 0.05$ considered as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Prevention of $CuSO_4$ induced inhibition. The effects of increasing concentrations of Cu^{2+} (1×10^{-7} to 5×10^{-2} mol/l) were measured in the absence and presence of 1 mmol/l EDTA. The concentrations of ionic species were calculated, taking into account equilibrium reactions involving Mg^{2+} , ATP, EDTA, and Cu^{2+} (table). The stability constants were found in the literature [18].

In the absence of EDTA, ecto-ATPase activity showed complete inhibition, relative to the control samples when 1×10^{-3} mol/l of $CuSO_4$ was added, but the same metal concentration in the presence of EDTA inhibited enzyme activity for about 30% (Fig. 1). The half-maximum inhibitory activities (IC_{50}) in absence of EDTA, determined by Hill analysis of experimental

The values of free Cu^{2+} (c_0), CuATP^{2-} and CuEDTA^{2-} (M) calculated in the medium assay containing various Cu^{2+} concentrations (c , M) in the presence and absence EDTA

Without EDTA			With 1mmol/l EDTA			
c	c_0	CuATP^{2-}	c	c_0	CuATP^{2-}	CuEDTA^{2-}
1×10^{-7}	1.1×10^{-9}	9.9×10^{-8}	1×10^{-7}			0.9×10^{-7}
1×10^{-6}	1.1×10^{-8}	9.9×10^{-7}	1×10^{-6}			0.9×10^{-6}
1×10^{-5}	1.1×10^{-7}	9.9×10^{-6}	1×10^{-5}			0.9×10^{-5}
5×10^{-5}	6.4×10^{-7}	4.9×10^{-5}	1×10^{-4}			9.9×10^{-5}
1×10^{-4}	1.5×10^{-6}	9.8×10^{-5}	1×10^{-3}	1.2×10^{-12}	1.1×10^{-10}	9.9×10^{-4}
3×10^{-4}	9.1×10^{-6}	2.9×10^{-4}	3×10^{-3}	1.1×10^{-10}	9.5×10^{-4}	9.9×10^{-4}
5×10^{-4}	2.8×10^{-5}	4.7×10^{-4}	5×10^{-3}	3.1×10^{-3}	9.8×10^{-4}	9.9×10^{-4}
7×10^{-4}	6.8×10^{-5}	6.3×10^{-4}	7×10^{-3}	5.1×10^{-3}	9.9×10^{-4}	9.9×10^{-4}
1×10^{-3}	1.9×10^{-5}	8.0×10^{-4}	1×10^{-2}	8.0×10^{-3}	9.9×10^{-4}	9.9×10^{-4}
1×10^{-2}	9.0×10^{-3}	9.9×10^{-4}	5×10^{-2}	4.8×10^{-3}	9.9×10^{-4}	9.9×10^{-4}

Note. Concentrations below 1×10^{-12} are not presented in the table.

curves (Fig. 1, inset), were 1.15×10^{-4} mol/l of added CuSO_4 and 1.43×10^{-5} mol/l for calculated free Cu^{2+} concentration (table). The IC_{50} value in presence of EDTA was 1.71×10^{-3} mol/l of added CuSO_4 .

Effect of Cu^{2+} on substrate concentration. Calculated values show that competition between Cu^{2+} and Mg^{2+} ions in the MgATP^{2-} complex, starts at 1×10^{-4} mol/l of added CuSO_4 , since copper ions form inactive and more stable complex with ATP. Experimental curves show that inhibition of enzyme activity starts at CuSO_4 concentrations less than 10^{-4} mol/l, indicating that inhibition depend on free Cu^{2+} concentration, rather than a formation of CuATP^{2-} . Although, ecto-ATPase has no free SH groups [19], free copper ions may non-specifically bind to other functional enzyme residues and decrease enzyme activity.

Effect of EDTA. In the presence of 1 mmol/l EDTA, inhibition of enzyme activity by CuSO_4 is prevented below 1 mmol/l. According to calculation, in range of 10^{-7} – 10^{-3} mol/l of CuSO_4 , almost total concentration of added copper ions is trapped in complex with EDTA (table). But initial enzyme activity is maximum 80% of control activity measured in the absence of EDTA. It may be explained by lowering the MgATP^{2+} concentration, due to Mg^{2+} ions chelation. Adding CuSO_4 in reaction mixture, Cu^{2+} ions replace Mg^{2+} in complex with EDTA and concentration of MgATP^{2+} increases (Fig. 2). However, enzyme activity remains merely the same until 1 mmol/l CuSO_4 was added. Inhibition of the activity may be due to interaction of EDTA or CuEDTA complex with the enzyme or other plasma membrane proteins in the vicinity.

In our previous study of copper induced inhibition ecto-ATPase activity [10], reaction medium con-

tained excess of Mg^{2+} and ATP (5 mmol/l MgCl_2 , 2 mol/l ATP), in order to maintain constant concentration of MgATP^{2+} , substrate for ecto-ATPase. Kinetic analysis revealed uncompetitive type of inhibition and our results were consistent with previously reported study with ecto-ATPase in rat brain synaptic membranes [14]. But 5 mmol/l Mg^{2+} is not likely to be physiological concentration since normal plasma levels of magnesium are in range from 0.7 to 1.0 mmol/l. Estimated concentrations of ATP that produce physiological response are even smaller, within the range of 10^{-4} – 10^{-6} mol/l [20]. In this study, substrate concentrations (1 mmol/l Mg^{2+} , 1 mmol/l ATP) that produce maximum enzyme activity and yet are more similar to physiological level in extracellular space, have been chosen. By decreasing concentration of added MgCl_2 in reaction medium, IC_{50} values and percentage of maximum inhibition (I_{max}) changed approximately proportional [10]. The half-maximum inhibitory activities were 1.15×10^{-4} and 5.56×10^{-4} mol/l in the presence of 1 and 5 mmol/l MgCl_2 , respectively. The composition of reaction mixture and component's concentrations of model system in vitro may be important when estimate Cu^{2+} concentration needed to achieve biological response in system in vivo.

Some recent data suggest that EDTA cause membrane destabilization, by chelating divalent cations on lipid surface (Mg^{2+} , Ca^{2+}) and by direct insertion in membrane [21]. These findings are important since EDTA has been used for years as a drug and additive to food and cosmetics. Our results suggest that effects of the EDTA on the enzyme activity inhibition could not be excluded, since initial enzyme activity is maximum

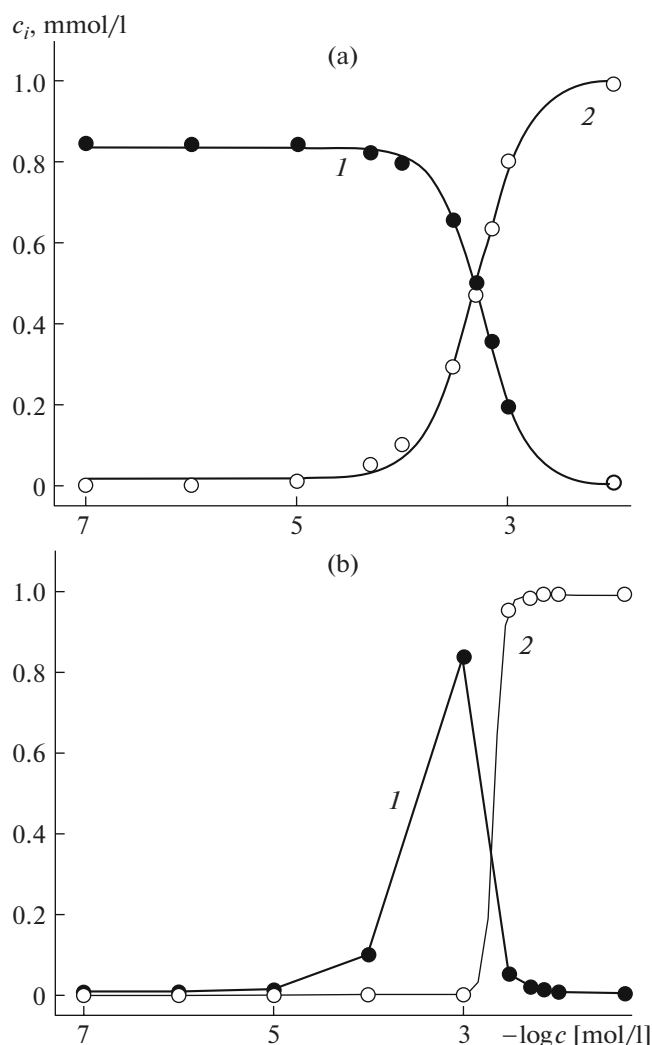


Fig. 2. The dependence of the concentration (c_i) of (1) MgATP^{2-} and (2) CuATP^{2-} complexes in the reaction mixture containing 1 mmol/l ATP and 1 mmol/l MgCl_2 on the experimental CuSO_4 concentration, (a) in the absence and (b) in the presence of 1 mmol/l EDTA.

80% of control activity, measured in the absence of EDTA.

CONCLUSION

EDTA, having high affinity for Cu^{2+} , may prevent or decrease the toxic effects of this metal ion. According to the results presented in this work, 1 mmol/l EDTA increase by one order of magnitude CuSO_4 concentration for half-maximal inhibition (IC_{50}), by

decreasing Cu^{2+} concentrations, available to form inactive complex CuATP^{2-} .

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Serbian Ministry of Sciences, project no. 143044.

REFERENCES

1. G. Burnstock, *Physiol. Rev.* **87**, 659 (2007).
2. H. Zimmermann, *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 231 (1999).
3. X. F. Wang and H. C. Chan, *Biol. Reprod.* **63**, 1918 (2000).
4. H. Aitken, N. L. Poyser, and M. Hollingsworth, *Br. J. Pharmacol.* **132**, 709 (2001).
5. R. Koshi, R. Coutinho-Silva, C. M. Casabulho, et al., *J. Reprod. Immunol.* **66**, 127 (2005).
6. M. Slater, C. R. Murphy, and J. A. Barden, *Cell Calcium* **31**(5), 201 (2002).
7. C. L. Keen, J. Y. Uriu-Hare, S. H. Hawk, et al., *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 1003S (1998).
8. M. K. Chung, S. S. Beak, A. H. Lee, et al., *Environ. Toxicol.* (2008).
9. P. Kovacic and J. D. Jacinto, *Curr. Med. Chem.* **8**, 863 (2001).
10. M. Milosevic, M. Demajo, and A. Horvat, *Environ. Chem. Lett.* (2009, in press).
11. C. Virginio, D. Church, and R. A. North, *Neuropharmacol.* **36** (9), 1285 (1997).
12. C. Coddou, R. A. Lorca, C. Acuña-Castillo, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **202** (2), 121 (2005).
13. D. Krstic, K. Krinulovic, and V. Vasic, *J. Enz. Inh. Med. Chem.* **20** (5), 469 (2005).
14. V. Vasic, D. Jovanovic, D. Krstic, et al., *Toxicol. Lett.* **110**, 95 (1999).
15. J. F. Krall and S. G. Korenman, *Biochim. Biophys. Acta* **556**, 105G (1979).
16. M. A. Markwell, S. H. Haas, L. L. Bieber, et al., *Anal. Biochem.* **87**, 206 (1978).
17. R. Pennial, *Anal. Biochem.* **14**, 87 (1966).
18. L. G. Silen and A. E. Martell, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes* (The Chem. Soc., London, 1971), Spec. Publ. No. 25.
19. V. V. Ivanenkov, J. Meller, and T. L. Kirley, *Biochemistry* **44**, 8998 (2005).
20. G. G. Yegutkin, *Bioch. Biophys. Acta* **1783**, 673 (2008).
21. V. Prachayasittikul, C. Isaramkura-Na-Ayudhya, T. Tantimongcolwat, et al., *Acta Bioch. Bioph. Sinica* **39**, 901 (2007).

ATP and ADP hydrolysis in cell membranes from rat myometrium

Maja Milošević · Snježana Petrović ·
Nataša Veličković · Ivana Grković ·
Marija Ignjatović · Anica Horvat

Received: 29 March 2012 / Accepted: 25 August 2012 / Published online: 7 September 2012
© Springer Science+Business Media, LLC. 2012

Abstract Extracellular nucleotides affect female reproductive functions, fertilization, and pregnancy. The aim of this study was to investigate biochemical characteristics of ATP and ADP hydrolysis and identify E-NTPDases in myometrial cell membranes from Wistar albino rats. The apparent K_m values were 506.4 ± 62.1 and 638.8 ± 31.3 μM , with a calculated V_{max} (app) of $3,973.0 \pm 279.5$ and $2,853.9 \pm 79.8$ $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ for ATP and ADP, respectively. The enzyme activity described here has common properties characteristic for NTPDases: divalent cation dependence; alkaline pH optimum for both substrates, insensitivity to some of classical ATPase inhibitors (ouabain, oligomycin, theophylline, levamisole) and significant inhibition by suramine and high concentration of sodium azides (5 mM). According to similar apparent K_m values for both substrates, the ATP/ADP hydrolysis ratio, and Chevillard competition plot, NTPDase1 is dominant ATP/ADP hydrolyzing enzyme in myometrial cell membranes. RT-PCR analysis revealed expression of three members of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (NTPDase 1, 2, and 8) in rat uterus. These findings may further elucidate the role of NTPDases and ATP in reproductive physiology.

Keywords ATP/ADP hydrolysis · NTPDase · Purinergic signaling · Uterus · Rat

Introduction

Extracellular nucleotides are ubiquitous cell-to-cell signaling molecules with broad influence on physiological processes in virtually all mammalian tissues and organs. They are involved in modulation of neurotransmission [1], nociception [1], cardiac and vascular function [2], smooth muscle contraction, inflammation, secretion from endocrine and exocrine glands, liver glycogen metabolism [3], and bone calcification [4, 5]. Although ATP is a universal and omnipresent signaling molecule, the physiological responses that follow purinergic signaling cascade are diverse and specific, depending on cell type. Specificity of purinergic signaling depends on the source of extracellular nucleotides and distinct subtypes of purinoceptors and ectonucleotidases expressed on cell membranes. ATP and its breakdown products, ADP and adenosine, act via specific surface receptors—purinoceptors. The P1Rs are responsive to adenosine, P2X Rs respond to ATP, whereas P2Y Rs can be activated by ATP, ADP, UTP, UDP, ITP, and nucleotide sugars [3]. P2X receptors are ligand-gated ion channels while P2Y and P1 are G-protein-coupled receptors. The activation of purinoceptors is tightly regulated by ectonucleotidase activities, superfamily of cell surface enzymes that metabolize their ligands [6].

The metabolism of extracellular ATP to adenosine is regulated by three enzyme families: E-NTPDases (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase), E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase), and ecto-5'-nucleotidase. E-NTPDase family, previously classified as E-type ATPases, is group of glycosylated

M. Milošević (✉) · S. Petrović · I. Grković · M. Ignjatović · A. Horvat
Department of Molecular Biology and Endocrinology,
Institute of Nuclear Sciences VINČA, University of Belgrade,
P.O. Box 522, 11001 Belgrade, Serbia
e-mail: mmilosevic@vinca.rs

N. Veličković
Department of Biochemistry, Institute for Biological Research
“Siniša Stanković”, University of Belgrade, Despot Stefan Blvd.
142, 11060 Belgrade, Serbia

membrane-bound enzymes that hydrolyze nucleoside tri- and diphosphates. They require millimolar concentrations of divalent cations and an alkaline pH for maximal activity. E-NTPDases are insensitive to the classical inhibitors of the P-, F-, and V-type ATPases [7]. All family members share five highly conserved sequence domains essential for catalytic activity—apyrase conserved regions (ACR) [6]. However, they differ in cellular allocation and substrate specificity. E-NTPDase1, 2, 3, and 8 are located on cell plasma membrane. E-NTPDase1 hydrolyzes ATP and ADP with similar efficiency. In contrast, E-NTPDase2 has a 30-fold preference for ATP hydrolysis over ADP, whereas E-NTPDase3 and 8 hydrolyzes ATP three and two times faster than ADP [8]. These ectonucleotidase, together with an ecto-5'-nucleotidase (hydrolyzes AMP to adenosine), control the availability of ligands (ATP, ADP, AMP, and adenosine) for purino-receptors, and consequently, the duration and extent of the receptor activation.

A number of studies confirmed significance of extracellular nucleotide signaling in female reproductive physiology. Purinergic signaling has role in regulating uterine and oviducts fluid microenvironment [9, 10], prostaglandin [11], estradiol, and progesterone secretion [3], smooth muscle contraction in uterus and fallopian tubes [12, 13], preparation and remodeling of uterine tissue before implantation, and events during early pregnancy [14, 15]. Main physiological sources of extracellular ATP in female reproductive tract are autonomic nerves, blood vessels, and semen. It is postulated that ATP from autonomic nerves released during estrus cycle induces contraction of smooth muscle in perifollicular ring and extrusion of the oocyte at ovulation. Changes in the expression pattern of purinergic receptor were observed in the ovaries and uterus during estrus cycle, implantation, and pregnancy [15–18]. In addition, adenosine is identified as a key molecule in sperm capacitation, process of spermatozoa maturation in female genital tract prior to fertilization [19].

The presence of ectonucleotidase activity in uterus tissue was indicated by magnesium-activated ATP hydrolysis found in rat intact myometrial cells [20] and isolated plasma membranes [21]. In recent study, the E-NTPDases presence in plasma membrane of murine reproductive organs was described by immunohistochemistry [22]. Our group has also detected high ecto-ATPase activity in plasma membranes isolated from rat uterus [23, 24].

Although many studies illustrated importance of purine receptors in female reproductive organs, there is comparably less data about characteristics of enzymes metabolizing extracellular ATP and ADP in uterus. The objective of the present study was to determine kinetic characteristics of ATP and ADP hydrolysis in rat myometrium plasma membranes and standardize conditions for future in vitro research of environmental contaminants and pharmacological

compounds with potential effects on extracellular ATP and ADP hydrolysis in uterus. Quantification of NTPDase activity in myometrial plasma membranes may further elucidate the role of extracellular ATP in reproductive physiology.

Materials and methods

Materials

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and were analytical grade. All other reagents were of the highest analytical grade. Solutions used in enzyme assays were prepared in Milli-Q grade water.

Metabion International (Martinsried, Germany) synthesized specific primer pairs for rat *Entpd1* (CD39), *Entpd2* (CD39L1), *Entpd3* (CD39L3), and *Entpd8*. TRI Reagent Solution was purchased from Ambion (Applied Biosystems, EU) and ethidium bromide from SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Germany). First Strand cDNA Synthesis Kit, Taq polymerase (5 U/ μ l), $MgCl_2$ (25 mM), dNTP mix (10 mM) and 10 \times TrueStart Taq buffer, and O⁺GeneRuler 50 bp DNA Ladder were purchased from Fermentas (Vilnius, Lithuania).

Experimental animals

Wistar Albino female rats, 3-months old, were obtained from the local colony. Animals were housed in groups of three per cage, under standard diurnal conditions (12 h light, 12 h dark), at the constant temperature of 22 ± 2 °C and with free access to food and water. The principles from Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 80-23) were followed. All procedures were approved by the ethics committee of the Serbian Association for the Use of Animals in Research and Education and are in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Isolation of myometrial plasma membranes

Myometrial plasma membranes (MPM) were isolated by the modified method described previously [25]. The animals were killed by decapitation; uteri excised, rinsed in saline, and muscle strips were isolated. All steps of tissue isolation and homogenization were performed on ice. Homogenization was performed in cold isolation buffer (5 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 0.32 M sucrose) using an Ultra Turrax homogenizer (Ika Werk, Janke & Kunkel, Germany), at 3/4 of the maximum speed for 60 s. In second step, the suspension was further homogenized with 20 strokes in Potter homogenizer, with Teflon pestle at 900 rpm. Crude homogenate was filtrated through three-

layer surgical gauze and centrifuged for 10 min at $1,000\times g$. The supernatant was saved and pellet was resuspended in 10 ml of the same medium and centrifuged again under the same centrifugal force and for the same time. The supernatants were pooled together and centrifuged for 35 min at $10,000\times g$. The pellet was discarded and supernatant was centrifuged at $50,000\times g$ for 60 min. The resulting pellet was resuspended in 5 mM TRIS–HCl and frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, over night.

Next day, this suspension was homogenized with ten strokes of a manual homogenizer and placed on the top of discontinuous gradient of sucrose. The gradient was centrifuged for 120 min at $100,000\times g$, in ultracentrifuge at $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. The fractions between 1.2–1.0 and 1.0–0.8 M sucrose were pooled together and washed by centrifugation (35 min at $11,000\times g$) with 5 mM TRIS–HCl (pH 7.4) to eliminate sucrose in preparation. The plasma membranes were resuspended in 5 mM TRIS–HCl (pH 7.4), and then homogenized with manual homogenizer. The membrane preparations were kept at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

Protein determination

Protein was measured according to the modified Lowry procedure for determination of membrane proteins and lipoprotein samples [26].

Enzyme assays

Enzyme activity was determined by measuring the amount of liberated inorganic phosphate (Pi). The Pi was assayed according to Pennial method [27]. The incubation mixture contained 1 mM MgCl_2 , 50 mM TRIS–HCl, pH 7.4 (unless otherwise indicated), and 7 μg membrane protein in a final volume of 200 μl . The reaction medium with MPM was preincubated for 10 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The assay was initiated by adding the substrate (ATP or ADP, as indicated). Incubation lasted 5 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in water bath, and reaction was stopped by the addition of 22 μl 3 M perchloric acid. The samples were chilled in ice for 15 min before assaying. The concentration of inorganic phosphate, liberated from the hydrolysis of ATP and ADP was measured by spectrophotometric method on 700 nm. Incubation times and protein concentration were chosen to ensure the linearity of the reactions. Experiments were repeated at least three times in triplicate with different enzyme preparations. In order to correct non-enzymatic hydrolysis, controls were performed by adding MPM after the reaction was stopped. Enzyme activities were expressed as nmol Pi/min/mg of protein.

In order to find optimal experimental conditions for maximal enzyme activity, ATP and ADP hydrolysis were measured as a function of temperature ($20\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$), time

(1–30 min), and protein concentration (5–50 μg). The effect of pH on enzyme activity was measured in the range between 5.5 and 9.0, using buffers MES (pH 5.5–7.0) and TRIS (7.0–9.0). All assay optimization experiments were carried out in reaction medium containing 50 mM buffer, 5 mM Mg^{2+} , and 1 mM substrate (unless otherwise indicated).

In order to determine cation dependency, hydrolysis rates were measured; without added divalent ions in incubation medium, without added cations plus 1 mM EDTA, and in the presence of calcium and magnesium ions in range 0.5–2.0 mM (without EDTA).

Kinetic parameters were determined using substrates in range 0.05–2.0 mM, in the presence of 1 mM MgCl_2 . Data were fitted to the Michaelis–Menten equation using Microcal Origin software (Version 7.5). The Eadie–Hofstee plots were used to calculate apparent Michaelis–Menten constant (K_m , app) and maximal velocity (V_{max} , app).

In order to examine if both substrates were hydrolyzed by a single active site, we assayed the combination of ATP and ADP concentrations in a Chevillard competition plot [28]. We chose substrate concentrations at which the rate of hydrolysis was the same for both substrates. Then a series of solutions containing different ratios (P) of ATP/ADP were made. The P values ranged from 1 to 0. At $P = 0$, ATP was 0.25 mM and ADP was 0 mM; while at $P = 1$, ADP was 0.5 mM and ATP was 0 mM.

Sensitivity to inhibitors

In order to evaluate the correlation between the enzymatic activity described in this study with other ATPases, specific inhibitors for P-type, F-type, V-type ATPase, alkaline phosphatases, and NTPDases were tested.

The inhibitors used were:

1. sodium azide, inhibitor of mitochondrial ATPase and also inhibitor of NTPDase at millimolar concentrations [29];
2. oligomycin, inhibitor of mitochondrial ATPase;
3. sodium orthovanadate, an inhibitor of ion transporting ATPases, there is also evidence that orthovanadate can inhibit soluble NTPDases from rat blood serum [30];
4. ouabain, a specific inhibitor of Na^+/K^+ -ATPase;
5. theophylline, inhibitor of the phosphodiesterase;
6. fluoride, phosphatases inhibitor;
7. levamisole, a specific alkaline phosphatase inhibitor;
8. suramin, ecto-ATPase inhibitor at the low micromolar range;
9. EDTA, chelating agent for magnesium and NTPDases inhibitor at low millimolar range [31, 32].

The results are expressed as a mean percent enzyme activity compared to corresponding control value.

RT-PCR analysis

Total RNA from rat uterus was isolated using the TRI Reagent Solution. RNA concentration was measured using the 260-nm absorbance, and purity was determined applying the 260/280 nm absorbance ratio recorded by a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Additionally, RNA quality was assessed by electrophoresis in a 1.0 % agarose gel containing ethidium bromide (0.5 µg/ml). Reverse transcription was carried out with First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Fermentas) from 2.5 µg of the total RNA with a random hexamer primer, according to the instructions of the manufacturer. cDNA reactions were performed in a final volume of 20 µl, for 1 h at 37 °C. As a control for cDNA synthesis, reverse transcription with PCR (RT-PCR) for GAPDH was performed (data not shown). Two microliters of the RT reaction mix (200 ng) were used for PCR amplification in a total volume of 25 µl, which included 0.25 µM of each specific primer, 2.1 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTP mix (deoxy-nucleotide triphosphate), 1 U Taq polymerase, and 10× TrueStart Taq buffer. Conditions for all PCRs were as follow: Initial 1 min denaturation step at 94 °C, 1 min at 94 °C, 1 min annealing step (NTPDase 1, 3, and 8: 65 °C; NTPDase 2: 66 °C; GAPDH: 58 °C), 1 min extension step at 72 °C for 30 cycles, and a final 10 min extension at 72 °C. The amplification products were: NTPDase1, 543 bp; NTPDase2, 331 bp; NTPDase3, 267 bp; and NTPDase8, 394 bp. Primer sets used for rat Entpd1 (CD39), Entpd2 (CD39L1), Entpd3 (CD39L3), and Entpd8 RT-PCR were described previously [33]. PCR products (20 µl) were analyzed on a 1.5 % agarose gels containing ethidium bromide, visualized under UV light, and photographed with a Gel Doc 1000 system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules CA, USA). Negative controls were performed with nuclease-free water as template. cDNA from rat brain (NTPDase1, 2, and 3) and liver (NTPDase8) [34] were used as positive controls. O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder was used as molecular marker.

Statistical analysis

Data were analyzed by Student's test or one-way analysis of variance (ANOVA), considering a level of significance of 5 and 1 %.

Results

Conditions for incubation

Assay optimization was performed by varying the incubation temperature, time, protein concentration, and range of pH.

The time course for ATP and ADP hydrolysis at different time points (1–30 min) was linear up to 5 min in the presence of 5.0 mM Mg²⁺ and 1.0 mM substrate (Fig. 1). Previously, enzyme activity was measured in dependence of temperature (20–45 °C), and maximal activity for both substrates was at 37 °C. Enzyme activity as a function of protein concentration (5–50 µg per tube in a final volume of 200 µl) was linear in the range of 5–15 µg protein (results not shown). Based on these results, 7 µg of protein and 5 min of incubation on 37 °C were chosen for further experiments.

The effect of pH on ATP and ADP hydrolysis was performed in the range between 5.5 and 9.0. The pH of MES buffer was adjusted in the range of 5.5–7.0 and TRIS from 7.0 to 9.0. The optimum pH was found to be 8.0 for ATP hydrolysis, and 8.5 for ADP hydrolysis (Fig. 2). These pH values are in accordance with those previously described for E-NTPDases [31]. However, in the following experiments, NTPDase assay conditions (pH 7.4) were chosen to minimize activity of ecto-enzymes with highly alkaline pH optimum; ecto-alkaline phosphatase and E-NPPases.

Cation dependence

The influence of divalent cations on enzyme activation was tested in the absence or the presence of added calcium and magnesium ions in range 0.5–2.0 mM. Maximal activity was observed at the 1.0 mM for both Ca²⁺ and Mg²⁺. Magnesium was slightly better activator of ATP hydrolysis, and ADPase activity was the same in the presence of both cations (Fig. 3). Considering results, 1 mM Mg²⁺ was

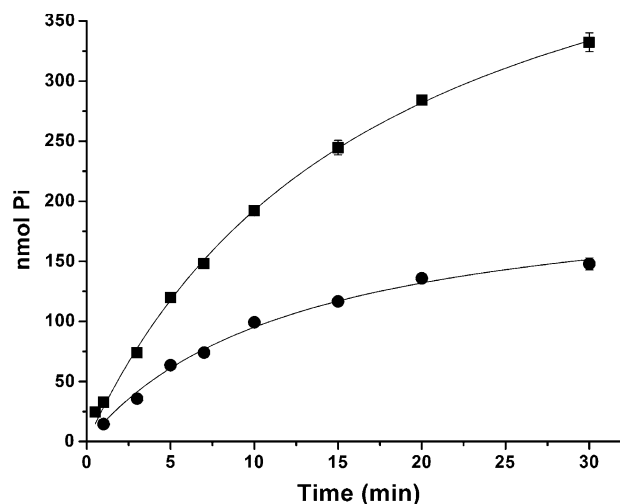


Fig. 1 Time course of ATP and ADP hydrolysis. The membrane preparations (7 µg of protein) were incubated with ATP (square) and ADP (circle), 1.0 mM plus 5.0 mM MgCl₂, as described in “Material and methods” section. Plots are representative of three experiments for each substrate

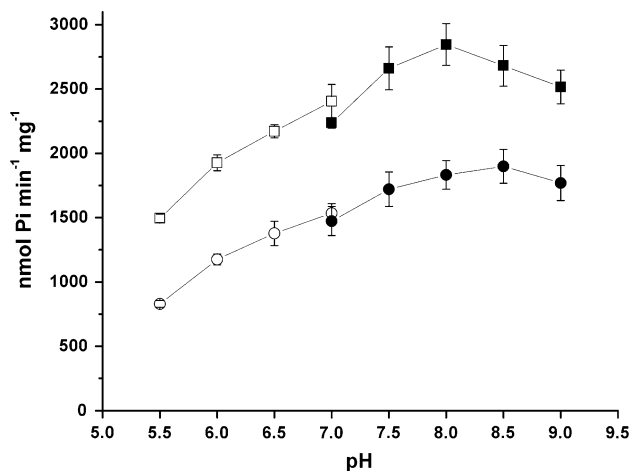


Fig. 2 Effect of pH on hydrolysis of ATP (*square*) and ADP (*circle*). Activities were assayed at 37 °C in 50 mM buffers, MES pH = 5.5–7.0 (open symbols) and Tris pH = 7.0–9.0 (closed symbols), containing 5 mM MgCl₂. Data represents the mean ± SE for *n* = 3 in triplicate

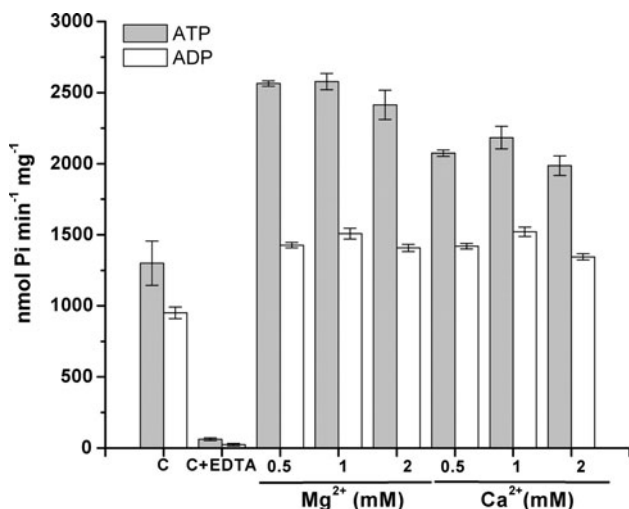


Fig. 3 Cation dependence for ATP (*gray bars*) and ADP (*white bars*) hydrolysis in the rat myometrial plasma membranes. Control groups (C) were incubated without addition of divalent cations and in the presence of nucleotides at 1 mM. Concentration of EDTA used in experiment was 1 mM. Results are expressed as nmolPi/min/mg protein. Data represents the mean ± SE of three different experiments

used for subsequent enzyme assays with optimal ratio 1.0 mM/1.0 mM for substrate/divalent cations. Activity detected without divalent cations in reaction mixture was abolished by adding 1 mM EDTA. This endogenous activity indicates the presence of divalent cations in membrane preparation. Moreover, 1 mM EDTA, tested as an inhibitor in the presence of 1 mM Mg²⁺, significantly decreased ATP and ADP hydrolysis, confirming cation dependence (Table 1).

Sensitivity to inhibitors

Several inhibitors have been used to estimate possible contribution of other ATPases in the membrane preparation, different from NTPDases, and in ATP and ADP hydrolysis detected in myometrial plasma membranes (Table 1).

Ouabain, oligomycin, theophylline, and levamisole have no significant effect on hydrolysis of ATP and ADP, excluding the presence of Na⁺, K⁺-ATPase, F1F0-ATPase, alkaline phosphatase, and phosphodiesterase activity.

Sodium azide, tested at 1.0, 5.0, and 10 mM, showed parallel inhibition of ATP and ADP hydrolysis rates. Concentration above 1.0 mM significantly reduced enzyme activity (*P* < 0.01) compared to control. Inhibitor of transport ATPase, ortovanadate (0.1 mM), caused significant inhibition of enzyme activity (*P* < 0.01). Ortovanadate decreased ADPase (30 %) more efficiently compared to ATPase activity (15 %). Sodium fluoride (1 mM), inhibitor of phosphatases, significantly inhibited hydrolysis of ATP (*P* < 0.05) and ADP (*P* < 0.01). In the presence of 1 mM EDTA, NTPDase activity was significantly decreased (*P* < 0.01). Suramine (0.3 mM), an inhibitor of P2 receptors and NTPDases, reduced about 50 % of enzyme activity for both substrates (*P* < 0.01).

Kinetic parameters

ATP and ADP hydrolysis were determined using substrate concentrations in range 0.05–2.0 mM. ATPase activity increased up to 1.0 mM ATP. Further increasing substrate concentration, at fixed magnesium concentration, caused activity decrease (data not shown). Inhibition of NTPDase activity at higher substrate concentrations was observed previously [4, 35, 36], indicating that true substrate for enzyme is nucleotide-cation complex.

The apparent *K_m* values for ATP and ADP hydrolysis were 506.4 ± 62.1 and 638.8 ± 31.3 μM (mean ± SE, *n* = 3), respectively. The apparent maximal velocities (*V_{max, app}*) were 3,973.0 ± 279.5 and 2,853.9 ± 79.8 (mean ± SE, *n* = 3) nmol Pi/min/mg protein for ATP and ADP, respectively (Fig. 4). The ATP/ADP ratio of hydrolysis was 1:0.66.

A single active site

Chevallard competition plot was performed by choosing concentrations at which rates of hydrolysis were the same for both substrate (1,100 nmol Pi/min/mg), and then using a sequence of mixtures with different ratio of ATP and ADP concentrations, as indicated in Materials and Methods. The horizontal straight line obtained in the

Table 1 Effects of inhibitors on ATP and ADP hydrolysis in myometrial plasma membranes

Inhibitor	Concentration (mM)	% control enzyme activity	
		ATPase	ADPase
Sodium azide	1.0	93.7 ± 1.6	94.8 ± 2.4
	5.0	83.1 ± 1.1**	87.1 ± 1.8**
	10.0	75.5 ± 0.5**	79.2 ± 1.5**
Theophylline	1.0	97.6 ± 0.3	92.3 ± 0.6
Sodium fluoride	1.0	91.1 ± 0.7*	82.9 ± 1.8**
Oligomycin	2 µg/ml	92.3 ± 2.4	90.8 ± 4.7
Ouabain	1.0	92.7 ± 2.3	93.6 ± 1.0
Orthovanadat	0.1	86.3 ± 0.8**	71.6 ± 3.0**
EDTA	1.0	68.7 ± 2.6**	45.9 ± 1.0**
Suramin	0.3	48.2 ± 1.4**	46.5 ± 2.2**
Levamisole	1.0	89.5 ± 4.3	95.3 ± 4.4

Results are expressed as mean ± SE ($n = 3$) percentage of control activity. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA, followed by Tukey test. Control activity was $2,279.8 \pm 59.9$ and $1,117.2 \pm 19.0$ nmol/min/mg protein for ATP and ADP hydrolysis, respectively

* Significant difference from control activity by one-way ANOVA ($P < 0.05$)

** Significant difference from control activity by one-way ANOVA ($P < 0.01$)

competition plot indicates that hydrolysis of ATP and ADP occurs at the same active site of a single enzyme (Fig. 5).

RT-PCR analysis

We investigated the mRNA expression of Entpd1 (CD39), Entpd2 (CD39L1), Entpd3 (CD39L3), and Entpd8 in rat uterus (Fig. 6). The result of RT-PCR analysis has shown PCR amplification products of expected sizes for Entpd1, 2, and 8. However, Entpd8 gave a barely visible signal, while Entpd3 mRNA was undetectable in rat uterus.

Discussion

The results of present study demonstrate high extracellular hydrolysis of ATP and ADP in rat uterus. Both enzyme activities were characterized and expression of E-NTPDases was identified.

As our experiments designed to determine the optimal conditions for ATP and ADP hydrolysis considering time course, temperature, protein concentration, and pH, as well as to test Ca^{2+} and Mg^{2+} dependence of observed enzyme activity, indicated that ATP and ADP hydrolyzing activity detected in MPM could be due NTPDase, we aimed to exclude possible involvement of other ATPase.

Sodium azide applied in the low micromolar concentration is sufficient to inhibit F1F0 ATPase and alkaline phosphatases. However, inhibition by azide used in millimolar range (5–20 mM) is decisive factor to distinguish NTPDase1 from NTPDase2. Azide at higher concentrations inhibits ADP hydrolysis of NTPDase1, by interfering with

the enzyme-ADP complex [29]. In our study, concentrations of azide above 1 mM significantly reduced enzyme activity and percent of inhibition was similar as reported by others [4, 37, 38]. Although the significant inhibition by ortovanadate may indicate contamination with V- or P-type ATPases, ortovanadate at low concentrations has been described as an inhibitor of NTPDases in human and rat serum [30, 39]. Hydrolysis of ADP was more sensitive to fluoride inhibition than ATPase activity, the effect that was previously found for E-ATPDase purified from chicken oviduct [29, 36]. Inhibition by EDTA was observed in previous studies [31] and could be explained by chelating magnesium ions. Percent of inhibition by suramine was in accordance with previous reports about NTPDase isolated from rat gastric mucosa [38] and human lymphocytes [31]. According to our result, suramine is the most potent inhibitor of NTPDase in rat myometrium.

Chevillard competition plot analysis indicates that ATP and ADP are hydrolyzed at one active site. The same protocol was used to demonstrate the presence of NTPDase enzyme in rat mandibular salivary glands [40], zebrafish brain [32], human platelets [39], and lymphocytes [31]. On the other hand, we detected mRNA expression of more than one E-NTPDase in rat uterus. Several plausible explanations for these results may be given. The most tempting one is that similar apparent K_m values for both substrates, the ATP/ADP hydrolysis ratio (1:0.66), and straight line on competition plot are indication for dominant enzyme activity in rat myometrial cell membranes, most likely NTPDase 1. Another possibility is the presence of combination of ecto-enzymes with sum activity similar to competition pattern of ATP and ADP.

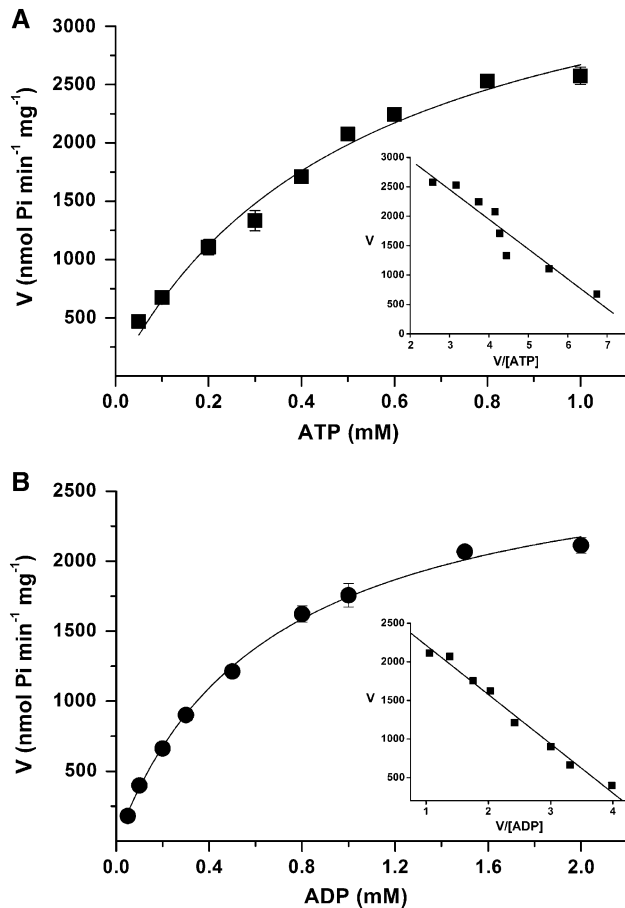


Fig. 4 Michaelis–Menten curves of initial velocities vs. raising concentrations of ATP (a) and ADP (b). Reaction rate was measured by released Pi, as described in Materials and methods. Results were obtained with a nucleotide concentration ranging from 0.05 to 2.0 mM. Symbols represent the mean specific activity (nmol Pi/mg/min) \pm SE of at least three experiments performed in triplicate. The insets show Eadie–Hofstee plots (V vs. V/S) of the data presented in the figures

Using RT-PCR analysis, we found the mRNA expression of Entp1, 2, and 8. The presence of NTPDase1 and 2 proteins was previously demonstrated on uterine blood vessels and smooth muscles, but no immunoreactivity of NTPDase8 was observed [22]. It is reasonable to assume that ENTPDase8 remained undetectable due to the low protein abundance in tissue, while mRNA level we detected by RT-PCR was found to be low, as well.

As we demonstrated in this study, NTPDase activity in rat myometrium appeared to be extremely high when compared to the activities found in other rat tissues [37, 40, 41]. Magnesium-dependent ATP hydrolysis with comparable activity in rat myometrium was previously reported [21], although the physiological significance was not clear. Most purinoceptors are activated by nucleotides in micromolar range of concentrations. It was found that ATP concentrations above 10^{-6} M cause in vitro contractions of

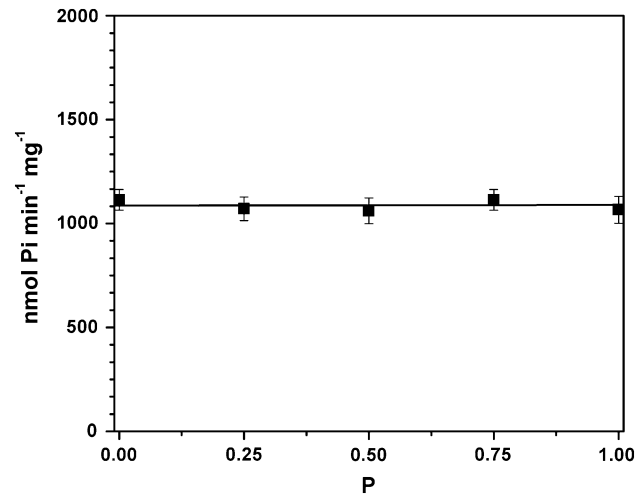


Fig. 5 Competition plot for hydrolysis of ATP and ADP in myometrial plasma membranes. The concentration at which the velocities were the same for ATP and ADP hydrolysis was chosen for Chevillard plot. Substrate A (ATP) at $P = 0$ was 0.25 mM, substrate B (ADP) at $P = 1$ was 0.5 mM. Data represents the mean \pm SE for at least three experiments

isolated pregnant human uterus [42]. High $K_m(\text{app})$ value of extracellular ATP hydrolysis found in rat myometrium exceeds physiological concentrations of ATP outside the cell ($<25 \mu\text{M}$), indicating that enzyme is not normally saturated with substrate and its activity is depend on variations in extracellular ATP. Moreover, high specific activity of myometrial NTPDase imply that enzyme is rapidly removing increased concentrations of ATP from extracellular space and generating substrate (AMP) directly for subsequent enzymes in hydrolytic chain—ecto-5'-nucleotidase and alkaline phosphatases.

The presence of purinoceptors in female reproductive organs is well documented [42, 43], supporting the significance of purinergic signaling in reproductive functions. In excitable cells, activation of both P2X and P2Y receptors results in increase of intracellular calcium. In the myometrium, changes in concentration of intracellular-free $[\text{Ca}^{2+}]$ are important in controlling balance between contraction and relaxation. Alterations in $[\text{Ca}^{2+}]$ level are controlled by multiple signaling pathways and may be triggered by number of mediators such as oxytocin, vasopressin, prostaglandins, epidermal growth factor [44], and proinflammatory cytokines [45]. ATP and adenosine stimulate myometrial contractions by a process that involves prostaglandin production, largely by endometrium [11]. Recent study suggests that ATP has another mechanism of action in uterine contraction. Extracellular ATP affects myometrial contractile frequency, in contrast with oxytocin and prostaglandin, which control force and amplitude of contraction [12]. This observation implies that ATP may be involved in same kind of pacemaking

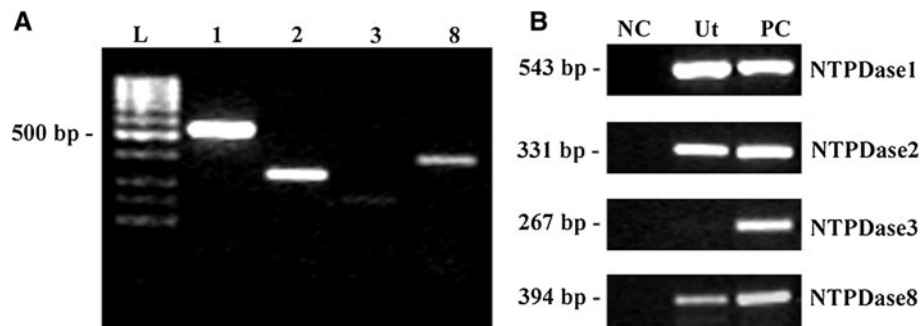


Fig. 6 RT-PCR analysis of E-NTPDases expression in rat uterus. Total RNA was isolated from rat uterus and cDNA was analyzed by PCR with specific primers (a), as described in “Materials and methods” section. (L) DNA Lader, (1) NTPDase1, (2) NTPDase2, (3)

NTPDase3, (8) NTPDase8. **b** cDNA from rat brain and liver were used as a positive controls (PC) and negative controls were performed with nuclease-free water (NC). The length (bp) of PCR products obtained with each pair of primers is given in the figure

mechanism, affecting initiation of contraction rather than its nature. Since P2X₄ receptor is highly permeable for calcium ions, it might be responsible for muscle contractions [18]. Literature data imply that NTPDases by oligomerization and assembly in the cell membrane, could function as Ca²⁺/Mg²⁺ channels, in addition to their catalytic activity [46]. Previous studies suggested the presence of more than one Ca²⁺/Mg²⁺ATPases, one of which was inhibited by oxytocin [47]. Disorder of the uterine contractility may have important role in conditions related with infertility [48], dysmenorrhea, and preterm labor.

Uterine stromal cells and blood vessels are also affected by ATP. P2X₇ receptors are expressed on stromal leukocytes, fibroblasts, and macrophages, suggesting that uterine immune function is regulated by ATP [14]. The local immune system plays an essential role in menstruation [45], uterine remodeling before implantation and during pregnancy. ATP is referred as a danger-associated molecule and pregnancy represents state of elevated physiological stress. Moderate elevation of extracellular ATP has an immunosuppressive effect by activating P2Y₁₁ receptors; however, higher levels activate low affinity P2X₇R, causing activation of inflammation. Increased plasma ATP and adenosine levels [49] accompanied with decreased ecto-apyrase activity in tissue are associated with pathological condition in pregnancy—pre-eclampsia [50].

In summary, the enzyme described here has the general properties characteristic for NTPDases: (a) divalent cation dependence; (b) alkaline pH optimum for both substrates, (c) insensitivity to some of classical ATPase inhibitors (ouabain, oligomycin, theophylline, and levamisole), and (d) inhibition by suramine and high concentration of sodium azides (5 mM). While similar apparent Km values for both substrates, the ATP/ADP hydrolysis ratio, and Chevillard competition plot indicate prevalence of NTPDase 1 activity [51], RT-PCR analysis revealed expression of NTPDase 2 and 8 on the surface of rat myometrial cell membranes.

In view of the above, the ectonucleotidase by hydrolyzing ATP and generating its metabolites with distinct signaling properties significantly alters purinergic signaling, enabling diverse mechanisms of ATP action in uterine tissue. Involvement in reproductive physiology, especially in uterine contraction, introduces NTPDases as potential drugs targets in case of pathological conditions such as dysmenorrhea and preterm labor.

Acknowledgments This work is part of a PhD thesis by Maja Milošević and was supported by Serbian Ministry of Education and Science, project grants no. 173044 and 41014.

References

1. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32:19–29
2. Ralevic V (2009) Purines as neurotransmitters and neuromodulators in blood vessels. *Curr Vasc Pharmacol* 7:3–14
3. Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240:31–304
4. Demenis MA, Furriel RP, Leone FA (2003) Characterization of an ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 activity in alkaline phosphatase-depleted rat osseous plate membranes: possible functional involvement in the calcification process. *Biochim Biophys Acta* 1646:216–225
5. Pellegatti P, Falzoni S, Donvito G, Lemaire I, Di Virgilio F (2011) P2X₇ receptor drives osteoclast fusion by increasing the extracellular adenosine concentration. *FASEB J* 25:1264–1274
6. Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783:673–694
7. Plesner L (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 158:141–214
8. Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409–430
9. Rajagopal M, Fischer H, Widdicombe JH (2008) Hormonal and purinergic stimulation of bicarbonate secretion in oviducts of rhesus monkey. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E55–E62

10. Wang XF, Chan HC (2000) Adenosine triphosphate induces inhibition of Na(+) absorption in mouse endometrial epithelium: a Ca(2+)-dependent mechanism. *Biol Reprod* 63:1918–1924
11. Aitken H, Poyser NL, Hollingsworth M (2001) The effects of P2Y receptor agonists and adenosine on prostaglandin production by the guinea-pig uterus. *Br J Pharmacol* 132:709–721
12. Hutchings G, Gevaert T, Deprest J, Nilius B, Williams O, De Ridder D (2009) The effect of extracellular adenosine triphosphate on the spontaneous contractility of human myometrial strips. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 143:79–83
13. Ziganshin AU, Zaitcev AP, Khasanov AA, Shamsutdinov AF, Burnstock G (2006) Term-dependency of P2 receptor-mediated contractile responses of isolated human pregnant uterus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 129:128–134
14. Koshi R, Coutinho-Silva R, Cascabulho CM, Henrique-Pons A, Knight GE, Loesch A, Burnstock G (2005) Presence of the P2X(7) purinergic receptor on immune cells that invade the rat endometrium during oestrus. *J Reprod Immunol* 66:127–140
15. Slater M, Murphy CR, Barden JA (2002) Purinergic receptor expression in the apical plasma membrane of rat uterine epithelial cells during implantation. *Cell Calcium* 31:201–207
16. Chang SJ, Wang TY, Lee YH, Tai CJ (2007) Extracellular ATP activates nuclear translocation of ERK1/2 leading to the induction of matrix metalloproteinases expression in human endometrial stromal cells. *J Endocrinol* 193:393–404
17. Katugampola H, Burnstock G (2004) Purinergic signalling to rat ovarian smooth muscle: changes in P2X receptor expression during pregnancy. *Cells Tissues Organs* 178:33–47
18. Urabe S, Miyoshi H, Fujiwara H, Yamaoka K, Kudo Y (2009) Enhanced expression of P2X4 and P2X7 purinergic receptors in the myometrium of pregnant rats in preterm delivery models. *Reprod Sci* 16:1186–1192
19. Fraser LR (2010) The “switching on” of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Mol Reprod Dev* 77:197–208
20. Magocsi M, Penniston JT (1991) Ca²⁺ or Mg²⁺ nucleotide phosphohydrolases in myometrium: two ecto-enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1070:163–172
21. Turi A, Torok K (1985) Myometrial (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase and its Ca²⁺ sensitivity. *Biochim Biophys Acta* 818:123–131
22. Martin-Satue M, Lavoie EG, Pelletier J, Fausther M, Csizmadia E, Guckelberger O, Robson SC, Sevigny J (2009) Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol* 131:615–628
23. Horvat A, Milosevic M, Demajo M (2009) Effects of metal ions on Mg(2+)-ATPase activity in plasma membranes isolated from the rat uterus. *Environ Chem Lett* 7:41–44
24. Milosevic M, Petrovic S, Demajo M, Horvat A (2005) Effects of metal ions on plasma membrane Mg²⁺-atpase in rat uterus and ovaries. *Ann N Y Acad Sci* 1048:445–448
25. Krall JF, Korenman SG (1979) Smooth muscle cell sarcolemma. Purification and properties of plasma membranes from the rat uterus. *Biochim Biophys Acta* 556:105–111
26. Markwell MAHS, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87:206–210
27. Penniall R (1966) An improved method for the determination of inorganic phosphate by the isobutanol-benzene extraction procedure. *Anal Biochem* 14:87–90
28. Chevillard C, Cardenas ML, Cornish-Bowden A (1993) The competition plot: a simple test of whether two reactions occur at the same active site. *Biochem J* 289(Pt 2):599–604
29. Knowles AF, Nagy AK (1999) Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. *Eur J Biochem* 262:349–357
30. Osés JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rucker B, Furstenuau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ (2004) Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci* 74:3275–3284
31. Leal DB, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CA, da Silva JE, Morsch VM, Schetinger MR (2005) Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1721:9–15
32. Rico EP, Senger MR, Fauth Mda G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD (2003) ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci* 73:2071–2082
33. Furstenuau CR, Ramos DB, Vuaden FC, Casali EA, Monteiro Pde S, Trentin Dda S, Gossenheimer AN, Bogo MR, Bonan CD, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ, Wofchuk ST (2010) L-NAME-treatment alters ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats. *Life Sci* 87:325–332
34. Fausther M, Lecka J, Kukulski F, Levesque SA, Pelletier J, Zimmermann H, Dranoff JA, Sevigny J (2007) Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G785–G795
35. Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JJ (1995) Inhibition and kinetic alterations by excess free ATP and ADP of the ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. *Biochem Mol Biol Int* 35:499–506
36. Strobel RS, Nagy AK, Knowles AF, Buegel J, Rosenberg MD (1996) Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase. Purification and characterization. *J Biol Chem* 271:16323–16331
37. Menezes de Oliveira E, Oliveira Battastini AM, Meirelles MN, Menezes Moreira C, Dutra Dias R, FS JJ (1997) Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in sarcolemmal membrane from rat heart. *Mol Cell Biochem* 170:115–123
38. Savegnago L, Nogueira CW, Fachineto R, Rocha JB (2005) Characterization of ATP and ADP hydrolysis activity in rat gastric mucosa. *Cell Biol Int* 29:559–566
39. Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ (1996) ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7:225–230
40. Henz SL, Ribeiro CG, Rosa A, Chiarelli RA, Casali EA, Sarkis JJ (2006) Kinetic characterization of ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in cells cultured from submandibular salivary glands of rats. *Cell Biol Int* 30:214–220
41. Boeck CR, Sarkis JJ, Vendite D (2002) Kinetic characterization and immunodetection of ecto-ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int* 40:449–453
42. Bardini M, Lee HY, Burnstock G (2000) Distribution of P2X receptor subtypes in the rat female reproductive tract at late prooestrus/early oestrus. *Cell Tissue Res* 299:105–113
43. Gillman TA, Pennefather JN (1998) Evidence for the presence of both P1 and P2 purinoceptors in the rat myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:592–599
44. Sanborn BM (2007) Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics. *Semin Cell Dev Biol* 18:305–314
45. Critchley HO, Kelly RW, Brenner RM, Baird DT (2001) The endocrinology of menstruation—a role for the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55:701–710
46. Schreiber HM, Kannan S (2004) Regulatory role of E-NTPase/E-NTPDase in Ca²⁺/Mg²⁺ transport via gated channel. *Theor Biol Med Model* 1:3
47. Soloff MS, Sweet P (1982) Oxytocin inhibition of (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity in rat myometrial plasma membranes. *J Biol Chem* 257:10687–10693
48. Zervomanolakis I, Ott HW, Hadziomerovic D, Mattle V, Seeber BE, Virgolini I, Heute D, Kissler S, Leyendecker G, Wildt L

- (2007) Physiology of upward transport in the human female genital tract. *Ann N Y Acad Sci* 1101:1–20
49. Escudero C, Sobrevia L (2008) A hypothesis for preeclampsia: adenosine and inducible nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelium. *Placenta* 29:469–483
50. Bakker WW, Donker RB, Timmer A, van Pampus MG, van Son WJ, Aarnoudse JG, van Goor H, Niezen-Koning KE, Navis G, Borghuis T, Jongman RM, Faas MM (2007) Plasma hemopexin activity in pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 26:227–239
51. Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299–309

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Maja S. Milošević

Broj upisa _____

Studijski program biohemija

Naslov rada

**Karakterizacija ektoenzima koji hidrolizuju vanćelijski ATP i ADP u uterusu
pacova i *in vitro* uticaj kadmijuma, žive i bakra na aktivnost enzima**

Mentori

dr Miroslav M. Vrvic, redovni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Anica Horvat, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke "Vinča"

Potpisani Maja S. Milošević

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.08.2014.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Karakterizacija ektoenzima koji hidrolizuju vanćelijski ATP i ADP u uterusu pacova i *in vitro* uticaj kadmijuma, žive i bakra na aktivnost enzima

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.08.2014.



1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.