

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Nataša LJ. Mitrović

**VANĆELIJSKI METABOLIZAM  
ADENINSKIH NUKLEOTIDA U  
SINAPTOZOMIMA HIPOKAMPUSA  
PACOVA – POLNE SPECIFIČNOSTI I  
ULOGA ŽENSKIH POLNIH HORMONA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Nataša LJ. Mitrović

**METABOLISM OF EXTRACELLULAR  
ADENINE NUCLEOTIDES IN RAT  
HIPPOCAMPAL SYNAPTOSOMES - SEX  
DIFFERENCES AND THE ROLL OF  
FEMALE SEX STEROIDS**

DOKTORAL DISSERTATION

BELGRADE, 2016.

## **Mentori i članovi komisije:**

### **Mentori:**

Dr Ivana Grković, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

### **Članovi komisije:**

Dr Ivana Bjelobaba, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr Predrag Vujović, docent, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Miroslav Adžić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Datum odbrane:

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke Vinča u okviru projekata finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: OI 173044- „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama CNS-a i perifernog tkiva kod sisara“ pod neposrednim rukovodstvom dr Anice Horvat i III 41014- „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ pod neposrednim rukovodstvom dr Sanje Peković.*

*Hvala dr Anici Horvat na ukazanom poverenju i velikoj podršci koju mi je pružala za vreme rada. Hvala joj što mi je pružila priliku da radim u njenom timu.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki, dr Ivani Grković, na trudu i vremenu koje je uložila u ovu tezu, na sveobuhvatnoj pomoći, podršci i savetima. Hvala joj što je uvek bila tu da sa mnom подели svoje znanje i iskustvo, da me nauči kako da se bolje organizujem, i pre svega hvala na prijateljstvu.*

*Veliku zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Nadeždi Nedeljković za nesebičnu pomoć i dostupnost u svakom trenutku tokom mog eksperimentalnog rada, dragocene stručne sugestije i vremenu koje je uložila u ovu disertaciju.*

*Hvala dr Miroslavu Adžiću na prijateljskoj pomoći, detaljnom čitanju teksta, konstruktivnim savetima, diskusijama i divnoj saradnji. Veliko hvala na svim pozajmicama.*

*Dr Ivani Bjelobabi zahvaljujem na nesebičnoj pomoći i dragocenim savetima tokom izrade ove teze.*

*Docentu Predragu Vujoviću zahvaljujem na korisnim savetima prilikom sređivanja ovog rukopisa.*

*Veliko hvala kolegicama dr Dunji Drakulić, dr Jeleni Zlatković, Marini Zarić, Ivani Guševac i kolegi dr Milošu Stanojloviću na nesebičnoj pomoći kao i na vedroj atmosferi u laboratoriji.*

*Hvala svim kolegama Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke Vinča koji su na bilo koji način pomogli u izradi ove teze.*

*Mojoj majci hvala na svemu. Mom ocu hvala na podršci koju mi je pružao tokom svog kratkog života.*

*Posebno hvala Ivanu na nesebičnoj pomoći, strpljenju, podršci i ljubavi.*

*VELIKO hvala na strpljenju mojim anđelima Jani i Lazaru!!! Hvala na radosti koju unosite u moj život!!!*

## **Vanćelijski metabolizam adeninskih nukleotida u sinaptozomima hipokampusa pacova – polne specifičnosti i uloga ženskih polnih hormona**

### **SAŽETAK**

Adenozin-5'-trifosfat (ATP) u centralnom nervnom sistemu (CNS) ima ulogu brzog ekscitatornog neurotransmitera i kotransmitera ali i trofičkog faktora, gliotransmitera i signalnog molekula koji učestvuje u komunikaciji između ćelija CNS. Kada se oslobodi u vanćelijski prostor, npr. sinaptičku pukotinu i aktivira odgovarajuće receptore (P1 i P2), ATP se brzo degradira, posredstvom enzima ektonukleotidaza. Primarna uloga ovih enzima je sekvencijalna hidroliza adeninskih nukleotida, kao što su ATP, adenozin-5'-difosfat (ADP) i adenozin-5'-monofosfat (AMP) čime nastaje nukleozid adenozin, potentni neuromodulator i homeostatski regulator u CNS. S obzirom na to da koncentracije vanćelijskog ATP i adenozina direktno zavise od stepena aktivnosti ektonukleotidaza, svaka promena ekspresije i aktivnosti ovih enzima može biti relevantna u kontekstu fiziologije i patologije. Oskudni literaturni podaci ukazuju da su ektonukleotidaze deo složene molekulske mreže koja je pod uticajem polnih hormona. Kako ženski polni hormoni, pogotovo  $17\beta$ -estradiol (E2), utiču na gustinu sinapsi, složenost dendritskih grananja i broja trnolikih izraštaja u hipokampusu, ostvarajući tako snažan uticaj na sinaptičku plastičnost, učenje i pamćenje kod pacova oba pola, u ovoj tezi ispitan je uticaj hormonskog statusa i mehanizam regulacije/modulacije sinaptičkih ektonukleotidaza, ektonukleozid 5'-trifosfat difosfohidrolaze 1-3 (NTPD-aza 1-3) i ekto-5'-nukleotidaze (eN)  $17\beta$ -estradiolom u hipokampusu ženki i mužjaka pacova. Takođe, ispitan je uticaj ponovljenog (sedmodnevnog) tretmana  $17\alpha$ -estradiolom (E $\alpha$ ), E2 i progesteronom (P4) na aktivnost i ekspresiju eN u totalnoj membranskoj frakciji hipokampusa oba pola.

Rezultati biohemijskih analiza ukazuju da aktivnost ispitanih ektonukleotidaza diskretno fluktuiraju tokom estrusnog ciklusa, kao i da uklanjanje jajnika (OVX), primarnog izvora ženskih polnih hormona, smanjuje nivo hidrolize ATP, ADP, AMP u sinaptozomima hipokampusa ženki pacova. Ovi nalazi jasno ukazuju na to da su ektonukleotidaze (NTPD-aza 1-3 i eN) pod regulatornom kontrolom endogenih hormona jajnika. Promena stepena hidrolize adeninskih nukleotida uočena je kod OVX ženki nakon jednokratnog tretmana E2, pri čemu je stepen hidrolize ATP i ADP povećan verovatno kao rezultat povećane ekspresije NTPD-aze 1 i 2, dok relativna zastupljenost NTPD-aze 3 ostaje nepromenjena. E2 takođe dovodi do porasta nivoa hidrolize AMP pri čemu reguliše/moduliše eN aktivacijom klasičnih unutarćelijskih estradiolskih receptora (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) koji različitim mehanizmima dovode do povećanja aktivnosti eN u sinaptozomima hipokampusa OVX ženki.

E2 moduliše vanćelijski metabolizam adeninskih nukleotida i u sinaptozomima hipokampusa mužjaka pacova. E2 smanjuje proteinsku ekspresiju i/ili aktivnost NTPD-aza

1, 2 i eN, ali ne menja relativnu zastupljenost NTPD-aze 3 u sinaptozomima hipokampusa mužjaka. Uprkos smanjenju aktivnosti NTPD-aza, E2 ne izaziva štetnu akumulaciju ATP i ADP, jer povećana aktivnost TNAP, nakon tretmana E2, ukazuje na potencijalnu eliminaciju viška ATP iz sinaptičke pukotine koji nastaje smanjenjem aktivnosti NTPD-aza 1-2, odnosno višak ADP koji se akumulira usled nepromenjene aktivnosti NTPD-aze 3. E2 na nivou eN ostvaruje kompetitivni tip inhibicije što ukazuje na moguću interakciju E2/eN u membrani. Takođe, eN je modulirana aktivacijom unutarćelijskih ER $\alpha$  i ER $\beta$ , ali i pokretanjem mehanizama nezavisnih od klasičnih ER.

Skoro 2,5 puta veća aktivnost eN izmerena je u P2 frakciji izolovanoj iz hipokampusa mužjaka pacova u odnosu na ženke u disetrusnoj fazi ciklusa i OVX. Rezultati analiza ekspresije totalne iRNK, kao i proteina i aktivnosti eN u membranskoj frakciji ukazuju da sedmodnevni tretmani E2 i P4 ispoljavaju različite efekte na nivou genske ekspresije eN u hipokampusu OVX ženki pacova, dok iste efekte ispoljavaju na nivou relativne količine proteina i aktivnosti eN. Za razliku od ženki, u hipokampusu intaktnih mužjaka, nakon hroničnih tretmana steroidnim hormonima, nije zabeležena promena eN ni na jednom ispitivanom nivou.

Može se zaključiti da su ektonukleotidaze u sinapsama hipokampusa oba pola regulisane/modulisane E2 ili samim procesima koje E2 inicira. Rezultati ove doktorske teze govore u prilog tome da poznati efekti E2 na nivou funkcionalnih karakteristika sinapsi u hipokampusu, mogu delom biti posledica zapaženih efekata na nivou ektonukleotidaza, enzima odgovornih za vanćelijsko formiranje adenoizina u CNS.

**KLJUČNE REČI:** ektonukleotidaze, ženski polni hormoni, estradiolski receptori  $\alpha$  i  $\beta$ , sinaptozomi, hipokampus, polne razlike

**NAUČNA OBLAST:** Biologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Neurobiologija

**UDK BROJ:** 577.175.6:577.25(043.3)

## **Metabolism of extracellular adenine nucleotides in rat hippocampal synaptosomes - sex differences and the roll of female sex steroids**

### **ABSTRACT**

Adenosine-5'-triphosphate (ATP) is an important extracellular signaling molecule. It acts as neurotransmitter, co-transmitter, gliotransmitter and trophic factor in the central nervous system (CNS). Upon the release, ATP modulates synaptic transmission by acting at either ionotropic (P2X) or metabotropic (P2Y) receptors, and is sequentially catabolized by the action of ectonucleotidases. The first step of ATP inactivation is mediated by the family of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), which are able to hydrolyze ATP and adenosine-5'-diphosphate (ADP) to adenosine-5'-monophosphate (AMP). The last and the rate-limiting step in of the ATP conversion is catalyzed by ecto-5'-nucleotidase (eN), which hydrolyses AMP to adenosine, potent neuromodulator and homeostatic regulator in the CNS. Since ectonucleotidases is crucial for maintaining of physiological levels of extracellular adenine nucleotides in the CNS, any alteration in their activity and expression can be relevant in context of physiology and pathology. Literature data indicate that ectonucleotidases may be part of complex molecular network which may be modulated by ovarian steroids. Based on this findings, and the fact that female sex steroids, particularly 17 $\beta$ -estradiol (E2) play an essential role in the modulation of hippocampal synaptic plasticity therefore influencing hippocampal dependent learning and memory, we hypothesized that steroid hormones, in particular E2 has potential to modulate the activity and expression of ectonucleotidases (NTPDase 1-3 and eN) in hippocampal synaptosomes of male and female rats. Also, the aim of this doctoral dissertation was to determine the impact of steroid hormones on eN after repeated administration of 17 $\alpha$ -estradiol, E2 and progesterone (P4) for seven consecutive days in hippocampus of both sexes.

It is shown that the activity of the examined ectonucleotidases fluctuates across the estrous cycle in the hippocampal synaptosomes of female rats, while significant reduction level of ATP, ADP and AMP hydrolysis is observed in hippocampal synaptosomes after bilateral ovariectomy. These results clearly indicate that examined ectonucleotidases are regulated/modulated by endogenous female sex steroids. Biochemical analysis indicate that acute E2 treatment in the OVX rats significantly increase the level of ATP and ADP hydrolysis, probably as a result of upregulated NTPDase 1 and 2, while E2 had no effect on NTPDase 3. The level of AMP hydrolysis was also augmented in hippocampal synaptosomes of OVX rats after E2 treatment. Our initial evaluation imply that regulatory E2 action at the activity and protein abundance of eN is mediated by both intracellular estradiol receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) through different mechanisms in hippocampal synaptosomes of OVX rats.

E2 also influence extracellular metabolism of adenine nucleotides in hippocampal synaptosomes of male rats. E2 downregulates expression and/or activity of NTPDase 1, NTPDase 2 and eN, and does not affect the NTPDase 3. Despite the reduction of NTPDase activity, E2 did not induce toxic accumulation of ATP and ADP in the extracellular space, since E2 treatment resulted in increased TNAP activity in male hippocampal synaptosomes, which indicates effective elimination of ATP and ADP in the synaptic cleft. In male hippocampal synaptosomes, E2 induce competitive inhibition of eN, which indicates possible E2/eN interaction in the cell membrane. eN activity might be modulated through activation of classic intracellular estradiol receptors and also through other mechanism which are independent of classical ER.

In the hippocampus obtained from male rats, more than 2.5-fold higher AMP hydrolysis was observed compared to females in diestrus state and OVX. Results obtained on eN-mRNA, protein abundance and eN activity level indicate that repeated E2 and P4 induced different effects on eN gene expression in hippocampus of OVX rats, while similar effects were observed on the level of protein expression and activity. In male rats, administered sex steroids did not affect hippocampal eN at any analyzed level.

In general, we can conclude that E2 differentially modulate/regulate NTPDase 1- 3 and eN in hippocampal synaptosomes of both sexes. These results may imply that known sex-specific effects of E2 on functional properties of hippocampal synapses may be in part mediated through observed action on ectonucleotidases, which participate in the formation of extracellular adenosine.

**KEY WORDS:** ectonucleotidases, female gonadal hormones, estradiol receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , synaptosomes, hippocampus, sex differences

**RESEARCH AREA:** Biology

**RESEARCH FIELD:** Neurobiology

**UDC NUMBER:** 577.175.6:577.25(043.3)



## SKRAĆENICE

4E-BP1- 4E-vezujući protein eukariotskog faktora inicijacije

ACR- apirazni konzervirani regioni

ADP- adenzin-5' difosfat

Akt- protein kinaza B

AMP- Adenzin-5' monofosfat

AMPA- Receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline

AP- alkalne fosfataze

AP1- aktivacioni protein-1

ATP- Adenzin-5' trifosfat

BSA- goveđi albumin iz seruma

cAMP- ciklični adenzin monofosfat

c-SRC- proto onkogen tirozin kinaza

CNS- centralni nervni sistem

CNT- koncentrišući nukleozidni transporteri

CREB- cAMP responsivni element

DAMP- signal povezan sa opasnošću

DG- dentatni girus

DHT- dihidrotestosteron

DIEST- diestrus

DEPC- dietilpirokarbonat

DMSO- dimetil-sulfoksid

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

DPN- 2,3-bis(4-Hidroksifenil)-propionitril, specifični agonista ER $\beta$

E2- 17 $\beta$ -estradiol

E $\alpha$ - 17 $\alpha$ -estradiol

E-BSA- E2 konjugovan sa goveđim albuminom iz seruma

E-NPP- ekto-nukleotid pirofosfataze/fosfodiesteraze

eN- ekto-5'-nukleotidaza

eNOS- endotelna sintaza azotmonoksida  
ENT- ekvilibrišući nukleozidni transporteri  
ER- estradiolski receptori  
ER-X- estradiolski receptor-X  
ERK 1/2- kinaze regulisane vanćelijskim signalima  $\frac{1}{2}$   
EST-estrus  
GDX- gonadektomija  
GPER1- estradiolski receptor spregnut sa G-proteinom  
GPI- glikozil-fosfatidilinozitol  
Hip- hipokampus  
HSP90- protein toplotnog stresa 90  
ICI- neselektivni antagonista ER (ICI 182.780)  
IGF-1- faktor rasta sličan insulinu-1  
 $K_m$  – Michaelis-ova konstanta  
LTP- dugotrajna potencijacija  
LU-laneno ulje  
MAPK- protein kinaza aktivirana mitogenima  
mGluR- metabotropni glutamatski receptori  
mPR- membranski progesteronski receptori  
mTOR- ciljni molekul za rapamicin kod sisara  
NCAM- ćelijski adhezivni molekuli neurona  
NDP- nucleozid difosfat  
Nlg-1- neurolignin 1  
NMDA - N-metil-D-aspartat receptori  
NTP- nukleozid trifosfat  
NTPD-aze- ekto-nukleozid 5'-trifosfat difosfohidrolaze  
OVX- ovarijektomija  
P4- progesteron  
p-NPP- para-nitrofenil fosfat  
PGRMC1- membranska komponenta progesterona 1

Pi- neorganski fosfat  
PI3K- fosfatidilinozitol 3-kinaza  
PKC- protein kinaza C  
PLC- fosfolipaza C  
PPi- pirofosfati  
PPT- 4,4',4''-(4-Propil-[1H]-pirazol-1,3,5-triyl)trisfenol, specifični agonista ER $\alpha$   
PR- progesteronski receptori  
PRO- proestrus  
PSA-NCAM- polisijalizovana forma ćelijskog adhezivnog molekula neurona  
PSD95- protein postsinaptičkih gustina 95  
RNK- ribonukleinska kiselina  
SERM- selektivni modulatori estradiolskih receptora  
Sp-1 – protein specifičnosti-1  
Syn1- sintaksin  
SYP- sinaptofizin  
T- testosteron  
TNAP- tkivno nespecifična alkalna fosfataza  
TrkB- tropomiozin kinaza B receptor  
UDP- uridin difosfat  
UTP- uridin trifosfat  
VNUT- vezikularni nuklearni transporter

## Sadržaj

I UVOD .....	1
1. Vanćelijski ATP: skladištenje i oslobađanje iz ćelija .....	2
2. Purinski receptori .....	4
3. Metabolizam vanćelijskih adeninskih nukleotida u CNS .....	6
3.1. Ekto-Nukleozid 5'-Trifosfat Difosfohidrolaze (NTPD-aze) .....	7
3.2. Ekto-5'-nukleotidaza (EC 3.1.3.5, CD73, eN) .....	11
3.3. Alkalne fosfataze .....	12
4. Ektonukleotidaze u sinaptičkom odeljku i njihova uloga u neurotransmisiji .....	12
5. Ženski polni hormoni u CNS .....	15
6. Mehanizmi delovanja polnih hormona .....	18
7. Efekti ženskih polnih hormona na nivou hipokampusa .....	21
7.1. Strukturna i funkcionalna organizacija hipokampusa .....	21
7.2. Fluktuacije hormona tokom estrusnog ciklusa dovode do fluktuacija u gustini sinapsi u hipokampusu .....	23
7.3. Efekti 17 $\beta$ -estradiola na nivou hipokampusa .....	24
8. Brza modulacija spinogeneze i sinaptogeneze 17 $\beta$ -estradiolom .....	26
9. Purinska signalizacija – polne specifičnosti i uloga polnih hormona .....	28
II CILJEVI .....	30
III MATERIJALI I METODE .....	32
1. Hemikalije .....	32
2. Eksperimentalne životinje i hirurške procedure .....	33
3. Tretman životinja .....	34
4. Priprema sinaptozoma .....	38
4.1. Izolovanje neprečišćene membranske frakcije (P2) .....	39
4.2. Izolovanje sinaptozoma .....	40
5. Određivanje koncentracije proteina .....	40
6. Određivanje enzimske aktivnosti ektonukleotidaza .....	41

6.1. Ispitivanje enzimske aktivnosti NTPD-aza .....	41
6.2. Ispitivanje enzimske aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze .....	42
6.3. Ispitivanje enzimske aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze nakon in vitro tretmana .....	42
7. Određivanje koncentracije neorganskog fosfata .....	43
8. Ispitivanje enzimske aktivnosti tkivno nespecifične alkalne fosfataze .....	44
9. Elektroforetsko razdvajanje proteina i imunoblot analiza .....	44
9.1. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu .....	44
9.2. Imunoblot analiza .....	45
10. Ko-imunoprecipitacija .....	47
11. Izolacija RNK i RT-PCR .....	48
11.1. Izolacija RNK .....	48
11.2. Određivanje koncentracije RNK .....	49
11.3. Semi-kvantitativni RT-PCR .....	50
12. Statistička analiza podataka .....	51
IV REZULTATI .....	52
1. Uloga ženskih polnih hormona u modulaciji vanćeljskog metabolizma adeninskih nukleotida u sinaptozomima hipokampusa .....	53
1.1. Fluktuacije ovarijalnih hormona tokom estrusnog ciklusa utiču na aktivnost NTPDaza u hipokampalnim sinaptozomima ženki pacova .....	53
1.2. Uticaj 17 $\beta$ -estradiola na aktivnost i ekspresiju NTPDaza 1-3 <i>in vivo</i> .....	55
1.3. Variranje nivoa ovarijalnih hormona tokom estrusnog ciklusa moduliše aktivnost i ekspresiju ekto-5'-nukleotidaze u hipokampalnim sinaptozomima ženki pacova .....	57
1.4. Kinetička analiza aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze u hipokampalnim sinaptozomima OVX ženki .....	59
1.5. Modulacija aktivnost i ekspresije eN 17 $\beta$ -estradiolom - uloga ER $\alpha$ i ER $\beta$ .....	61
1.6. Uloga ER $\alpha$ i ER $\beta$ u modulaciji aktivnosti eN <i>in vitro</i> .....	63
1.7. Fizička interakcija eN i ER u sinaptozomima hipokampusa OVX ženki .....	65
2. Uticaj 17 $\beta$ -estradiola na aktivnost i ekspresiju ektonukleotidaza u hipokampalnim sinaptozomima mužjaka pacova .....	66
2.1. Uticaj gonadektomije na hidrolizu adeninskih nukleotida .....	66

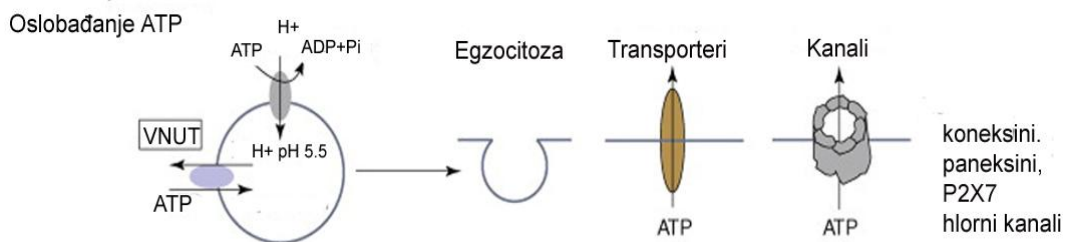
2.2. Uticaj E2 na aktivnost i ekspresiju NTPD-aza 1-3 u sinaptosomima hipokampusa mužjaka pacova.....	67
2.3. Uticaj 17 $\beta$ -estradiola na aktivnost tkivno nespecifične alkalne fosfataze.....	69
2.4. Uticaj 17 $\beta$ -estradiola na aktivnost i ekspresiju eN u sinaptosomima hipokampusa mužjaka pacova.....	70
2.5. Kinetička analiza aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze u sinaptosomima hipokampusa mužjaka pacova nakon tretmana E2.....	71
2.6. Uloga ER $\alpha$ i ER $\beta$ u modulaciji aktivnosti i ekspresije eN u sinaptosomima hipokampusa mužjaka pacova.....	72
2.7. Uloga ER $\alpha$ i ER $\beta$ u modulaciji aktivnosti sinaptičke eN mužjaka pacova <i>in vitro</i> .....	73
2.8. Jednokratni tretman E2 dovodi do sinaptičkih rearanžmana u hipokampusu mužjaka.....	75
3. Efekat sedmodnevnog tretmana steroidnim hormonima na aktivnost i ekspresiju eN u hipokampusu OVX ženki i mužjaka pacova.....	79
3.1. Bazalna ekspresija ekto-5'-nukleotidaze u hipokampusu pacova –polne specifičnosti i efekat ovarijektomije.....	79
3.2. Uticaj sedmodnevnog tretmana steroidnim hormonima na relativnu količinu eN-iRNK, proteina i hidrolizu AMP u hipokampusu OVX ženki i mužjaka pacova.....	81
V DISKUSIJA.....	83
1. 17 $\beta$ -estradiol pozitivno reguliše NTPD-azu 1 i 2 u sinaptosomima hipokampusa OVX ženki pacova.....	84
2. 17 $\beta$ -estradiol pozitivno reguliše ekto-5'-nukleotidazu u hipokampalnim sinaptosomima OVX ženki pacova aktivacijom klasičnih estradiolskih receptora.....	86
3. Sinaptički rearanžmani indukovani 17 $\beta$ -estradiolom praćeni su promenama u ekspresiji ektonukleotidaza u hipokampalnim sinaptosomima mužjaka pacova.....	90
4. Efekat ponovljenih (sedmodnevnih) tretmana E $\alpha$ , E2 i P4 na ekspresiju eN u hipokampusu mužjaka i OVX ženki.....	94
5. Potencijalne polne specifičnosti u metabolizmu vanćelijskih adeninskih nukleotida u hipokampusu.....	96
VI ZAKLJUČCI.....	99
VII LITERATURA.....	102
VIII PRILOZI.....	115

# I UVOD

Adenozin-5'-trifosfat (ATP) je sveprisutni molekul. Pored svoje uloge univerzalnog energetskog molekula u ćelijskim procesima, ATP je donor fosfatne grupe u reakcijama fosforilacije i polazni molekul u sintezi sekundarnog glasnika cikličnog adenozin monofosfata (cAMP). Poznato je, takođe, da ATP ima ulogu vanćelijskog signalnog molekula koji u nižim (mikromolarnim) koncentracijama ostvaruje trofičke i signalne uloge, a u visokim (milimolarnim) koncentracijama deluje kao „signal povezan sa opasnošću“ (engl. *Danger-associated molecular pattern*, DAMP). Vanćelijski ATP je kratkoživeći molekul koji se brzo defosforiliše u vanćelijskom prostoru do adenozina. Adenozin je potentni neuromodulator i homeostatski regulator u centralnom nervnom sistemu (CNS), koji aktivacijom svojih adenozinskih receptora reguliše neurotransmisiju, sinaptičku plastičnost i procese učenja i memorije. Osim uloge u nizu regulatornih procesa u CNS, nukleotidi i nukleozidi su važni učesnici u patološkim procesima vezanim za traumatsku povredu CNS, ishemiju, neurodegenerativna oboljenja, neuroinflamaciju, epilepsiju i neuropatski bol (Burnstock, 2015).

# 1. Vanćelijski ATP: skladištenje i oslobađanje iz ćelija

ATP je prisutan u svim ćelijama i svim ćelijskim organelama CNS, uključujući i ekscitatorne/sekretorne vezikule, te je oslobađanje ATP iz neurona, astrocita, mikroglia i ostalih ćelija CNS fiziološki proces. ATP se oslobađa u vanćelijsku sredinu i u odgovoru na različite patofiziološke signale, kao što su mehanički stimuli, ishemija ili pad energije, bakterijski endotoksini i ćelijski stres ili nakon različitih oštećenja CNS.



**Slika 1. Mehanizmi oslobađanja ATP u vanćelijski prostor** (Modifikovano Abbrachio i sar., 2008) (objašnjeno u tekstu).

Postoji više procesa čijim se posredstvom ATP oslobađa iz ćelija nervnog sistema u vanćelijsku sredinu (Slika 1):

- iz oštećenih ili ćelija koje umiru, preko oštećene ćelijske membrane;
- ATP može proći kroz intaktnu ćelijsku membranu, koristeći membranske ATP-transportere ili kanale, kao što su koneksinski ili paneksinski polu-kanali koji izgrađuju molekule za formiranje pukotinaste veze (engl. *gap junction*) (Lohman i Isakson, 2014) ili vezikularnim nukleotidnim transporterom (VNUT) iz neurona, ali i iz astrocita (Abdipranoto i sar., 2003; Darby i sar., 2003), membranskim voltažno-zavisnim anjonskim kanalima, i posredstvom P2X7 receptora (Lohman i Isakson, 2014; Fields i Burnstock, 2006);
- egzocitozom, iz sinaptičkih vezikula nervnih završetaka ili glijskih ćelija (Pankratov i sar., 2006).



U neuronima, ATP se sintetiše i pakuje u sinaptičke vezikule i oslobađa tokom depolarizacije nervnih ćelija, sam ili zajedno sa nekim od klasičnih neurotransmitera. Vezikularno oslobađanje ATP zavisi od depolarizacije membrane neurona, aktivacije Na<sup>+</sup> kanala i prisustva Ca<sup>2+</sup>, što je prvo pokazano na preparatima sinaptozoma celog mozga (White, 1977; Potter i White, 1982), a kasnije i na sinaptozomima kore prednjeg mozga (White, 1977; Salgado i sar., 1997), mahovinastih vlakana (Terrian i sar., 1989) i kičmene moždine (Sawynok i sar., 1993). Otkriće da neuroni sintetišu, pakuju i vezikularno oslobađaju ATP zajedno sa klasičnim neurotransmiterima u CNS, kao što su glutamat, acetilholin, noradrenalin,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina (GABA), dopamin, dovelo je do uspostavljanja termina kotransmisija (Burnstock, 2004).

Astroцити oslobađaju ATP koji može imati ulogu gliotransmitera. Signalizacija posredovana purinima, a posebno ATP, glavni je put signalizacije u međusobnoj komunikaciji astrocita, ali i preko kojeg astroцити deluju na nervne ćelije. ATP u ovoj ulozi deluje na presinaptičke završetke, tako što moduliše dalje oslobađanje neurotransmitera. ATP, oslobođen iz glijskih ćelija, može direktno stimulisati postsinaptičke neurone i dovesti do ekscitatornog ili inhibitornog odgovora, te su astroцити aktivni partneri sinapsama, jer dinamično regulišu sinaptičku transmisiju (Newman, 2001, 2003).

Iako je ATP važan signalni molekul, neurotransmiter i gliotransmiter, ovaj molekul pripada i grupi DAMP molekula, jer u vanćelijskoj sredini, u većim koncentracijama, može pokrenuti inflamatorni odgovor, ćelijsku smrt, neurodegeneraciju itd. Zato je kaskada oslobađanje-signalizacija-inaktivacija ATP izuzetno važna. Kao i ostali klasični transmitteri ali i molekuli DAMP grupe, ATP zadovoljava sledeće kriterijume (Di Virgilio, 2005):

- Visoke unutarćelijske koncentracije (5-10 mM);
- Zanemarljive vanćelijske koncentracije u fiziološkim uslovima (vanćelijska koncentracija ATP u uslovima mirovanja je u opsegu 1-10 nM i rezultat je ravnoteže između oslobađanja i razgradnje) (Agteresch i sar., 1999; Schwiebert, 2000);
- Velika mobilnost u pericelularnoj vodenoj sredini: ATP je mali molekul koji sadrži 2-4 negativne šarže u zavisnosti od pH i koncentracije jona Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> i stoga ima veliku brzinu difuzije u vanćelijskoj vodenoj sredini;

- Vezivanje za specifične receptore i pokretanje različitih signalnih procesa. Velika specifičnost i afinitet jonotropnih P2X i metabotropnih P2Y receptora za različite nukleotide i nukleozide čini ovu familiju receptora veoma fleksibilnom i efikasnom u prevođenju informacija od strane određenog liganda;
- Oslobođeni DAMP molekuli, kakav je ATP, moraju se brzo ukloniti iz vanćelijske sredine: uklanjanje ATP iz vanćelijske sredine je veoma efikasan proces, zahvaljujući enzimima ektonukleotidazama lociranim na ćelijskim membranama sa aktivnim mestom okrenutim ka vanćelijskoj sredini.

Interesantno je da defosforilacijom ATP ektonukleotidazama, u vanćelijskoj sredini nastaje drugi signalni molekul, potentni neuromodulator i neuroprotektor u CNS, adenzin, koji dalje aktivira P1 receptore. Nukleozide, finalne proizvode razgradnje ATP, ćelija lako preuzima posredstvom nukleozidnih transportera i potom ih uključuje u spasonosni put purina.

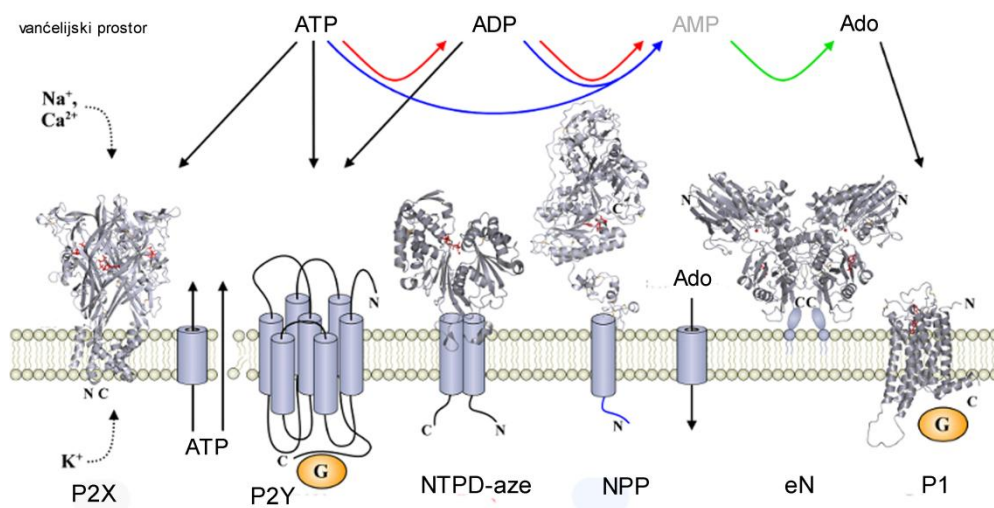
## 2. Purinski receptori

Veliki broj receptora za nukleotide i nukleozide i njihova široka rasprostranjenost u CNS ukazuju na značaj ovih purina kao osnovnih medijatora i neuromodulatora u komunikaciji između ćelija (Khakh i Burnstock, 2009). Vanćelijski ATP i proizvodi njegove hidrolize (ADP, adenzin) deluju na dva tipa receptora, P2 i P1 (Fields i Burnstock, 2006). P2 receptori vezuju purinske i pirimidinske nukleotide, dok P1 receptori sa visokim afinitetom vezuju adenzin. Oba tipa receptora aktivno učestvuju u različitim fiziološkim procesima u CNS (Abbracchio i sar., 2009).

P2 receptori se dele u dve klase, u zavisnosti od toga da li su ligand-zavisni jonski kanali (P2X) ili vezani za G-proteine (P2Y) (Slika 2). Do sada je potvrđeno postojanje nekoliko potklasa P2X (P2X1-7) i P2Y (P2Y1-14) receptora (Burnstock, 2006). P2X receptori dovode do brzog odgovora ćelije, jer omogućuju neselektivnu provodljivost  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , dovodeći do brzih promena membranskog potencijala. P2X receptori, homo- ili hetero-dimerizacijom, mogu formirati pore na membrani propustljive za jone. Svih sedam

P2X receptora se ekspirira na neuronima i astrocitima, a neki od njih i na oligodendrocitima, Švanovim ćelijama i u mikrogljijskim ćelijama (del Puerto i sar., 2013).

Za razliku od njih, P2Y metabotropni receptori učestvuju u dugotrajnim i trofičkim funkcijama. Do sada je okarakterisano osam P2Y receptora, a aktiviraju ih različiti vanćelijski nukleotidi: P2Y1, P2Y12 i P2Y13 imaju veliki afinitet za ADP; P2Y2 i P2Y4 za ATP/UTP; P2Y6 za UDP; P2Y11 za ATP; P2Y14 za UDP (Burnstock, 2007). P2Y1, P2Y2, P2Y4 i P2Y6 vezani su za Gq proteine i aktiviraju fosfolipazu C, dok su P2Y12, P2Y13 i P2Y14 vezani za Gi proteine, čija aktivacija dovodi do inhibicije adenilat ciklaze i redukcije unutarćelijskog AMP (Abbrachio i Ceruti, 2006).



**Slika 2. Šematski prikaz učesnika purinske transmisije** (Modifikovano <http://www.uni-leipzig.de/~straeter/research/ntpdase.html>).

Do sada su klonirana i okarakterisana četiri podtipa P1 receptora: A1, A2A, A2B i A3. Svi P1 receptori sa visokim afinitetom vezuju adenozin i pripadaju klasi metabotropnih receptora sa sličnom membranskom topografijom i sedam transmembranskih domena. Svaki transmembranski domen sačinjen je od 21-28 amino-kiselina koje čine  $\alpha$ -heliks. N-terminalni kraj je izvan, a C-terminalni kraj unutar ćelije (Slika 2). Signalni put svih P1 receptora vezan je, preko G-proteina, za enzim adenilat ciklazu, s tim što A1 i A3 receptori inhibiraju, a receptori A2 grupe stimulišu aktivnost ovog enzima.

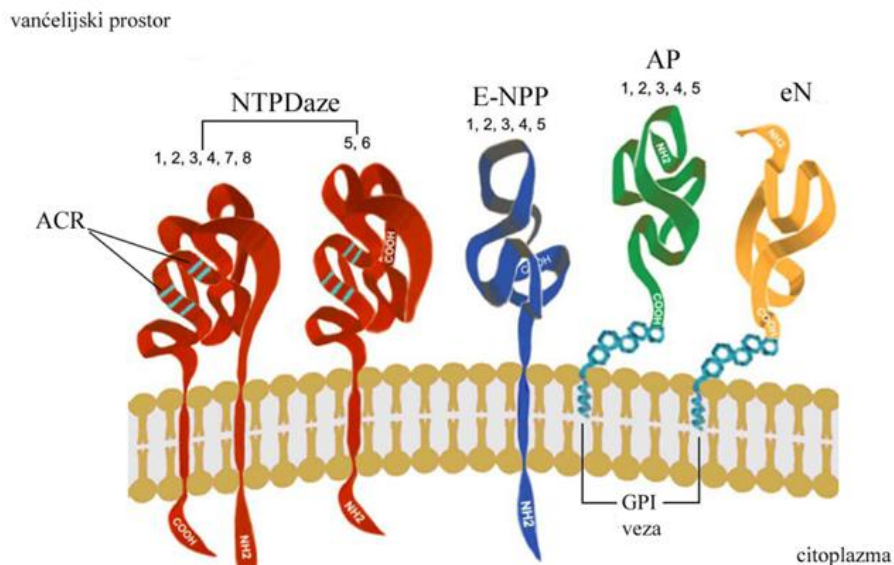
Purinski receptori su široko zastupljeni u CNS. Oni imaju važnu ulogu u brznoj neurotransmisiji posredovanoj P2X receptorima, koji prevashodno vezuju ATP, dok se dugotrajna signalizacija (trofički efekti), kakva je neuromodulacija, sekrecija, hemoatrakcija, rast, razviće, citotoksičnost, proliferacija i smrt ćelije, dešava posredstvom P2Y receptora, koji vezuju i druge purinske i pirimidinske nukleotide (Agresti i sar., 2005; Fields i Burnstock, 2006). Adenozin, važan neuromodulator i regulator homeostaze u nervnom sistemu, takođe ima ulogu u razviću, proliferaciji ćelija, njihovoj migraciji i diferencijaciji i formiranju sinaptičke mreže, delujući preko svojih P1 receptora (Zimmermann, 2006).

### **3. Metabolizam vanćelijskih adeninskih nukleotida u CNS**

Ćelija ne može direktno preuzeti oslobođene nukleotide, zbog njihove veličine i negativnog naelektrisanja. Kada se oslobodi u vanćelijski prostor, npr. sinaptičku pukotinu i aktivira odgovarajuće receptore, ATP se brzo degradira, posredstvom enzima ektonukleotidaza (Slika 4). Njihovo katalitičko mesto je locirano na spoljašnjoj strani membrane i široko su rasprostranjeni u CNS (Slika 3) (Zimmermann, 2012).

Postoje četiri grupe ektonukleotidaza (Zimmermann, 2000, 2012):

- 1) ekto-nukleozid 5'-trifosfat difosfohidrolaze (NTPD-aze);
- 2) ekto-5'-nukleotidaza (eN);
- 3) ekto-nukleotid pirofosfataze/fosfodiesteraze (NPP);
- 4) alkalne fosfataze (AP).



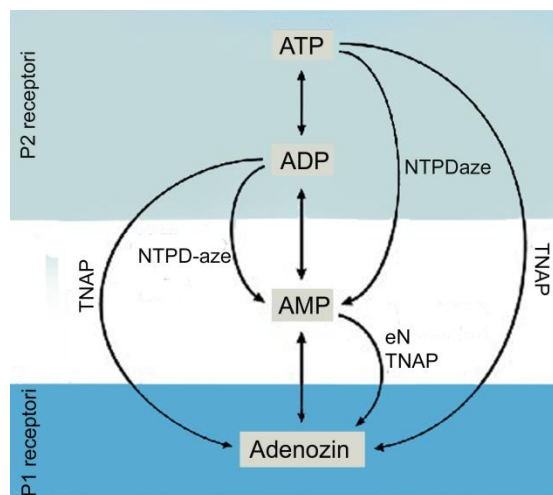
**Slika 3. Enzimi, pripadnici familije ektonukleotidaza** (Modifikovano Cognato i Bonnan, 2010) (objašnjenja u tekstu).

### 3.1. Ekto-Nukleozid 5'-Trifosfat Difosfohidrolaze (NTPD-aze)

Osam različitih *Entpd* gena kodira osam enzima, članova familije ekto-nukleozid 5'-trifosfat difosfohidrolaza (NTPD-aza) 1-8, koji se razlikuju po distribuciji u tkivima, ćelijskoj lokalizaciji i specifičnosti za supstrat (Zimmermann, 2000). Četiri NTPD-aze (NTPD-aza 1, 2, 3 i 8) su tipični ekto-enzimi locirani na površini ćelijske membrane i hidrolizuju sve vanćelijske nukleozid tri- i difosfate koji aktiviraju P2 receptore, kao i ostale nukleotide za koje nije pokazano da ih mogu aktivirati. Sa druge strane, NTPD-aze 4-7 su locirane unutar ćelije, u membranama organela i ne učestvuju u metabolizmu vanćelijskih nukleotida (Robson i sar., 2006). Svi članovi familije NTPD-aza poseduju pet visoko konzerviranih domena, tzv. apirazne regione (engl. *apyrase conserved regions*, ACRs) (Schulte am Esch i sar., 1999), koji su od presudnog značaja za katalitičku aktivnost enzima, jer je pokazano da usmerena mutageneza u I i IV apiraznom regionu ozbiljno narušava ektonukleotidaznu aktivnost (Smith i Kirley, 1998).

Za potpunu aktivnost, NTPD-aze zahtevaju prisustvo jona  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{Mg}^{2+}$  (Kukulski i sar., 2005; Zimmermann, 2001), ispoljavaju katalitičke karakteristike u širokom opsegu pH, a najefikasniji su u opsegu pH 7.0–8.5 (Kukulski i sar., 2005).

U CNS se eksprimiraju tri člana ove familije NTPD-aza 1, 2 i 3, koji imaju karakterističnu regionalnu i ćelijski specifičnu lokalizaciju (Bjelobaba i sar., 2007; Braun i sar., 2000; Langer i sar., 2008; Wang i Guidotti, 1998; Wink i sar., 2006).



**Slika 4. Hidroliza vanćelijskih adeninskih nukleotida** (Modifikovano Fields i Burnstock, 2006) (objašnjenja u tekstu).

**NTPD-aza 1 (EC 3.6.1.5, CD39).** NTPD-aza 1 je prvi put opisana kao antigen prisutan na limfocitima, te je ovom enzimu pridružena skraćenica CD39 (Kansas i sar., 1991). I pored velike zastupljenosti NTPD-aze 1 u mozgu pacova (Wang i Guidotti, 1998), dugo se smatralo da se isključivo eksprimira na mikrogliji i endotelu krvnih sudova (Braun i sar., 2000), a kasnije je pokazano da je lokalizovana i na neuronima kore prednjeg mozga i hipokampusu pacova (Bjelobaba i sar., 2007; Langer i sar., 2008), kao i u neuropilju (Langer i sar., 2008). Bogato je zastupljena u kaudoputamenu, talamusu i hipokampusu, dok ekspresija izostaje u malom mozgu (osim u mikrogliskim ćelijama i krvnim sudovima) (Langer i sar., 2008). Polipeptidni niz ovog enzima se odlikuje postojanjem šest mogućih mesta glikozilacije, koja je bitna za upućivanje enzima ka membrani, ali utiče i na

katalitičku aktivnoist enzima (Zhong i sar., 2001), čime se mogu objasniti i razlike u aktivnosti NTPD-aze 1 u različitim tkivima (Plesner, 1995). Molekulska masa humanog enzima, iznosi od 70 do 100 kDa, zavisno od stepena glikozilacije.

NTPD-aza 1 nije usko specifična prema supstratu i hidrolizuje različite purinske i pirimidinske nukleotide, a skoro podjednako dobro hidrolizuje NTP i NDP (Christoforidis i sar., 1995; Picher i sar., 1996), te su tako ATP i ADP u kompeticiji za isto aktivno mesto enzima. Hidroliza  $\beta$ - i  $\gamma$ - pirofosfatnih veza na ATP dešava se gotovo istovremeno. Dakle, direktnom hidrolizom ATP do AMP ovaj enzim dovodi do efikasnog uklanjanja svih potencijalnih aktivatora P2X i P2Y purinskih receptora iz vanćelijskog prostora. Rezultat aktivnosti NTPD-aze 1 je nastanak AMP koji je supstrat eN. NTPD-aza 1 ima bitno manji  $K_m$  u poređenju sa ostalim članovima familije, što joj omogućuje hidrolizu fosfopurina u koncentracijama koje su bar tri puta manje (Kukulski i Komoszynski, 2003), a što za posledicu ima efikasnije zaustavljanje signala posredovano P2 receptorima ili prevenciju njihove inaktivacije (pregled u Kukulski i sar., 2011). Osim katalitičke uloge, NTPD-aza 1 može imati i ulogu u ćelijskoj adheziji (Wu i sar., 2006; Murrin i Talbot, 2007).

**NTPD-aza 2 (EC 3.6.1.5, ekto-ATP-aza).** NTPD-aza 2 je dominantna ektonukleotidaza astrocita pacova (Wink i sar., 2006). Ekspirimira se i u progenitorskim ćelijama hipokampusa i *stem* ćelijama subventrikularne zone adulta glodara (Braun i sar., 2003; Shukla i sar., 2005). NTPD-aza 2 može postojati u homo-oligomernoj formi i disocijacija ovih oligomera u monomere potencijalno smanjuje enzimsku aktivnost (Wang i sar., 1998). Molekulska masa NTPD-aze 2 takođe varira u zavisnosti od glikozilacije i kreće se od 54 kDa do 75 kDa (Hicks-Berger i Kirley, 2000; Knowles i Chiang, 2003; Kukulski i Komoszynski, 2003; Sevigny i sar., 2002). Kod pacova su do sada opisane dve izoforme NTPD-aze 2, rezultat su alternativne obrade iRNK koja se prepisuje sa *Entpd2* gena i razlikuju se po katalitičkim svojstvima i mehanizmu regulacije (Zimmerman i sar., 2012). Kod ljudi su do sada opisane tri izoforme: NTPD-aza 2 $\alpha$ , NTPD-aza 2 $\beta$  i NTPD-aza 2 $\gamma$  (Chadwick i Frischauf, 1997; Mateo i sar., 2003), a samo izoforma NTPD-aza 2 $\alpha$  ima sposobnost hidrolize vanćelijskog ATP i odgovara enzimu kloniranom iz pacova (Mateo i sar., 2003).

NTPD-aza 2 kontroliše dostupnost vanćelijskog ATP, a kao i druge NTPD-aze, čvrsto je ukotvljena u ćelijsku membranu N- i C- transmembranskim domenima sa velikom petljom okrenutom ka vanćelijskom prostoru na kojoj se nalazi katalitičko mesto. NTPD-aza 2 ima veliki afinitet za ATP i druge NTP, a kao produkt nastaje ADP (Robson i sar., 2006) koji se prolazno akumulira pre nego što se polako defosforiliše u AMP.

**NTPD-aza 3 (EC 3.6.1.5).** Među NTPD-azama detektovanim u CNS, najspecifičnija i isključivo neuronska lokalizacija uočena je za NTPD-azu 3. Lokalizacija NTPD-aze 3 na telima neurona ograničena je na talamus i hipotalamus, produženu mozdinu (Belcher i sar., 2006) i kičmenu moždinu (Vongtau i sar., 2011). Takođe, u talamusu i hipotalamusu su uočena brojna "perlasta" vlakna koja ekspimiraju NTPD-azu 3, dok su u kori prednjeg mozga, hipokampusu i bazalnim ganglijama ova vlakna sa istaknutim varikozitetima, ali mnogo ređa i rasuta (Belcher i sar., 2006, Bjelobaba i sar., 2010). Prvobitno, autori nisu precizirali o kakvim se zapravo vlaknima radi te su se ogradili formulacijom „aksonima-slične strukture“ (engl. *axon-like structures*). Takođe je pokazano da ekspresija NTPD-aze 3 na pojedinim vlakanima odgovara morfološkim karakteristikama dendritskih trnića, što je i potvrđeno primenom elektronske mikroskopije (Kiss i sar., 2009; Bjelobaba i sar., 2010). Može se reći da se NTPD-aza 3 eksprimira isključivo na neuronima i to na telima, aksonima, dendritskim granama i trničima predominantno ekscitatornih neurona (Belcher i sar., 2006; Bjelobaba i sar., 2010; Kiss i sar., 2009; Grković i sar., 2016). Većina NTPD-aza 3 imunoreaktivnih neurona hipotalamusa i najveći deo vlakana u ostalim regionima eksprimira i hipokretin-1/oreksin-A, što ukazuje na ulogu ovog enzima u autonomnim funkcijama i ponašanjima koja su regulisana hormonima, kao što su ishrana, ciklus spavanja i budnosti i reprodukcija (Belcher i sar., 2006).

NTPD-aza 3 stiće katalitičku aktivnost odmah po nativnom savijanju proteina, već u endoplazmatičnom retikulumu (Ivanenkov i sar., 2005), za razliku od NTPD-aze 1 koja za katalitičku aktivnost zahteva terminalnu glikozilaciju u Goldžijevom aparatu (Zhong i sar., 2001). Molekulska masa ne-glikozilovane forme NTPD-aze 3 je 60 kDa, dok potpuno glikozilovane forme iznosi 70-80 kDa (Belcher i sar., 2006). Kinetičke karakteristike NTPD-aze 3 su između NTPD-aze 1 i 2, što rezultuje uklanjanjem ADP iz vanćelijske sredine sporije od NTPD-aze 1. Klonirana NTPD-aza 3 pacova najveću katalitičku



aktivnost pokazuje u blago alkalnoj sredini, a odnos hidrolize ATP i ADP je 1:0,2 (Vorhoff i sar., 2005). Hidrolizom ATP i UTP dolazi do prolazne akumulacije NDP, a kao krajnji produkti u medijumu se akumuliraju AMP i UMP (Lavoie i sar., 2004).

### **3.2. Ekto-5'-nukleotidaza (EC 3.1.3.5, CD73, eN)**

Ekto-5'-nukleotidaza (eN) ili površinski marker limfocita CD73 je glikoprotein prisutan na membranama gotovo svih ćelija i visoko je konzerviran protein među sisarskim vrstama. eN je široko rasprostranjena u CNS. Tokom razvića nervnog sistema, distribucija eN je uočena na nezrelim ćelijama koje migriraju i na sinapsama tokom sinaptogeneze i remodelovanja (Schoen i sar., 1988; Bailly i sar., 1995; Fenoglio i sar., 1995; Heilbronn i sar., 1995; Heilbronn i Zimmermann, 1995), dok je u adultnom mozgu predominantno eksprimirana na astrocitima, ali i u mikrogliji, mijelinu, neuronima (Zimmerman, 1992; Bjelobaba i sar., 2007, 2011; Langer i sar., 2008). Protein može biti glikozilovan na pet različitih mesta, zbog čega se javljaju odstupanja od predviđene molekulske mase (64 kDa) tako da može imati molekulsku masu i do 80 kDa (Zimmermann, 2012). eN je smeštena u membranskim mikrodomenima - lipidnim splavovima (Bianchi i Sychala, 2003). Protein je prikačen za membranu glikozil-fosfatidilinozitol (GPI) vezom, koja je karakteristična i za neke druge vanćelijske enzime, a ostvaruje se razmenom C-terminusa transmembranskog segmenta za oligosaharid povezan sa lipidom, fosfatidilinozitolom. GPI-specifična fosfatidilinozitol fosfolipaza C može raskinuti ovu vezu, što dovodi do nastanka solubilne forme ovog enzima (Slika 4). Enzim se nalazi kao homodimer sastavljen iz subjedinica težine 62-74 kDa u zavisnosti od vrste i tkiva, koje su povezane vodoničnim vezama i hidrofobnim interakcijama (Zimmerman, 1992).

Ovom enzimu su neophodni  $Zn^{2+}$  i drugi divovalentni joni za katalitičku aktivnost i može defosforilisati različite NMP u vanćelijskom prostoru. Ipak, najefikasnija je hidroliza AMP, koji je u fiziološkim uslovima i najzastupljeniji supstrat, sa  $K_m$  3-50  $\mu M$  (Zimmermann, 1992). Osnovna uloga ovog enzima je produkcija vanćelijskog adenoza iz AMP i jedini je enzim u CNS čijom aktivnošću nastaje adozin (Lovatt i sar., 2012). Njegovi kompetitivni inhibitori su ATP i ADP. Takav mehanizam kontrole enzimske

aktivnosti pretečama supstrata, naziva se "upozoravajuća inhibicija" (engl. *feed-forward*) (Zimmermann, 1996; Rathbone i sar., 1999). Na taj način kontroliše se nivo adenzina (James i Richardson, 1993) i aktivacija P1 receptora, a samim tim i trajanje njegovog neuromodulatornog efekta. Nezavisno od svoje enzimske aktivnosti, eN ima i adhezivnu ulogu i uključen je u procese prepoznavanja i interakcije između ćelija, migracije i sinaptičke plastičnosti (Zimmerman, 1992, 2012).

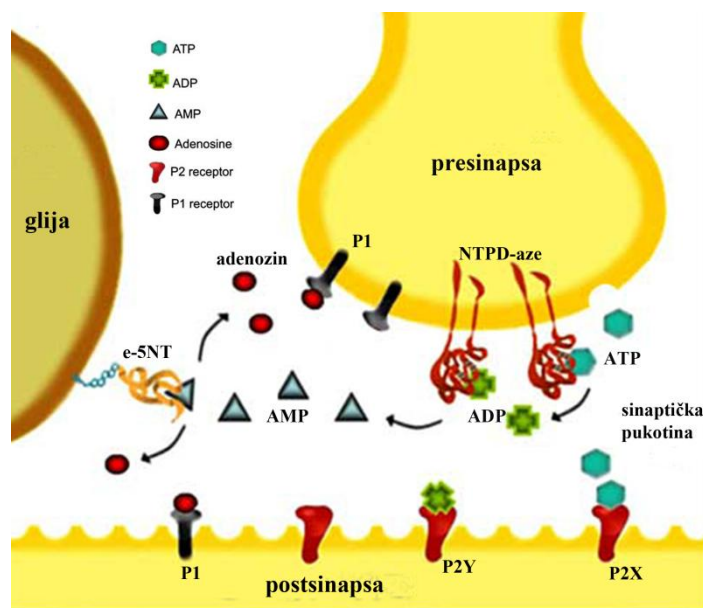
### **3.3. Alkalne fosfataze**

Alkalne fosfataze (AP) su široko rasprostranjeni ektoenzimi, što ukazuje na njihovu značajnu ulogu u fiziološkim procesima. Njihova osnovna uloga je u katalizi defosforilacije i transfosforilacije širokog spektra fizioloških i ne-fizioloških supstrata (Sebastian-Serrano i sar., 2015). Većinu članova porodice alkalnih fosfataza sisara čine dve identične subjedinice povezane kovalentnim vezama. Enzim je ukotvljen u ćelijsku membranu preko GPI sidra (Millan, 2006). Alkalne fosfataze mogu degradirati različite 5'-tri-, di- i monofosfate i veliki broj ostalih organskih jedinjenja, uključujući i proteine, te tako oslobađaju pirofosfate (PPi) koji se dalje hidrolizuju do neorganskog fosfata (Pi) (Millan, 2006). Ovi enzimi, takođe mogu direktno hidrolizovati ATP do adenzina, agoniste P1 receptora. Najveću enzimsku aktivnost AP dostiže u visoko alkalnoj sredini, ali takođe vrlo efikasno može hidrolizovati ATP i na pH 7,4. Tkivno nespecifična AP (TNAP) je jedina izoforma AP u CNS i eksprimira se u endotelnim ćelijama krvnih sudova i neuropilu, a naročito u sinaptičkim kontaktima (Langer i sar., 2008). TNAP je visoko ekspimirana u CNS tokom razvika (Sebastian-Serrano i sar., 2015).

## **4. Ektonukleotidaze u sinaptičkom odeljku i njihova uloga u neurotransmisiji**

U sinaptičkoj pukotini, ATP je kratkoživeći molekul koji se veoma brzo, aktivnošću ektonukleotidaza, metaboliše do adenzina. Biohemijskim, imunohistohemijskim i

imunoblot metodama je pokazano da su sve navedene ektonukleotidaze, NTPD-aze 1-3, eN i TNAP, lokalizovane u sinaptičkom odeljku (Cunha i sar., 1992; Cunha 2001; Kukulski i Komoszynski, 2003; Rucker i sar., 2005; Langer i sar., 2008; Stanojevic i sar., 2011; Grkovic i sar., 2014, 2016).



**Slika 5. Purinska signalizacija u sinaptičkom odeljku** (Modifikovano de Paula Cognato i Bonan, 2010) (objašnjenja u tekstu).

Ektonukleotidaze su uključene u različite aspekte signalizacije posredovane P2 i P1 receptorima (Slika 5). NTPD-aze, zajedno sa eN, kontrolišu dostupnost liganada nukleotidnih i nukleozidnih receptora (ATP, ADP i adenzina), trajanje i stepen njihove aktivacije (Chen i Guidotti, 2001) i tako sprečavaju desenzitizaciju P2 receptora (Enyoloji i sar., 1999). Specifičnost ektonukleotidazne kaskade koju čine NTPD-aze i eN ogleda se u uklanjanju jednog signala (ATP) i istovremenog formiranja drugog (ADP/adenozin). U sinapsama u kojima ATP ima ulogu ko-transmitera, a to su glutamatske, noradrenalinke, serotoninke, acetilholinske sinapse, (Burnstock, 2009; Cunha i sar., 1992; James i Richardson, 1993), NTPD-aze imaju ulogu modulatora neurotransmisije, regulišući kako delovanje ATP tako i neurotransmitera koji se zajedno sa njim oslobađa. Takođe, ovi

enzimi imaju protektivnu funkciju jer održavaju odnos vanćelijskih nukleotida (ATP/ADP)/nukleozida (adenozin) u okviru fizioloških vrednosti (Agteresch i sar., 1999). Fiziološka i hemijska interakcija između simultano oslobođenih neurotransmitera, ATP i adenzina predstavlja važan put prenosa signala koji regulišu različite ćelijske odgovore.

Kako se na osnovu odnosa hidrolize ATP i ADP posredno može zaključiti o pojedinačnom doprinosu svake od NTPD-aza, u različitim tipovima ćelija utvrđen je različit odnos hidrolize ATP i ADP. Tako je pokazano da u prečišćenim sinaptozomima izolovanim iz kore prednjeg mozga pacova (James i Richardson, 1993; Nagy, 1986) i hipokampusa odnos hidrolize ATP i ADP iznosi 1:0,3 (Cunha 2001), dok za astrocite izolovane iz kore prednjeg mozga ili hipokampusa važi odnos 8:1 (Wink i sar., 2003), što ukazuje na predominantno prisustvo NTPD-aze 2 u membranama astrocita, a NTPD-aze 3 u sinaptičkim membranama, što je donekle potvrđeno i imunohistohemijskim metodama. Lokalizacija NTPD-aze 3 na sinaptičkim strukturama ukazuje na to da ovaj enzim ima ulogu sinaptičkog regulatora vanćelijskog nivoa ATP. Lokalizacija jedne pored druge, NTPD-aze 2 na astrocitima, i delom sinapsama, i NTPD-aze 3 na nervnim završecima, sugeriše kombinovanu ulogu ovih enzima u regulaciji vanćelijskih nukleotida i na dominantnu ulogu NTPD-aze 3 u regulaciji sinaptičke funkcije. Dalje, literaturni podaci ukazuju na funkcionalnu povezanost TNAP sa procesima formiranja i sazrevanja sinapsi (Hanics i sar., 2012; Sebastian-Serrano i sar., 2015) i smatra se da TNAP „pomaže“ eN u uslovima kada je neophodna veća koncentracija vanćelijskog adenzina. (Millan, 2006).

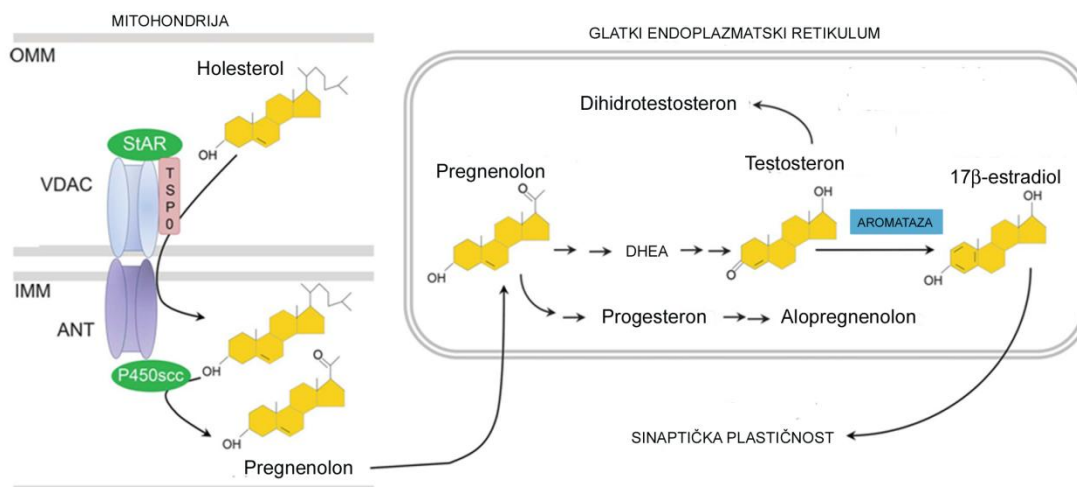
Izuzetno važan enzim je eN koji svojom aktivnošću defosforiliše vanćelijski AMP do adenzina, neuromodulatora koji ne izaziva direktne efekte u neuronima, već fino moduliše sinaptičku transmisiju koja se već dešava. Najizraženije efekte adenzin ispoljava preko inhibitornog A1 receptora, koji je i najzastupljeniji u mozgu (Dunwiddie i Masino, 2001), a mesto njegove primarne ekspresije su sinaptičke membrane (Rebola i sar., 2003), posebno glutamatske sinapse (Rebola i sar., 2005). A1 receptori su lokalizovani na presinaptičkim membranama gde inhibiraju oslobađanje glutamata (kao i drugih neurotransmitera) i na postsinaptičkoj membrani, gde dovode do inhibicije ulaska  $Ca^{2+}$  kroz voltažno-zavisne  $Ca^{2+}$  kanale i N-metil-D-aspartat receptore (NMDA) dovodeći do hiperpolarizacije membrane. Oslobađanje neurotransmitera može biti regulisano koordinisanom aktivnošću A1 i A2A

receptora (Cunha, 2008), s obzirom na prisustvo oba receptora u sinapsama hipokampusa (Rebola i sar., 2005). Zbog toga se postavilo pitanje fiziološkog značaja prisustva dva receptora u sinapsama sa različitom funkcijom, koji se aktiviraju istim ligandom. Pri stimulacijama neurona niskog intenziteta aktivira se A1 receptor, adenozinom koji ne nastaje hidrolizom ATP u sinaptičkoj pukotini već u vanćelijsku sredinu dospeva dvosmernim adenozijskim transporterima, a koji dalje dovodi do inhibicije ekscitatorne neurotransmisije. Sa druge strane, pri visokofrekventnim stimulacijama, dolazi do direktnog oslobađanja ATP iz vezikula presinaptičkih nervnih završetaka, koji se aktivnošću NTPD-aza i eN defosforiliše do adenzina. Adenzin nastao aktivnošću eN aktivira ekscitatorni A2A receptor i dovodi do pojačanog oslobađanja glutamata, a smanjuje aktivnost A1 receptor u aktiviranim sinapsama (Cunha., 2008). Ko-ekspresija eN i A2A receptora i njihova funkcionalna povezanost je i potvrđena (Augusto i sar., 2013). Selektivna stimulacija A2AR, adenozinom koji je generisan aktivnošću eN, povezana je sa sinaptičkim plastičnim promenama u ekscitatornim sinapsama (Cunha, 2008), potencirajući NMDA posredovane efekte (Rebola i sar., 2008), pojačavajući oslobađanje glutamata (Rodrigues i sar., 2005) i sprečavanjem inhibitornog efekta A1 ili kanabinoidnih receptora. Ovaj vid kooperacije između A2A receptora u aktiviranim sinapsama i A1 receptora u neaktivnim sinapsama može predstavljati mehanizam finog podešavanja sinaptičke neurotransmisije npr. tokom dugotrajne potencijacije (engl. *long term potentiation*, LTP) (Cunha, 2008).

## 5. Ženski polni hormoni u CNS

Polni hormoni, osim svoje ključne uloge u reprodukciji, regulišu različite funkcije i karakteristike CNS. Estradiol (E2) i progesteron (P4) su derivati holesterola, sa primarnim mestom sinteze u gonadama. Zahvaljujući lipofilnoj strukturi, mogu lako proći kroz krvno-moždanu barijeru i aktivirati svoje specifične receptore u ćelijama mozga.  $17\beta$ -estradiol se takođe sintetiše aromatizacijom testosterona (T) ili *de novo* sintezom (Fester i sar., 2012) i u neuronima i u glijskim ćelijama (Slika 6) (Rune i Frotscher, 2005; Zwain i Yen, 1999) u različitim strukturama mozga, kao što su npr. hipotalamus i hipokampus (Kato i sar., 2013;

Fester i sar., 2012; Hojo i sar., 2009, 2004). Tako efekti polnih hormona, na procese u CNS, zavise od kordinisane aktivnosti lokalno sintetisanih i polnih hormona poreklom iz gonada.



**Slika 6. Steroidogeneza** (Modifikovano Cersosimo i Benarroch, 2015).

Ženski polni hormoni najizraženije efekte na CNS ostvaruju tokom njegovog razvića, tokom procesa polne diferencijacije, neurogeneze, diferencijacije ćelija, mijelinizacije, migracije i ćelijske smrti. Svi ovi procesi dovode do promena broja ćelija, citoarhitekture, aktivnosti ćelija, sinaptičke transmisije itd. Godinama je važno pravilo da je hipotalamus jedini region mozga koji se razlikuje među polovima. Ipak, poslednjih decenija, mnogobrojna istraživanja su ukazala na polno-specifične strukturne, ćelijske, biohemijske i fiziološke razlike među moždanim regionima, uključujući i hipokampus. Da se rodni identitet određuje još u materici je saznanje novijeg datuma. Polna diferencijacija mozga počinje prenatalno, ali se nastavlja i nakon rođenja. Muški i ženski mozak se razvijaju u različitim hormonskim miljeima. Naime, u procesu diferencijacije muškog mozga, kod pacova i čoveka, ključan je uticaj T u periodu od kraja embrionalnog razvića do prve nedelje života. U tom periodu dolazi do prolazne aktivacije testisa, sinteze/sekrecije T koji cirkulacijom dospeva do mozga, konvertuje se u E2 (procesom aromatizacije) i utiče na

neurogenezu, apoptozu, migraciju ćelija, procese koji će dovesti do formiranja trajnih polnih razlika u broju ćelija kao i u njihovoj distribuciji unutar pojedinih moždanih regiona ili jedara. Pored toga, uticaj E2 na procese izrastanja/grananja neurita, sinaptogeneze i uspostavljanja neurohemijskog fenotipa dovodi do uspostavljanja polnih razlika u kontroli neurotransmiterskog sistema i neuronskih mreža u određenim moždanim regionima. Za razliku od muškog, diferencijacija ženskog mozga se odvija bez uticaja E2. Iako proces steroidogeneze u jajnicima otpočinje oko 5. dana postnatalnog razvića, cirkulišući E2 ne dospeva do mozga (pregled u Gillies i McArthur, 2010), tako da se ženski mozak formira bez hormonskog uticaja. U pubertetu, muški i ženski mozak prolaze drugi period diferencijacije, kada polni hormoni ispoljavaju tzv. aktivacione efekte na već uspostavljene polno-specifične neuronske mreže (revija Gillies i McArthur, 2010).

Poznato je da polni hormoni, pored razvića i diferencijacije CNS, regulišu i reproduktivno ponašanje, neurotransmisiju, sinaptičku plastičnost, učenje, pamćenje i raspoloženje (Gillies i McArthur, 2010). Polni hormoni i njihovi derivati, ali i selektivni modulatori receptora za polne hormone (engl. *selective estradiol receptor modulators*, SERM), ispoljavaju i neuroprotektivne efekte na nivou CNS: dovode do značajnog smanjenja oksidativnog stesa, inhibiraju neuroinflamaciju i ekscitotoksičnost i štite neurone od ćelijske smrti, što je pokazano u mnogobrojnim eksperimentalnim modelima patoloških stanja nervnog sistema (Dykens i sar., 2005; Habib i Bayer, 2015; Moos i sar., 2009). Polni hormoni mogu uticati na različite procese u CNS kroz kombinaciju genomskih i negenomskih efekata u različitim regionima, stukturama i ćelijama mozga. Intenzivno se traga za jedinjenjem kojim bi se efekti, npr. estrogena, farmakološki odvojili, korišćenjem selektivnih modulatora odgovora na polne hormone, ali i  $17\alpha$ -estradiola koji može biti jedno takvo jedinjenje.

$17\alpha$ -estradiol ( $E\alpha$ ) je prirodni stereoizomer  $17\beta$ -estradiola koji nastaje aromatizacijom epitestosterona (prirodnog stereoizomera testosterona). Međutim, do danas se ne može sa sigurnošću reći koje je primarno mesto sinteze  $E\alpha$ , ni koji je njegov primarni prekursor. Iako ga nije moguće detektovati u cirkulaciji, koncentracija  $E\alpha$  u hipokampusu adultnih miševa oba pola dostiže 7 pg/mg, te se smatra da se  $E\alpha$  sintetiše u hipokampusu (Torran-Allerand i sar., 2005).  $17\alpha$ -estradiol je potentni neuroprotektivni agens u brojnim

modelima povrede CNS (Dykens i sar., 2005; McClean i Nunez, 2008; Moose i sar., 2009), međutim podaci o mehanizmima njegovog delovanja na nivou CNS su veoma oskudni.

## 6. Mehanizmi delovanja polnih hormona

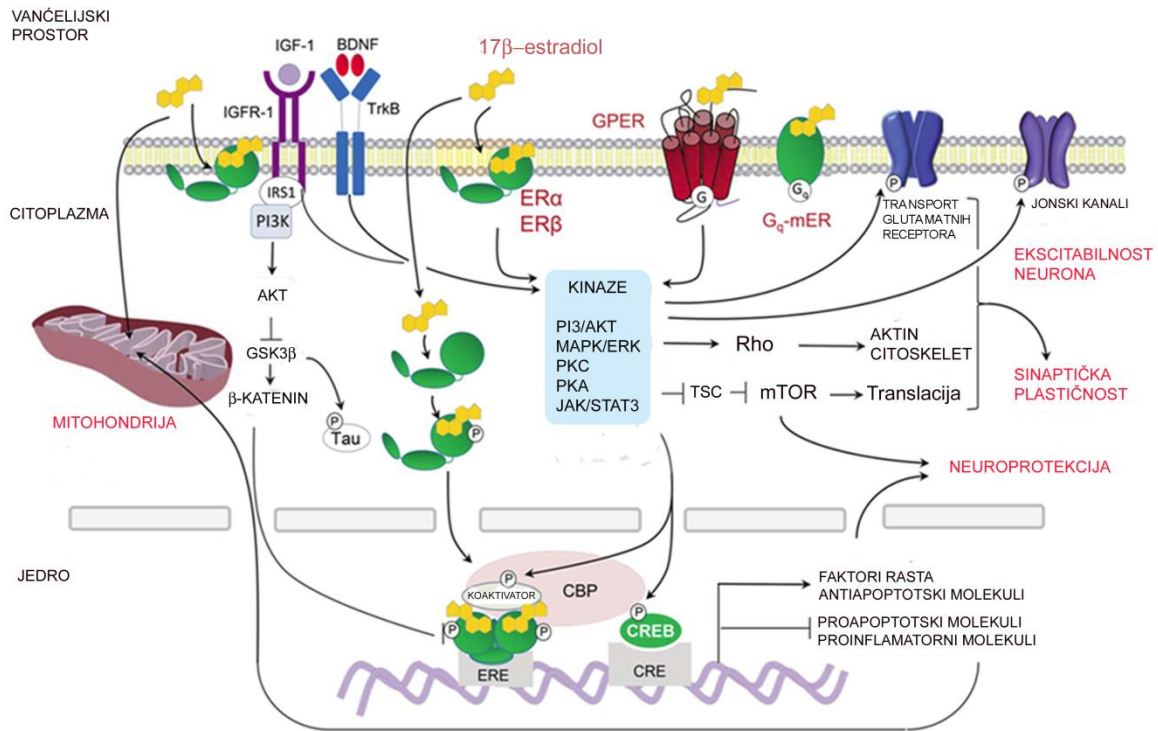
Biološki efekti E2 i P4 ostvaruju se preko estradiolskih (ER) i progesteronskih receptora (PR) i zavise od signalnog puta koji aktiviraju, a koji se pokreću aktivacijom: 1) unutarćelijskih receptora i dovode do klasičnih (genomskih) efekata ili 2) membranskih receptora tzv. ne-genomskim mehanizmom delovanja (Filman i sar., 2009). Receptori koje aktiviraju ženski polni hormoni, eksprimiraju se u svim ćelijama različitih regiona mozga, kao npr. hipokampus, hipotalamus, kora prednjeg mozga, mali mozak, bademasta jedra, crna supstantia i ventralno tegmentalno područje.

**Genomski mehanizam delovanja polnih hormona.** Dugo se smatralo da E2 i P4 svoje efekte ispoljavaju isključivo vezujući se za unutarćelijske receptore, članove jedarne superfamilije receptora, koji dovode do modulacije transkripcije ciljnih gena klasičnim genomskim mehanizmom (Slika 7). E2 i P4, zahvaljujući svom lipofilnom karakteru, slobodnom difuzijom prolaze ćelijsku membranu, ulaze u ćeliju i aktiviraju svoje unutarćelijske receptore. Estradiolski receptori  $\alpha$  i  $\beta$  (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) i progesteronski receptori A i B (PR-A i PR-B) se, u odsustvu hormona, nalaze u formi neaktivnog kompleksa u citoplazmi. Nakon vezivanja liganda za receptore dolazi do njihove dimerizacije i translokacije u jedro, gde se vezuju za specifičnu sekvencu u promotorskom regionu ciljnog gena tzv. hormon responsivni element (engl. *Hormone Response Element*, HRE), što dovodi do transaktivacije odnosno trans-represije gena. Regulacija transkripcije gena koji nemaju HRE sekvencu u svom promotorskom regionu dešava se genomskim mehanizmom nezavisnim od HRE sekvence, a koji podrazumeva interakciju ER i PR sa hromatinom ili transkripcionim faktorima kao što su aktivacioni protein-1 (AP-1) i protein specifičnosti 1 (Sp1) (Bjornstrom i Sjoberg, 2005). Na ovaj način E2 i P4 dovode do efekata koji se ispoljavaju nakon dužeg vremenskog perioda i zato su označeni kao spori efekti.



**Ne-genomski mehanizam delovanja polnih hormona.** Modulatorni efekti polnih hormona, posebno E2, mogu biti brzi, što ne može biti posledica genomskih mehanizama, tj. *de novo* transkripcije i translacije (Slika 7). ER $\alpha$  i ER $\beta$ , zajedno sa nedavno okarakterisanim estradiolskim receptorom koji je spregnut sa G-proteinom, GPER1 (poznat i kao GPR30) mogu biti lokalizovani u membrani ćelija (pregled u Sellers i sar., 2015). Palmitoilacija, post-translaciona modifikacija koja podrazumeva kovalentno vezivanje palmitinske kiseline za cisteinske ostatke proteina receptora, omogućuje vezivanje ER za citoplazmatsku stranu ćelijske membrane u glikolipo-proteinskim mikrodomenima, tj. lipidnim splavovima (Levin, 2009). Na primer, ER $\alpha$  (ali i ER $\beta$ ) je u kompleksu sa kaveolinom-1, proto onkogen tirozin kinazom (c-Src), protein kinazom B (Akt), fosfatidilinozitol 3-kinazom (PI3K), proteinom toplotnog stresa 90 (HSP90) i endotelnom sintazom azot-monoksida (eNOS) u kaveolama lipidnih splavova (Knowlton i Lee, 2012), odakle, aktivacijom brojnih signalnih molekula, inicira brze, tzv. „ne-genomske“ efekte, a koji se dešavaju u roku od nekoliko sekundi do nekoliko minuta.

Aktivacija membranskih receptora dovodi do pokretanja različitih signalnih puteva. Ne-genomsko delovanje E2 uključuje mobilizaciju unutarćelijskog Ca<sup>2+</sup>, stimulaciju aktivnosti adenilat ciklaze i produkciju cAMP, zatim fosfolipaze C, i dalju aktivaciju signalnih molekula, uključujući protein kinazu aktiviranu mitogenima (MAPK), PI3K/Akt, protein kinazu C (PKC), koje brzo regulišu fiziološke procese u ćelijama, kao što su reorganizacija citoskeleta i modulacija funkcije mitohondrija, ali i lokalnu sintezu proteina aktivacijom Akt – mTOR, ciljni molekul za rapamicin kod sisara (engl. *mammalian target of rapamycin*) - 4E-BP1, 4E-vezujući protein 1 (engl. *4E-binding protein 1*) signalnog puta. Aktivacija membranskih receptora i signalnih puteva može dovesti i do fosforilacije transkripcionih faktora, kao što su cAMP responsivni element (engl. *cAMP responsive element-binding protein*, CREB) ili ER $\alpha$  ali i kinaze regulisane vanćelijskim signalima 1/2 (Erk 1/2) i pokretanja transkripcije gena, što je rezultat i „klasičnih“ genomskih efekata posredovanih aktivacijom receptora lokalizovanih u citoplazmi i/ili jedru, te je veoma teško odvojiti genomske od ne-genomskih efekata (Bean i sar., 2015) (Slika 7).



**Slika 7. Mehanizam delovanja polnih hormona** (Modifikovano Cersosimo i Benarroch, 2015) (objašnjenje u tekstu).

Takođe, brzi efekti mogu biti inicirani i funkcionalnim povezivanjem ER sa drugim tipovima receptora npr. sa metabotropnim glutamatskim receptorima (mGluR) nezavisno od glutamata (Bean i sar., 2015) ili sa tropomiozin kinaza B receptorima (TrkB), receptorima za faktor rasta sličan insulinu 1 (IGF-1), receptorima za neurotrofički faktor poreklom iz mozga (engl. *Brain derived neurotrophic factor*, BDNF) itd. (Sellers i sar., 2015), ali i aktivacijom membranskog estradiolskog receptora-X (ER-X), za koji se smatra da je primarni receptor za 17 $\alpha$ -estradiol (Torrán-Allerand., 2005).

Kao i drugi steroidni hormoni i P4 može inicirati brze efekte vezujući se za „neklasične“ membranske receptore (mPR) za koje se smatra da nisu stalno prisutni u membrani ćelija, kao i za drugi tip receptora označenog kao membranska komponenta

progesterona 1 (engl. *Progesterone membrane component 1*, PGRMC1, 25Dx) (Petersen i sar., 2013).

## **7. Efekti ženskih polnih hormona na nivou hipokampusa**

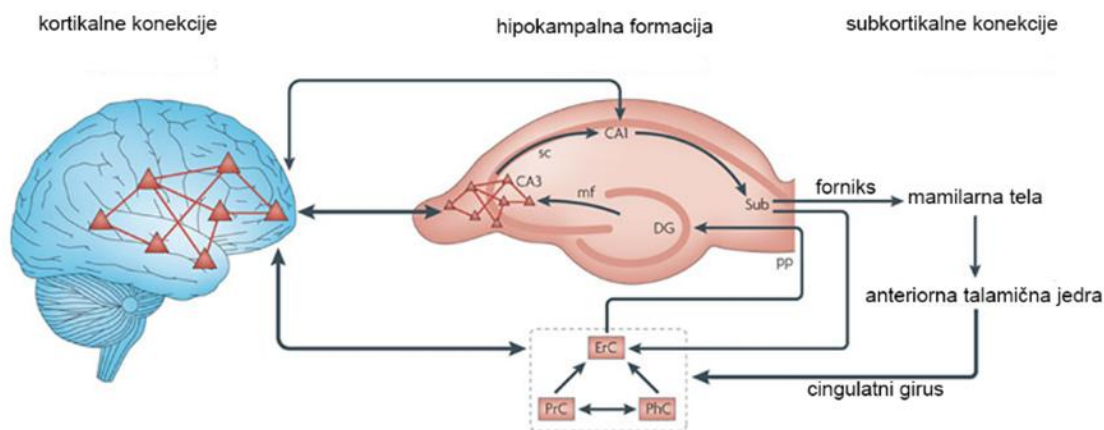
Pored polne diferencijacije, polni hormoni u mozgu omogućavaju funkcionalnu adaptaciju CNS tokom života, regulišući različite procese među kojima je sinaptogeneza, sinaptička plastičnost, učenje i memorija (Spencer i sar., 2008; Gilles i McArthur, 2010; Scharfman i McLusky, 2014). Region mozga, izuzetno osetljiv na efekte polnih hormona, posebno  $17\beta$ -estradiola, ali i izuzetno podložan plastičnim promenama tokom života je hipokampus. Strukturna plastičnost hipokampusa veoma je važna za njegovu funkcionalu adaptaciju u odgovoru na fiziološke ili različite stimuluse iz spoljašnje sredine, uključujući i promene u nivoima ovog hormona.

### **7.1. Strukturna i funkcionalna organizacija hipokampusa**

Hipokampus i njemu pridružene strukture medijalnog slepoočnog režnja prednjeg mozga neophodni su za formiranje, konsolidaciju i oživljavanje epizodnih uspomena (Morris i sar., 1982; Eichenbaum, 2000), kao i za prostornu i radnu memoriju pacova (O'Keefe i Conway, 1978). Hipokampalna formacija (hipokampus, Hip) nalazi se unutar medijalnog slepoočnog režnja prednjeg mozga, deo je limbičkog sistema i čine je hipokampus proper, koji se sastoji od CA1-CA3 (CA = Cornu Amonis, Amonov rog), dentatni girus (DG) sa polimorfnim slojem (hilus), entorinalna kora (EK), subikulum, pre- i para subikulum (Bayer, 1980). Široko je prihvaćeno da svaki od hipokampalnih regiona ima jedinstvenu funkciju u obradi informacija, ali i danas se intenzivno izučava specifična uloga svakog od njih.

Informacije u hipokampus dolaze iz kortikalnih i subkortikalnih struktura (pregled u Knowles, 1992). Kada se napravi transverzalni presek po longitudinalnoj osi hipokampusa, vidljiva je osnovna mreža Hip (Slika 8), aferentni skup tri povezana puta koji su poznati

kao "trisinaptički" krug ili petlja (Swanson, 1982; Witter i sar., 1989; Amaral i Witter, 1989). Prvi region intrahipokampalne trisinaptičke petlje je DG, koji prima informacije iz EK. Primarne ćelije DG su granularne ćelije, čiji aksoni, mahovinasta vlakna, ekscitiraju piramidne ćelije CA3 regiona. DG ima važnu ulogu u procesima učenja i pamćenja procesuirajući prostorne informacije. Drugi region tzv. trisinaptičke petlje predstavlja CA3 region. Primarne ćelije CA3 regiona su piramidne ćelije čiji aksoni daju Šaferove kolaterale koje formiraju sinapse na piramidnim neuronim CA1 regiona. Aksoni piramidnih ćelija CA1 glavni su izlazi iz hipokampusa i projektuju se do entorinalne kore i subikuluma putem forniksa u septalno područje.

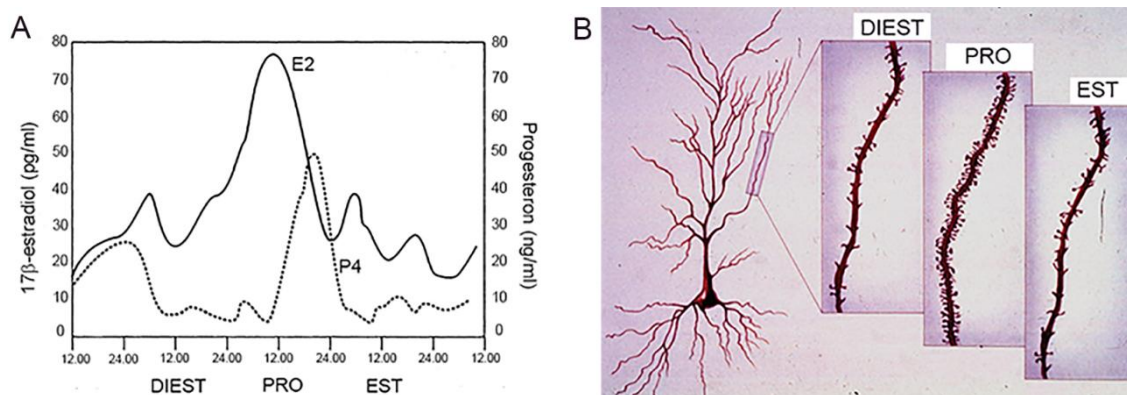


**Slika 8. Strukturne i funkcionalne veze u hipokampusu** (Modifikovano Henke, 2010) (objašnjenje u tekstu).

Uzimajući u obzir da svaki od hipokampalnih regiona ima jedinstvenu funkciju u obradi informacija, neophodno je poznavati faktore koji utiču na neuromorfološke i fiziološke promene u ovom regionu mozga. Od otkrića Wooley-a i McEween-a (1992) da gustina dendritskih trnića u CA1 regionu hipokampusa opada nakon bilateralne ovarijektomije (OVX) pacova, počelo je intenzivno istraživanje efekata cirkulišućih polnih hormona, njihove egzogene aplikacije, ali i mehanizama kojima E2 izaziva plastične promene u ovom moždanom regionu.

## 7.2. Fluktucije hormona tokom estrusnog ciklusa dovode do fluktucija u gustini sinapsi u hipokampusu

Reproduktivni ciklus ženki pacova naziva se estrusni ciklus i rezultat je složene interakcije između hipotalamusa, hipofize i perifernih ženskih polnih organa (jajnika i maternice) iz kojih se, u zavisnosti od faze ciklusa sintetizuju i izlučuju hormoni estrogen i/ili progesteron. Regularni estrusni ciklus pacova traje 4-5 dana (Watanabe i sar., 1990) i podeljen je u četiri faze: proestrus (PRO), estrus (EST) i diestrus (DIEST, čine je 2 podfaze - metestrus i diestrus 2). Za svaku fazu je karakterističan niz morfoloških i fizioloških promena u organizmu, koje nastaju usled fluktucije nivoa hormona u cirkulaciji. Tako je u proestrusu nivo E2 u cirkulaciji najviši, dok značajno opada u estrusu i diestrusu (Slika 9A). Sa druge strane, najviše koncentracije u cirkulaciji progesteron dostiže u diestrusu i u periodu prelaska proestrusa u estrusnu fazu ciklusa. Fluktucije nivoa hormona u cirkulaciji praćene su promenama u intrahipokampalnoj koncentraciji E2 i P4 (Kato i sar., 2013), koje dovode i do promena u gustini dendritskih trnja piramidalnih ćelija CA1 regiona hipokampusa (Wooley i sar., 1990) (Slika 9B). Tako u proestrusu, kada je nivo E2 najviši, uočava se najveća gustina dendritskih trnja u CA1 regionu hipokampusa, dok tokom estrusa i diestrusa (nivo P4 visok) njihova gustina opada (Slika 9B).



**Slika 9. Fluktucije nivoa hormona u cirkulaciji (A) i gustine dendritskih trnja CA1 regiona hipokampusa (B) tokom estrusnog ciklusa** (Modifikovano Hurm i Macrea, 2000; Hara i sar., 2015) (objašnjenje u tekstu).

Dugo se smatralo da se ove promene na nivou sinapsi hipokampusa dešavaju kao posledica fluktuacija gonadnih hormona E2 i P4 koje cirkulacijom dospevaju u u hipokampus. Međutim, danas je poznato da i neuroni i glijske ćelije hipokampusa sintetišu ženske polne hormone *de novo* sintezom ili aromatizacijom testosterona (Fester i sar., 2012), zbog čega su koncentracije u ovim strukturama znatno veće od one u cirkulaciji i razlikuju se između mužjaka i ženki (Kato i sar., 2013; Hojo i sar., 2009). Interesantno je da je izmerena koncentracija estradiola u hipokampusu mužjaka pacova dvostruko veća od one izmerene kod ženki u fazama estrusnog ciklusa (Kato i sar., 2013; Hojo i sar., 2009). Veza između E2 i gustine dendritskih trnića uočena je i kod žena tokom trudnoće, kada je nivo E2 veoma visok; gustina dendritskih trnića u CA1 regionu tokom kasne trudnoće i perioda laktacije značajno je veća u odnosu na njihovu gustinu u proestrusu (Kinsley i sar., 2006).

### **7.3. Efekti 17 $\beta$ -estradiola na nivou hipokampusa**

Estradiolski receptori su široko ekspimirani u svim ćelijama hipokampusa. Veća ekspresija ER $\alpha$  i ER $\beta$  je uočena u hipokampusu ženki u proestrusu u odnosu na mužjake i ženke u diestrusu (Romeo i sar., 2005; Zhang i sar., 2002), dok razlika u njihovoj distribuciji među polovima nije uočena (Romeo i sar., 2005). ER $\beta$  je primarno lokalizovan u citosolu dok se ER $\alpha$  može predominantno naći u ćelijskim jedrima. Iako je ER $\beta$  dominantno ekspimiran receptor u odnosu na ER $\alpha$ , ER $\alpha$  je transkripciono aktivniji (Kalita i sar., 2005; Milner, 2001, 2005). Pokazana je i sinaptička lokalizacija ER (Nishio i sar., 2004; Tabatadze 2013): ER $\beta$  je predominantno ekspimiran u glutamatskim sinapsama, dok je ER $\alpha$  prisutan u sinaptičkom citosolu, membrani i u sinaptičkim vezikulama excitatornih i inhibitornih sinapsi, što se dovodi u vezu sa njihovom ulogom u regulaciji oslobađanja neurotransmitera (Kalita i sar., 2005; Tabatadze i sar., 2013).

Kako u fiziološkim uslovima, tako i nakon tretmana E2, aktivacija ER u hipokampusu dovodi do promena u veličini, morfologiji i gustini sinapsi, nadražljivosti neurona, sinaptičkoj transmisiji u glutamatskim sinapsama, sinaptičkoj plastičnosti i poboljšanja u tipovima učenja koji su zavisni od hipokampusa, ali deluje i na glijske ćelije

koje direktno utiču na formiranje i održavanje sinaptičkih kontakata. Zbog kompleksnosti promena koje su uočene tokom estrusnog ciklusa, za istraživanje efekata i mehanizma delovanja E2 intenzivno se koriste ženke podvrgnute bilateralnoj ovarijektomiji (hiruško odstranjivanje jajnika), pri čemu se ukida primarni izvor ženskih polnih hormona. Wooley i McEween su još 1993. uočili da bilateralna ovarijektomija (OVX) ženki pacova dovodi do postepenog pada gustine dendritskih trnića u CA1 regionu hipokampusa, dok se nakon *in vivo* tretmana E2 gustina dendritskih trnića povećava (Gould i sar., 1990; Luine i Frankfurt, 2013). Isto tako, tretman OVX ženki estradiolom dovodi do poboljšanja u procesima učenja zavisnih od hipokampusa (Hajszan i sar., 2007; Sellers i sar., 2015a; Luine i sar., 2003).

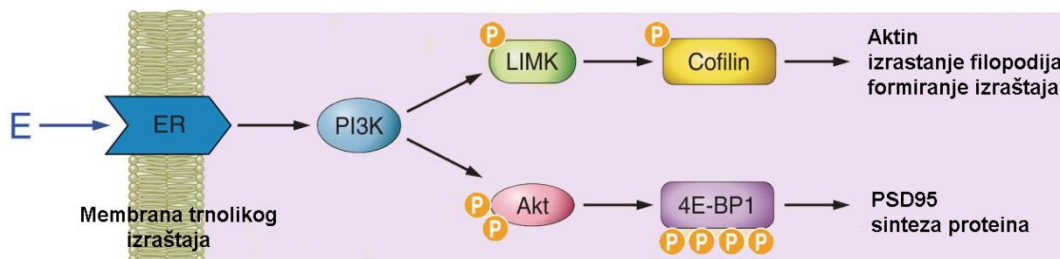
Bilateralna ovarijektomija (hiruško uklanjanje testisa), takođe dovodi do značajnog gubitka dendritskih trnića u CA1 regionu hipokampusa mužjaka. Dugo se smatralo da je povećanje gustine dendritskih trnića uočeno na presecima mozga mužjaka nakon *in vitro* aplikacije E2, fenomen povezan sa načinom aplikacije i da se ne događa *in vivo* (Murakami i sar., 2006, 2015; Ogiue-Ikeda i sar., 2008; Ooishi i sar., 2012; Leranth i sar., 2003; Frick i sar., 2015). Međutim, skorašnja studija je pokazala da aplikacija E2 povećava gustinu dendritskih trnića u hipokampusu adultnih gonadektomisanih mužjaka, u jednako kratkom vremenskom intervalu kao i kod ženki (Jacome i sar., 2016). Aplikacija E2 utiče na procese dugotrajne potencijacije, što za posledicu ima poboljšanja u procesima učenja i pamćenja oba pola. Takođe, tretman E2 dovodi do povećanja unutarćelijske koncentracije  $Ca^{2+}$  u astrocitima, oslobađanja gliotransmitera (Rasooli-Nejad i sar., 2014) i brzo izduživanje GFAP (glijalni fibrilarni kiseli protein)-pozitivnih nastavaka (Bernardinelli i sar., 2014), te tako astrociti direktno utiču na procese sinaptičke plastičnosti. Litearturni podaci o efektima P4 na procese sinaptičke plastičnosti su oskudni, osim podataka da tretmani P4 dovode do bifaznog efekta na procese sinaptogeneze: u prvih 2-6 h nakon tretmana, P4 dovodi do povećanja, dok nakon 18h smanjuje gustinu sinapsi (Wooley i sar., 1993), ali i pojačanog oslobađanja trofičkih faktora iz astrocita koji direktno utiču na procese sinaptogeneze (Su i sar., 2012). Oba hormona ispoljavaju izražene neuroprotektivne funkcije u patološkim stanjima CNS, te se tako njihovi efekti intenzivno izučavaju.

## 8. Brza modulacija spinogeneze i sinaptogeneze 17 $\beta$ -estradiolom

Reorganizacija neuronskih kola tokom života jedinki uključuje morfološke promene na nivou sinapsi. Pokazano je da E2 utiče na njihovu strukturu i funkciju aktivacijom kako brzih, tako i sporih mehanizama. Kao što je prethodno opisano, aktivacijom membranskih receptora, E2 inicira brze morfološke promene u trnolikim izraštajima i reorganizaciju membrana u nivou sinapsi, dovodi do povećanja količine sinaptičkih proteina, jačanja efikasnosti sinaptičke transmisije, odnosno dovodi do spinogeneze i sinaptogeneze u hipokampusu glodara. Jedan od mehanizama kojim E2 deluje na sinapse, preko LIMK-1-kofilin signalnog puta, inicira proces polimerizacije aktina i stimuliše formiranje filopodija od kojih mogu postati zreli dendritski trnčići (Slika 10) (Kramar i sar., 2009). Paralelno sa polimerizacijom aktina, E2 dovodi do aktivacije ERK- i/ili Akt - mTOR signalnog puta i fosforilacije regulatora lokalne sinteze proteina, 4E-BP1 (Slika 10), čija je aktivacija ključna za pokretanje lokalne sinteze proteina neophodnih za procese remodelovanja sinapsi (Akama i McEween, 2003; Fortress i sar., 2013; Hasegawa i sar., 2015; Hojo i sar., 2015; Sellers i sar., 2015a; Tuscher i sar., 2016). Pokretanje ovih signalnih puteva zavisi od aktivacije NMDA receptora (Weiland i sar., 1992) i inhibicije GABA transmisije (Rudick i sar., 2003). Kako bi se formirali dendritski trnčići, dolazi do brze lokalne sinteze i grupisanja sinaptičkih adaptornih proteina u oblast postsinaptičkih zadebljanja, prvenstveno proteina postsinaptičkih gustina 95 (engl. *Post-synaptic density protein 95*, PSD95) i neuroligina 1 (Nlg-1). PSD95 je adapterski protein koji se među prvima može detektovati u nezrelim sinapsama. Takođe, ključna je komponenta zrelih dendritskih trnčića, jer ima važnu funkciju u procesima održanja strukturne plastičnosti, transportu receptora za glutmat, pozicioniranje proteina neophodnih za formiranje i sazrevanje sinapsi. E2 dovodi i do brzog grupisanja Nlg-1, adhezivnog molekula koji je neophodan za stabilizaciju pre- i post sinaptičke komponente, kao i grupisanja GluN1 subjedinice NMDA receptora i GluA1 subjedinice receptora za  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiselinu (AMPA) (Zadran i sar., 2009). Brzo regrupisanje brojnih adapterskih i strukturnih proteina omogućava adekvatno pozicioniranje receptora i njihovo efikasno prenošenje signala. (Sellers i sar., 2015). Iako E2 dovodi do grupisanja mnogobrojnih proteina u oblast



postsinaptičke gustine, jedino povećana zastupljenost subjedinica NMDA receptora, NR1 i NR2B, ukazuje na formiranje nezrelih sinapsi (Srivastava i sar., 2008; Smith i sar., 2009; Potier i sar., 2015; Sellers i sar., 2015b).



**Slika 10. Mehanizmi brze modulacije spinogeneze i sinaptogeneze  $17\beta$ -estradiolom** (Modifikovano Hara i sar., 2015) (objašnjenje u tekstu).

Skorašnja istraživanja su dovela do postavljanja novog mehanizma sinaptičke plastičnosti označenog kao „two-step wiring plasticity“, koji je još uvek nedovoljno istražen u hipokampusu. Naime, pokazano je da sinapse mogu da sadrže NMDA, ali ne i AMPA receptore i označene su kao „tihе“ sinapse (engl. *silent synapses*). Na osnovu literaturnih podataka koji ukazuju da E2 može prolazno dovesti do povećanja broja funkcionalnih i istovremeno „tihih“ sinapsi, postavilo se pitanje fiziološke posledice ovog fenomena. Na osnovu dosadašnjih podataka, može se pretpostaviti da mogućnost E2 da prolazno izazove formiranje nezrelih „uspavanih“ sinapsi može imati za posledicu „pripremanje“ neurona za primanje informacija sa većom efikasnošću u odgovoru na ponovljene stimulse. Prema ovom modelu, E2 dovodi do formiranja novih, nezrelih sinaptičkih kontakata u kojima su lokalizovani NMDA receptori, ali ne i AMPA. Ukoliko dođe do drugog E2 stimulusa, dolazi do stabilizacije i jačanja sinaptičkih kontakata, a samim tim i povećanja kapaciteta neuronske mreže. U suprotnom, ovi novi kontakti se gube. Smatra se da je ovaj mehanizam u osnovi poboljšanja procesa učenja i memorije koji su uočeni nakon tretmana E2 u različitim istraživanjima na glodarima (pregled u Srivastava, 2012, Sellers i sar., 2015a).

## **9. Purinska signalizacija – polne specifičnosti i uloga polnih hormona**

Dosadašnji rezultati istraživanja metabolizma vanćelijskih adeninskih nukleotida u mozgu ukazuju na to da se komponente adenozijskog sistema npr. nivo adenzina, ekspresija i distribucija koncentrišućih i ekvilibrišućih adenozijskih transportera (CNT, ENT), adenozijskih receptora i enzima koji učestvuju u metabolizmu nukleotida i nukleozida razlikuju među polovima (Kovacs i sar., 2011). Ipak, saznanja o polno-specifičnim razlikama među komponentama purinske signalizacije su veoma oskudna. Iako se distribucija A1 receptora ne razlikuje među polovima (Lopes i sar., 1999), uočene su polno-specifične razlike u aktivnosti eN u frakciji sinaptozoma hipokampusu pacova (Rucker i sar., 2004) i ekspresiji ENT1-iRNK u mozgu miševa (Lu i sar., 2004), te je moguće da nukleotidi i nukleozidi imaju ulogu u polno-specifičnim adaptacijama mozga u odgovoru na različite stimulse, međutim neophodna su dodatna istraživanja na ovom polju kako bi se eventualne polne razlike potvrdile ili opovrgle.

Ektonukleotidaze su deo kompleksne mreže koja je pod uticajem polnih hormona, međutim i rezultati istraživanja o efektima samih hormona na komponente purinskog sistema su veoma oskudni. Poznato je, na primer, da bilateralna OVX dovodi do povećanja aktivnosti eN u sinaptozomima kore prednjeg mozga ženki pacova, dok hroničan tretman estradiolom vraća aktivnost eN na fiziološke vrednosti (Rucker i sar., 2005). U medijalnom i lateralnom hipotalamusu, akutni tretman E2 dovodi do prolaznog povećanja ekspresije NTPD-aze 3 (Kiss i sar., 2009).

S obzirom na to da su polni hormoni odgovorni za polnu diferencijaciju mozga, možemo pretpostaviti da su potencijalne polne razlike u aktivnosti različitih signalnih sistema, uključujući ATP i adenzin, indukovane polnim hormonima. Kako bismo proširili saznanja o potencijalnim polnim razlikama u purinskoj signalizaciji, moramo početi od efekata polnih hormona na pojedinačne komponente ovog izuzetno važnog signalnog sistema u CNS. Zato je u ovoj tezi ispitan uticaj hormonskog statusa i potencijalni

mehanizam regulacije/modulacije sinaptičkih NTPD-aza i eN polnim hormonima u hipokampusu, strukturi izuzetno osetljivoj na delovanje hormona, kod mužjaka i ženki pacova.

## II CILJEVI

Poznato je da fluktuacije ženskih polnih hormona tokom estrusnog ciklusa dovode do variranja u gustini dendrita i remodelovanja sinaptičkih mreža u hipokampusu. Takođe, aplikacija  $17\beta$ -estradiola dovodi do brze spinogeneze i sinaptogeneze, sinaptičke plastičnosti i poboljšanja kognitivnih sposobnosti i u fiziološkim i u patološkim stanjima kod oba pola. Imajući u vidu ulogu adeninskih nukleotida u neurotransmisiji, neuromodulaciji i sinaptičkoj plastičnosti u CNS, a čiji je nivo u vanćelijskom prostoru regulisan ektonukleotidazama, zadatak ove doktorske teze bio je ispitati ulogu ženskih polnih hormona, posebno  $17\beta$ -estradiola, u modulaciji/regulaciji aktivnosti i ekspresije ektonukleotidaza u sinaptozomima hipokampusa. S toga su u izradi ove doktorske disertacije formulisani sledeći ciljevi:

1. Ispitavanje uloge ženskih polnih hormona u modulaciji/regulaciji vanćelijskog metabolizma adeninskih nukleotida u sinaptozomima hipokampusa ženki pacova. Posebno je ispitano:

- da li endogena fluktuacija ovarijalnih hormona tokom estrusnog ciklusa utiče na aktivnost NTPD-aza i eN u hipokampalnim sinaptozomima ženki pacova;

- da li uklanjanje jajnika, koji su osnovni izvor ženskih polnih hormona, utiče na promenu aktivnosti ektonukleotidaza;
- da li tretman  $17\beta$ -estradiolom (E2) menja aktivnost i proteinsku ekspresiju ektonukleotidaza NTPD-aze 1-3 i eN u sinaptozomima hipokampusa OVX ženki pacova;
- kakva je uloga  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  u modulaciji/regulaciji aktivnosti i proteinske ekspresije eN nakon *in vivo* i *in vitro* tretmana specifičnim agonistima estradiolskih receptora (PPT i DPN) i njihovim antagonistom (ICI 182.780).

2. Ispitivanje uticaja  $17\beta$ -estradiola na aktivnost i ekspresiju ektonukleotidaza u hipokampalnim sinaptozomima mužjaka pacova. Posebno je ispitano:

- da li uklanjanje testisa, koji su primarni izvor muških polnih hormona, utiče na promenu aktivnosti ektonukleodaza u sinaptozomima mužjaka pacova;
- da li tretman  $17\beta$ -estradiolom (E2) izaziva promene aktivnosti i ekspresije NTPD-aza 1-3 i eN;
- kakva je uloga estradiolskih receptora u modulaciji eN u sinaptozomima polno zrelih mužjaka;
- da li aplicirana doza  $17\beta$ -estradiola izaziva sinaptičke rearanžmane u hipokampusu mužjaka.

3. Ispitivanje efekta hroničnog (sedmodnevnog) tretmana steroidnim hormonima ( $E\alpha$ , E2, P4) na aktivnost i ekspresiju eN u hipokampusu OVX ženki i mužjaka pacova, i posebno:

- da li postoje polne specifičnosti u ekspresiji eN u hipokampusu pacova;
- kakav je efekat ovarijektomije na bazalnu aktivnost i ekspresiju eN u hipokampusu pacova;
- kakav je efekat ponovljenih tretmana steroidnim hormonima ( $E\alpha$ , E2, P4) na transkripcionu, translacionu i funkcionalnu ekspresiju/aktivnost eN u hipokampusu pacova oba pola.

# III MATERIJALI I METODE

## 1. Hemikalije

Sve hemikalije, korišćene u ovom radu su p.a. stepena čistoće. Sledeće hemikalije proizvod su kompanije Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA):  $17\beta$ -estradiol benzoat (E2),  $17\alpha$ -estradiol ( $E\alpha$ ), E2 konjugovan sa goveđim albuminom iz seruma (E-BSA), dimetil-sulfoksid (DMSO), Folin-Chicalteau-ov reagens, adenzin-5' trifosfat natrijumova so (ATP), adenzin-5' difosfat natrijumova so (ADP), adenzin-5' monofosfat natrijumova so (AMP), para-nitrofenil fosfat (p-NPP), dietanolamin. Progesteron (P4) i goveđi albumin iz seruma (BSA) proizvod su SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany). Od firme Tocris Bioscience (Bristol, UK) nabavljeni su specifični agonisti  $ER\alpha$ , 4,4',4''-(4-Propil-[1H]-pirazol-1,3,5-triyl)trisfenol (PPT) i  $ER\beta$ , 2,3-bis(4-Hidroksifenil)-propionitril (DPN) i neselektivni antagonist  $ER$ ,  $7\alpha,17\beta$ -[9-[(4,4,5,5,5 Pentafluoropentil)sulfinil]nonil]estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol (ICI 182.780). Malahit zeleno-oksalat proizvod je firme MERCK (Darmstadt, Nemačka). Za RT-PCR analize korišćen je kit za reverznu transkripciju proizvođača Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), dok je za PCR analizu korišćen kit Kappa Biosystems.

## 2. Eksperimentalne životinje i hirurške procedure

U ovom radu korišćeni su tri meseca stari pacovi soja Wistar, mase 200-250 g (ženke) i 250-280 g (mužjaci). Životinje su odgajane u vivarijumu Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča" u Beogradu. Životinje su živele pod kontrolisanim uslovima temperature i svetlosnog režima (12 sati svetlosti/12 sati mraka), sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Svi eksperimenti su izvedeni u saglasnosti sa principima koje propisuje publikacija *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 80-23) i odobreni su od strane Etičke komisije za rad sa oglednim životinjama Instituta za nuklearne nauke "Vinča", kao i od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine, Uprava za veterinu (rešenje br. 323-07-03832/2015-05/1). U svim eksperimentima se koristio minimalan broj životinja.

Životinje su podeljene u sledeće eksperimentalne grupe:

1. Polno zrele intaktne ženke pacova u pojedinačnim fazama estrusnog ciklusa: proestrus-PRO, estrus-EST, diestrus-DIEST. Faze estrusnog ciklusa praćene su na osnovu vaginalnog razmaza, u jutarnjim časovima (9h) tokom dve nedelje. U eksperimentima su korišćene životinje sa regularnim estrusnim ciklusom u trajanju od 4-5 dana. Faze estrusnog ciklusa su određene na osnovu prisustva epitelijalnih ćelija sa vidljivim jedrom, orožalih ćelija epitela i leukocita;

2. OVX, ženke kod kojih je izvršeno obostrano uklanjanje jajnika, ovarijektimija. Ovaj zahvat izveden je u opštoj anesteziji ketaminom, 50 mg/kg, s.c. i ksilazinom, 5 mg/kg, s.c., pravljjenjem jednog reza na koži sa dorzalne strane tela, nakon čega se formiraju dva bilateralna reza u mišićima, kako bi se prodrlo u peritonealnu šupljinu. Ovarijumi su, zajedno sa uterusom, odvojeni od okolnog masnog tkiva i nakon podvezivanja roga uterusa i arterija, hirurškim koncem, ovarijumi su odstranjeni. Životinje su ostavljene tri nedelje na oporavak, do daljih tretmana;

3. Sham OVX, grupa životinja lažno operisanih ženki, kako bi se isključio potencijalni efekat anestezije na ispitivane parametre. Životinje su prošle kroz isti operativni zahvat kao OVX, ali bez odstranjivanja ovarijuma, i ostavljene tri nedelje na

oporavak. Pošto nakon lažne operacije nije došlo do promene aktivnosti i ekspresije ispitivanih enzima, rezultati nisu prikazani, ni diskutovani;

4. M, polno zreli intaktni mužjaci;

5. GDX, mužjaci sa obostrano uklonjenim gonadama, orhiektomisani. Bilateralna orhiektomija izvedena je u opštoj anesteziji ketaminom, 50 mg/kg, s.c. i ksilazinom, 5 mg/kg, s.c. Zahvat je izveden formiranjem jednog reza na sredini skrotuma. Koža je odvojena od mišićnog sloja, a isti poprečni rez je formiran i kroz mišić. Nakon podvezivanja semenovoda (*ductus deferens*), testisi su izolovani i odstranjeni. Životinje su ostavljene sedam dana na oporavak;

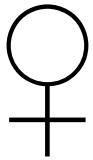

6. Sham GDX, mužjaci kod kojih je izvršena lažna operacija, kako bi se isključio potencijalni efekat anestezije na ispitivane parametre. Životinje su prošle kroz isti operativni zahvat kao GDX, ali bez odstranjivanja testisa, i ostavljene sedam dana na oporavak.

### **3. Tretman životinja**

Životinje su tretirane u akutnom (jednokratnom) i hroničnom (sedmodnevnom) režimu. Prilikom primene akutnog tretmana (1 doza), životinje su tretirane: 1) 17 $\beta$ -estradiol benzoatom (E2), 2) selektivnim agonistima estradiolskih receptora ER $\alpha$  ili ER $\beta$ , PPT, odnosno DPN, i 3) neselektivnim antagonistom estradiolskih receptora, ICI 182.780, kao i (4) ICI 182.780 u kombinacijom sa E2 (Tabela 1). Svi ligandi rastvoreni su u dimetil sulfoksidu (DMSO) u dozama navedenim u Tabeli 1. Kontrolne životinje tretirane su odgovarajućom zapreminom DMSO koji nije sadržao ni jedan od testiranih liganada kako bi se isključio efekat samog nosača na ispitivane enzime.



**Tabela 1. Pregled eksperimentalnih grupa i akutnih tretmana**

<b>POL</b>	<b>EKSPERIMENTALNE GRUPE I AKUTNI TRETMANI</b>							
	<b>INTAKTNE</b> (Ž)	Proestrus ( <b>PRO</b> )						
		ESTRUS ( <b>EST</b> )						
		DIESTRUS ( <b>DIEST</b> )						
	<b>OVARIJEKTOMISANE</b>	<b>OVX</b> <i>(bez tretmana)</i>	<b>OVX<sub>K</sub></b> 1 ml/kg DMSO	<b>OVX+E2</b> 33,3 µg/kg	<b>OVX+ICI</b> 2 mg/kg	<b>OVX+ICI+E2</b> 2 mg/kg + 33,3 µg/kg	<b>OVX+PPT</b> 2,5 mg/kg	<b>OVX+DPN</b> 2,5 mg/kg
	<b>LAŽNO</b> <b>OVARIJEKTOMISANE</b>	<b>Sham OVX</b> <i>(bez tretmana)</i>	/	/	/	/	/	/
	<b>INTAKTNI</b>	<b>M</b> <i>(bez tretmana)</i>	<b>M<sub>K</sub></b> 1 ml/kg DMSO	<b>M+E2</b> 33,3 µg/kg	<b>M+ICI</b> 2 mg/kg	<b>M+ICI+E2</b> 2 mg/kg + 33,3 µg/kg	<b>M+PPT</b> 2,5 mg/kg	<b>M+DPN</b> 2,5 mg/kg
	<b>ORHIEKTOMISANI</b>	<b>GDX</b> <i>(bez tretmana)</i>	/	/	/	/	/	/
	<b>LAŽNO</b> <b>ORHIEKTOMISANI</b>	<b>Sham GDX</b> <i>(bez tretmana)</i>	/	/	/	/	/	/

Primenjena jednokratna doza (33,3 µg/kg) kod OVX ženki, odmah nakon aplikacije dovodi do nadfizioloških vrednosti E2 u cirkulaciji i vraća se u fiziološki opseg nakon 24 h (Woolley i McEwen, 1993). Kod polno zrelih mužjaka, 24 h nakon tretmana sličnim dozama E2, koncentracija E2 u cirkulaciji ostaje i dalje višestruko povećana u odnosu na kontrolne životinje (Obradović i sar., 2014). Doze za ICI 182.780 (Alfinito i sar., 2008), PPT i DPN (Mazzucco i sar., 2006; Gonzales i sar., 2008) su odabrane na osnovu prethodnih istraživanja. Svi tretmani su aplicirani u jutarnjim časovima, a životinje su žrtvovane 24 h nakon tretmana.

Radi potvrde estrogenog efekta tretmana, nakon dekapitacije su izolovani uterusi životinja svih eksperimentalnih grupa, čije su mase merene na analitičkoj vagi, nakon odstranjivanja masnog tkiva (Tabela 2).

**Tabela 2. Efekat primenjenih akutnih tretmana na masu uterusa**

<b>TRETMAN</b>	<b>MASA UTERUSA (mg ± SEM)</b>
<b>Ž</b>	359 ± 1
<b>OVX</b>	143 ± 5 #
<b>OVX<sub>K</sub></b>	148 ± 4
<b>OVX+E2</b>	356 ± 2*
<b>OVX+ICI</b>	131 ± 5
<b>OVX+ICI+E2</b>	130 ± 4
<b>OVX+PPT</b>	352 ± 2*
<b>OVX+DPN</b>	136 ± 1

Nivo statističke značajnosti \*p < 0.001 u odnosu na OVX grupu i #p < 0.001 u odnosu na Ž grupu

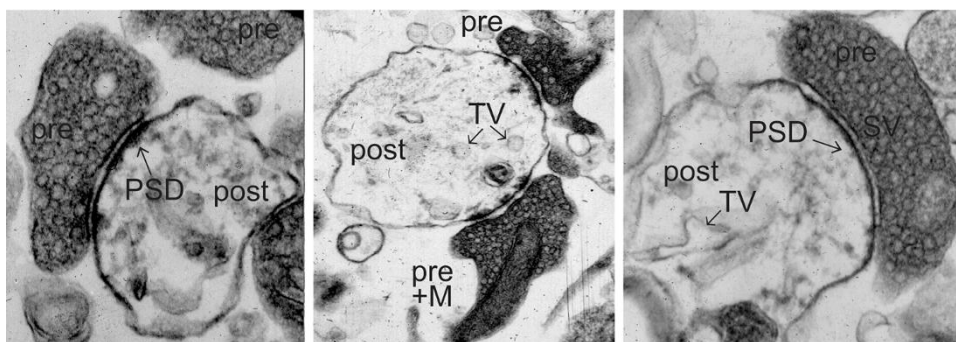
Prilikom ponovljenih (sedmodnevnih) tretmana, polno zreli, intaktni mužjaci i OVX ženke su tretirane 17 $\beta$ -estradiol benzoatom (E2), 17 $\alpha$ -estradiolom (E $\alpha$ ) i progesteronom (P4) (Tabela 3). Kao rastvarač hormona korišćeno je komercijalno laneno ulje (LU), kako bi se izbegao neurotoksični efekat DMSO pri hroničnim tretmanima. Kontrolne životinje su tretirane sedam dana samo lanenim uljem (LU). Doza za E2 od 33.3  $\mu$ g/kg primenjena je i za sedmodnevne tretmnane. Nakon sedmodnevnog tretmana E2, izmerene su nadfiziološke koncentracije E2 u serumu. Već nakon prve doze, dolazi do inicijalnog skoka nivoa E2 u cirkulaciji (~200 pg/ml), da bi nakon sedmog dana izmerena koncentracija E2 iznosila ~600 pg/ml (Barker i Galea., 2009). S obzirom na to da 17 $\alpha$ -estradiol nije moguće detektovati u cirkulaciji (Torran-Allerand i sar, 2005b), primenjena doza je ista kao i za E2, kako bi se efekti ovih estrogen mogli direktno porediti. Nakon jednokratnog tretmana dozom P4 od 1.7 mg/kg, a koja je odabrana za sedmodnevni tretman, u serumu se tokom 24 h može izmeriti P4 u fiziološkom opsegu ~10ng/ml (Gibbs, 1998, 1999). Svi tretmani su aplicirani u jutarnjim časovima, a životinje su žrtvovane 24 h nakon poslednje doze hormona.

**Tabela 3. Pregled eksperimentalnih grupa i hroničnih tretmana**

<i><b>POL</b></i>	<i><b>HRONIČNI (SEDMODNEVNI) TRETMANI</b></i>			
<i><b>OVX ŽENKE</b></i>	<b>LU</b> (1 ml/kg)	<b>E<math>\alpha</math></b> (33,3 $\mu$ g/kg)	<b>E2</b> (33,3 $\mu$ g/kg)	<b>P4</b> (1,7 mg/kg)
<i><b>INTAKTNI MUŽJACI</b></i>	<b>M+LU</b> (1 ml/kg)	<b>M+E<math>\alpha</math></b> (33,3 $\mu$ g/kg)	<b>M+E2</b> (33,3 $\mu$ g/kg)	<b>M+P4</b> (1,7 mg/kg)

## 4. Priprema sinaptozoma

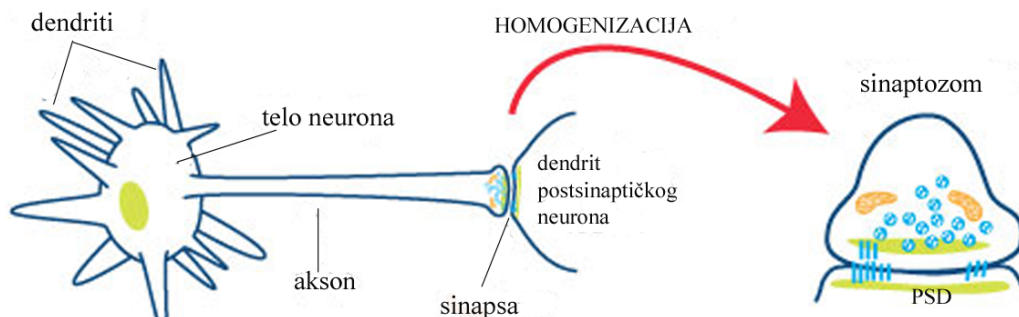
Sinaptozomska frakcija je frakcija nervnog tkiva koja se sastoji od zatopljenih membrana nervnih završetaka, koje okružuju sadržaj tipičan za neurone – citsol, sinaptičke vezikule i mitohondrije, i predstavlja veoma dobar model za izučavanje molekulskih i funkcionalnih karakteristika sinapsi. Sinaptozomi obavljaju deo funkcija koje se u ovom odeljku dešavaju *in vivo*: proizvode ATP, mogu oslobađati i preuzimati neurotransmitere, sadrže enzime i sinaptičke vezikule kao i funkcionalne jonske kanale, transportere i receptore (Dunkley i sar., 2008). U kompleksu sa nervnim završetkom ostaje i postsinaptička membrana neurona sa pridruženim postsinaptičkim gustinama (*eng.* Post Synaptic Density, PSD), koja se takođe zatapa sa lokalnim postsinaptičkim sadržajem (Corera i sar., 2009). Sinapse predstavljaju oko 1-2 % ukupne zapremine hipokampusa i sadrže veliku količinu proteina.



**Slika 11. Elektronska mikrografija preparata sinaptozoma** (Modifikovano Corera i sar., 2009). pre- presinaptički odeljak, post- postsinaptički odeljak, PSD- postsinaptičke gustine, SV-sinaptičke vezikule, TV-tubularne i vezikularne strukture, pre+M- mitohondrije u presinaptičkom odeljku.

S obzirom na to da neuroni ne mogu ostati intaktni nakon homogenizovanja tkiva (Slika 12), njihovi nervni završeci se, u izotoničnoj sredini, otkidaju od aksona, a ćelijske membrane nervnih završetaka i dendritskih trnića sa kojim uspostavljaju sinapse se zatvaraju formirajući sinaptozom (Slika 11). Ove vezikule mogu biti prečišćene centrifugiranjem na gradijentu koncentracija saharoze, *Percoll*-a ili *Ficoll*-a, a zahvaljujući

zadovoljavajućoj čistoći ove subćelijske frakcije moguće su studije određenih fizioloških i farmakoloških aspekata sinaptičke funkcije (Dunkley i sar., 2008).



**Slika 12. Ilustracija dobijanja sinaptozoma iz homogenata nervnog tkiva** (Modifikovano Wu i sar., 2012)

#### **4.1. Izolovanje neprečišćene membranske frakcije (P2)**

Životinje su žrtvovane dekapitacijom pomoću giljotine za male životinje (Harvard Apparatus), 24 h nakon navedenih tretmana. Gruba, neprečišćena membranska frakcija (P2), izolovana je po metodi Cotman i Matthews (1971). Sve faze pripreme tkiva i sve ostale faze prečišćavanja frakcija odvijale su se na 4°C.

Nakon izolovanja iz lobanje, mozak je ispiran u izolacionom puferu (0,32 M saharoza, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4), a hipokampus (Hip) je izolovan na ledu. Hipokampusi iz životinja iste eksperimentalne grupe (3 životinje po grupi) spajani su i homogenizovani u 10 zapremina izolacionog pufera, u staklenom homogenizeru sa teflonskim klipom (zazor između homogenizera i klipa je 0,20 mm). Klip je pričvršćen na motor i homogenizacija se odvijala na 800 rpm sa 10 pokreta. Homogenat je, dalje, centrifugiran 10 min  $1000 \times g$  (Beckman, JA-20). Supernatant je odliven i sačuvan, a talog, u kome su nehomogenizovani fragmenti i jedra, ispiran je sa 10 volumena izolacionog pufera, centrifugiranjem pri istim uslovima. Supernatanti su spajani i centrifugirani 25 min na  $15\,000 \times g$  (Beckman, JA-20). Ovako dobijeni talog sadrži, pored sinaptozoma i gliozoma (zatopljene delove astrocita), mijelin, ukupne mitohondrije i određeni procenat membranskih fragmenata koji potiču od

liziranih neurona i zato je označen kao neprečišćeni sinaptozomalni preparat ili gruba membranska P2 frakcija.

## 4.2. Izolovanje sinaptozoma

Prečišćavanje sinaptozoma izvedeno je na gradijentu *Percoll*-a, koji je rastvoren u medijumu za *Percoll* (0,32 M saharoza, 1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl pH 7,4). Dobijena P2 frakcija se rastvara u 1-2 ml izolacionog pufera i nanosi na ranije pripremljen i ohlađen na 4 °C, gradijent *Percoll*-a (3, 10 i 23 %). Nakon centrifugiranja na  $33.500 \times g$  u trajanju od 5 min (Beckman, JA-20), sinaptozomi su prikupljeni iz međusloja 10 % i 23 % faza i isprani u izolacionom medijumu, centrifugiranjem 30 min na  $14\ 000 \times g$  (Beckman, JA-20) (Dunkley i sar., 2008). Supernatant je odliven, a dobijeni talog, koji sadrži prečišćene hipokampalne sinaptozome je resuspendovan u izolacionom medijumu i čuvan na -80°C do korišćenja.

## 5. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima, korišćena je metoda Markwell-a i saradnika (1978) koja predstavlja modifikaciju metode po Lowry-ju (1951). U modifikovanoj metodi u odnosu na originalnu dodaje se natrijum-dodecil-sulfat (SDS) u alkalni reagens i povećava se količina bakar-tartaratnog reagensa. Ova modifikacija omogućava primenu metode za određivanje koncentracije proteina bez prethodne solubilizacije ili ekstrakcije lipida, kao i za uzorke koji sadrže saharozu ili EDTA.

Rastvori i reagensi korišćeni u ovoj metodi:

Reagens A: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 0,4% NaOH + 0,16% Na-tartarat + 1% SDS

Reagens B: 4%  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

Reagens C = Reagens A: Reagens B = 100:1

Folin-Chicalteau-ov reagens (Sigma), koji je razblažen dejonizovanom vodom u odnosu 1:1.

## 6. Određivanje enzimske aktivnosti ektonukleotidaza

Hidroliza ATP, ADP i AMP ispitana je u frakcijama prečišćenih sinaptozoma ili P2 frakcijama izolovanim iz hipokampusa ženki i mužjaka pacova. Metoda je u pogledu količine enzima, koncentracije supstrata i vremena inkubacije prethodno standardizovana u posebnim eksperimentima, kako bi se odredili optimalni uslovi za enzimsku aktivnost i linearnost enzimske reakcije.

### 6.1. Ispitivanje enzimske aktivnosti NTPD-aza

Aktivnost NTPD-aza ispitana je u inkubacionoj smeši u prisustvu ATP i ADP kao supstrata.

Standardna inkubaciona smeša za ispitivanje hidrolize ATP i ADP u frakciji prečišćenih sinaptozoma sadržala je sledeće komponente: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glukoza, 225 mM saharoza, 150 μM ATP ili ADP, 10 μg proteina.

Standardna inkubaciona smeša za ispitivanje hidrolize ATP i ADP u P2 frakciji sadržala je sledeće komponente: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 μM ATP ili ADP, 10 μg proteina.

Ukupna zapremina inkubacione smeše je 200 μl. Probe koje sadrže sve komponente osim supstrata preinkubirane su 10 min u vodenom kupatilu na 37°C. Reakcija otpočinje dodavanjem ATP ili ADP i odvijala se 10 min na 37°C, a zaustavljena je dodavanjem 22 μl hladne 3 M perhlorne kisline. Probe su ohlađene na ledu 10 min i potom određena aktivnost enzima na osnovu količine oslobođenog proizvoda enzimske reakcije - neorganskog fosfata (Pi). Kao „slepe probe" (*blank*) služile su probe kojima se uzorak dodaje nakon zaustavljanja reakcije.

## 6.2. Ispitivanje enzimske aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze

Aktivnost eN ispitana je u inkubacionoj smeši u prisustvu AMP kao supstrata.

Standardna inkubaciona smeša za ispitivanje hidrolize AMP u u frakciji prečišćenih sinaptozoma sadržala je sledeće komponente: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM KCl, 135 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glukoza, 225 mM saharoza, 150 μM AMP, 10 μg proteina.

Standardna inkubaciona smeša za ispitivanje hidrolize AMP u P2 frakciji sadržala je sledeće komponente: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 μM AMP, 10 μg proteina.

Ukupna zapremina inkubacione smeše iznosi 200 μl. Probe koje sadrže sve komponente osim AMP inkubirane su 10 min u vodenom kupatilu na 37°C. Reakcija je otpočinjala dodavanjem AMP i trajala je 30 min na 37°C, a zaustavljena je dodavanjem 22 μl hladne 3 M perhlorne kisline. Probe su ohlađene na ledu 10 min i potom je određena aktivnost enzima, na osnovu količine oslobođenog proizvoda enzimske reakcije - neorganskog fosfata (Pi). Kao „slepe probe" (*blank*) služile su probe kojima se uzorak dodaje nakon zaustavljanja reakcije. Kako bi se isključio doprinos alkalne fosfataze na stepen hidrolize AMP, testiran je inhibitor ovog enzima, levamizol (1,0 mM) koji nije imao efekta. Aktivacija eN rastućim koncentracijama AMP (5-200 μM) procenjena je u istim uslovima kao što je prethodno opisano.

## 6.3. Ispitivanje enzimske aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze nakon *in vitro* tretmana

Kako bi se ispitali *in vitro* efekti estradiola na aktivnost eN, korišćeni su sveže izolovani sinaptozomi iz hipokampusa pojedinačnih OVX ženki (n = 4) i mužjaka (n = 4).

Sinaptozomi hipokampusa su inkubirani 10 min, na 37°C sa:

- agonistima estradiolskih receptora  $\alpha$  ili  $\beta$ , PPT ili DPN, u koncentracijama: 0,1, 1, 2,5 ili 5 μM;



- E2 ili E-BSA u koncentracijama slobodnog E2:  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $1 \mu\text{M}$ .

PPT, DPN i E2 su rastvoreni u etanolu, čija je finalna koncentracija iznosila maksimalno 0,5 %. Kako bi se isključio efekat etanola na nivo hidrolize AMP, testirane su probe koje sadrže etanol, u koncentracijama 0,5 % i manje i upoređene sa kontrolom. Etanol nije menjao nivo hidrolize AMP što je u skladu sa literaturnim podacima (Rucker i sar., 2005, Wink i sar., 2006). E-BSA (molarni odnos E2:BSA = 30:1) rastvoren je u Tris-HCl pH 7,4 i pre korišćenja u esejima filtriran kako bi se uklonio E2 koji se spontano odvojio od BSA. Efekat BSA na stepen hidrolize AMP testiran je na probama koje su sadržale samo BSA. BSA nije ostvario efekat na nivo hidrolize AMP. Aktivnost eN praćena je kao što je opisano u odeljku 6.2. Pošto etanol i BSA nisu imali uticaja na nivo hidrolize AMP ni kod OVX ženki niti kod mužjaka, rezultati su prikazani u odnosu na specifičnu aktivnost izmerenu u sinaptozomima OVX životinja i intaktnih mužjaka (M).

## 7. Određivanje koncentracije neorganskog fosfata

Hidroliza ATP, ADP i AMP praćena je merenjem količine oslobođenog Pi, prema modifikovanoj metodi Baykov i saradnika (1988), uz  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  kao standard. Metoda za određivanje koncentracije fosfata metodom malahit-zelenog, zasniva se na kvantifikaciji zelenog kompleksa formiranog između malahit-zelenog, molibdata i slobodnog ortofosfata. Obojeni kompleks formiran u reakciji sa neorganskim fosfatom određuje se na osnovu merenja apsorbovane svetlosti (600 – 660 nm), na spektrofotometru ili ELISA čitaču. Primenjena metoda validna je za merenje opsega koncentracija fosfata od 0,02 – 40  $\mu\text{M}$ .

Radni rastvor dobija se mešanjem 100 zapremina reagensa A (0,1 % Malahit-zeleno i 7,5% amonijum-molibdat u odnosu 4:1) i 1,6 zapremina reagensa B (11 % Tween 20). U svaki bunarić mikrotitar ploče uliva se 80  $\mu\text{l}$  enzimske smeše i 20  $\mu\text{l}$  radnog rastvora, nakon čega se ploča ostavlja 30 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbance obojenog kompleksa merene su na 650 nm, na multifunkcionalnom čitaču ploča (Wallac 1420 VICTOR, Perkin Elmer Instruments).

## **8. Ispitivanje enzimske aktivnosti tkivno nespecifične alkalne fosfataze**

Aktivnost tkivno-nespecifične alkalne fosfataze (TNAP) ispitana je u prisustvu para-nitrofenil fosfata (p-NPP) kao supstrata. Standardna reakcion smeša sadržala je: 50 µg proteina, 0,5 M dietanolamin pH 9,8, 1 mM MgCl<sub>2</sub> i 5 mM p-NPP u prisustvu ili bez 5 mM levamizola. Reakcija se odvijala 20 min na 25°C, nakon čega je zaustavljena dodavanjem 0,1 M NaOH. Aktivnost TNAP prikazana je u arbitrarnim jedinicama, odnosno izračunata oduzimanjem absorbanci reakcija (merenih na 405 nm) detektovanih u probama sa i bez levamizola i normalizovana u odnosu na količinu proteina.

## **9. Elektroforetsko razdvajanje proteina i imunoblot analiza**

Proteinska ekspresija odabranih ektonukleotidaza, NTPD-aza 1, 2, 3 i eN, ispitana je imunoblot analizom. Analizirani su uzorci sinaptozoma i P2 frakcije izolovani iz hipokampusa životinja ispitivanih eksperimentalnih grupa.

### **9.1. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu**

Uzorci prečišćenih sinaptozoma i P2 frakcija izolovanih iz Hip ženki i mužjaka pacova, čije su koncentracije svedene na 2 mg/ml, pomešani su sa puferom za uzorke (5 × *Laemmli Sample Buffer*, LSB). Uzorci pripremljeni neposredno pred upotrebu, kuvani su 5 min na 95 °C, u neredukujućim uslovima (bez dodatka 2-merkaptoetanolu) za NTPD-aze i eN i u redukujućim uslovima (sa 2-merkaptoetanolom) za ispitivanje svih ostalih proteina.

Proteini su razdvojeni elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE), korišćenjem Mini-Protean II (Bio Rad) kompleta. Oba akrilamidna gela, gel za razdvajanje i koncentrovanje, pripremaju se od sledećih polaznih rastvora: Tris pufer (1,5 M Tris pH 8,8 za gel za razdvajanje i 1 M Tris pH 6,8 za gel za koncentrovanje), 30 % akrilamid-metilen bis-akrilamid, 10 % SDS, 10 % amonijum-persulfat i tetraetil-metilen (TEMED).

Proteini od interesa razdvojeni su na gelovima za koncentrovanje (5 %) i razdvajanje (8 % i 10 %). Na gel je nanešeno po 10 ili 20  $\mu$ l uzorka (20 ili 40  $\mu$ g proteina, u zavisnosti od ispitivanog proteina) pripremljenih u LSB. Elektroforeza se odvijala u uslovima konstantnog napona (120 V) na sobnoj temperaturi.

## 9.2. Imunoblot analiza

Proteini iz uzoraka razdvojeni elektroforezom na gelu, preneseni su na imobilizirajući matriks, poliviniliden-fluoridnu membranu (engl. *polyvinylidene fluoride*, PVDF, Millipore, SAD), postupkom označenim kao imunobloting (engl. *immunoblotting*). Metoda se zasniva na kretanju pokretnih negativno naelektrisanih partikula (proteina, koji zbog pripreme u SDS imaju negativno naelektrisanje), ka pozitivnoj elektrodi u električnom polju. Usled toga proteini prelaze sa gela na membranu, koja se nalazi bliže anodi.

Transfer proteina odvijao se u puferu za transfer, u Mini-Trans blot sistemu (Bio Rad), tokom 1 h na 100 V (350 mA). Postupak nakon transfera proteina obuhvatao je:

- Blokiranje membrane, kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, u rastvoru za blokiranje – 5 % BSA (Serva) u fosfatnom puferu sa dodatkom deterdženta 0,5 % *Tween* (engl. *Phosphate Buffer Saline- Tween* pH 7,4 , PBS-T) ili u Tris-puferu sa dodatkom deterdženta (engl. *Tris Buffered Saline- Tween* pH 7,4, TBS-T);
- Inkubacija PVDF membrane u primarnom antitelu, preko noći na 4°C. Za imunoblot analize korišćena su prethodno dobro okarakterisana primarna antitela. Korišćena antitela i primenjena razblaženja navedena su u Tabeli 4;
- Ispiranje nevezanih i nespecifično vezanih primarnih antitela u PBS-T ili TBS-T-u (3  $\times$  10 min);
- Inkubacija u sekundarnom antitelu (1 h). Sva sekundarna antitela (Tabela 5), spregnuta sa peroksidazom rena (engl. *Horse Radish peroxidase*, HRP), razblažena su u PBS-T ili TBST-u u odnosu 1:10 000;
- Ispiranje nevezanih i nespecifično vezanih sekundarnih antitela u PBS-T ili TBS-T (3  $\times$  10 min).

**Tabela 4. Primarna antitela korišćena u imunoblot analizi**

<i>ANTITELO</i>	<i>PROIZVOĐAČ, POREKLO</i>	<i>Razblaženje</i>
<i>anti-CD39</i>	AbCam (UK), zamorac, poliklonsko	1:1000
<i>anti-NTPD-aza 2, klon BZ3-4F</i>	poklon prof. J. Sevigny, Université Laval, Canada, zec (Sevigny i sar., 2002)	1:2000
<i>anti-NTPD-aza 3, klon Klh 14</i>	nekomercijalno antitelo, poklon prof. Terence Kirley, Univerzitet u Sinsinatiju; zec (Belcher i sar., 2006; Bjelobaba i sar., 2010; Grkovic i sar., 2016)	1:2000
<i>anti-CD73, klon rNu-9LI5</i>	poklon prof. J. Sevigny, Université Laval, Canada, zec (Sevigny i sar., 2002; Fausther i sar., 2012)	1:2000
<i>anti-ER<math>\alpha</math></i>	Santa Cruz Biotechnology (USA), zec, poliklonsko	1:1000
<i>anti-ER<math>\beta</math></i>	Santa Cruz Biotechnology (USA), koza, poliklonsko	1:500
<i>anti-fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)</i>	Cell Signaling Technology (USA), zec, poliklonsko	1:1000
<i>anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)</i>	Cell Signaling Technology (USA), zec, poliklonsko	1:1000
<i>anti-fosfo-Akt (Ser473)</i>	Cell Signaling Technology (USA), zec, poliklonsko	1:1000
<i>anti-Akt</i>	Cell Signaling Technology (USA), zec, poliklonsko	1:200
<i>anti-fosfo-mTOR (Ser2448)</i>	Santa Cruz Biotechnology (USA), miš, poliklonsko	1:500
<i>anti-mTOR</i>	Santa Cruz Biotechnology (USA), miš, poliklonsko	1:500
<i>anti-sintaksin1</i>	Santa Cruz Biotechnology (USA), miš, poliklonsko	1:5000
<i>anti-sinaptofizin</i>	Santa Cruz Biotechnology (USA), zec, poliklonsko	1:500
<i>anti-PSD95 (klon 7E3-1B8)</i>	Merck Millipore (Nemačka), miš, poliklonsko	1:4000
<i>anti-NMDARN1</i>	Merck Millipore (Nemačka), zec, poliklonsko	1:1000
<i>anti-NCAM</i>	Merck Millipore (Nemačka), zec, poliklonsko	1:1000
<i>anti-PSA-NCAM (klon 2-2B)</i>	Merck Millipore (Nemačka), miš, poliklonsko	1:1000
<i>anti-NMDARN2B</i>	Abcam (UK), miš, poliklonsko	1:1000
<i>anti-<math>\beta</math>-aktin</i>	Santa Cruz Biotechnology (USA), koza, poliklonsko	1:500

**Tabela 5. Sekundarna antitela korišćena u imunoblot analizi**

ANTITELO	PROIZVOĐAČ	RAZBLAŽENJE
<i>anti-zamorac IgG HRP konjugovana</i>	Merck Millipore (Nemačka)	1:10000
<i>anti-kozija IgG HRP konjugovana</i>	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:10000
<i>anti-zečija IgG HRP konjugovana</i>	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:10000
<i>anti-mišija IgG HRP konjugovana</i>	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:10000

Proteini od interesa detektovani su metodom hemiluminiscence. Na membrane je apliciran luminol (engl. *Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate*) koji reaguje sa enzimom HRP na sekundarnim antitelima i dolazi do emisije fotona koja je detektovana na fotografskom filmu (AGFA HealthCare NV, Septestraat, Mortsel, Belgija). Aktin je služio kao interna kontrola količine proteina u odnosu na koju su normalizovane dobijene trake ispitivanih proteina. Membrane su skenirane, a optičke gustine pojedinačnih signala određene su u softverskom paketu *ImageJ*. Dobijene vrednosti su prikazane kao relativne jedinice, koje predstavljaju srednju vrednost optičkih gustina traka od interesa normalizovanih u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za  $\beta$ -aktin.

## 10. Ko-imunoprecipitacija

Imunoprecipitacija (IP) je postupak detekcije i prečišćavanja proteina korišćenjem nerastvorne smole (agaroza ili sefaroza) za koju je vezan protein A ili G, a za koji se vezuju i precipitiraju imunokompleksi nastali inkubacijom uzorka sa specifičnim antitelom. Ko-imunoprecipitacija omogućava detekciju protein-protein interakcija indirektnom detekcijom proteina koji su u kompleksu sa specifičnim ciljnim proteinom. Naime, imunoprecipitacijom sa specifičnim antitelom vezuje se ciljni protein koji sa sobom ponese i sve proteine sa kojima je u kompleksu. Ovi imunokompleksi, se zatim, elektroforetski

razdvoje i elektrotransferom prenesu na membranu, gde se drugi proteini iz kompleksa detektuju imunoblot metodom.

Izolovani sinaptozomi su prvo resuspendovani u puferu za imunoprecipitaciju (IPB), koji je sadržao u mM: 20 Tris-HCl, pH 7,0, 50 NaCl, 1 EDTA, 1 EGTA, 50 NaF, 1 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,1 PMSF i 10 µg/ml leupeptina, 4 µg/ml pepstatina and 0,1 U/ml aprotinina sa 1 % Triton X-100. Uzorci su sonifikovani na ledu 30 s, a nerastvoreni materijal je uklonjen centrifugiranjem na 4 °C, određena je koncentracija proteina, deo je ostavljen na - 20°C kao *input* (pozitivna kontrola), a ostatak je korišćen za IP, u koncentraciji od 1 mg/ml. Protein A sefaroza je inkubirana sa uzorcima 1 h na temperaturi od 4°C, na rotirajućoj mešalici, kako bi se preadsorbovali proteini koji imaju tendenciju da se nespecifično vežu za protein A sefarozu. Zatim su sinaptozomi inkubirani 3 h, na 4°C sa 2 µg anti-ER $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), anti-ER $\beta$  antitelom (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) ili zečijim IgG (negativna kontrola). Imuni kompleksi su istaloženi inkubiranjem uzoraka sa protein A-sefarozaom 2 h, na 4°C i centrifugiranjem. Talog je ispiran 3 puta u IPB i *input* (pozitivna kontrola; uzorak resuspendovan u IPB), supernatant koji zaostaje nakon taloženja kompleksa, kao i imunoprecipitati su elektroforetski razdvajani, a zatim preneti na PVDF membranu gde su imunokompleksi detektovani pomoću antitela na eN (rNu-9LI5), u razblaženju 1:2000 u 2,5 % nemasnom mleku rastvorenom u PBS-T, kao što je opisano u odeljku 9.2.

## **11. Izolacija RNK i RT-PCR**

### **11.1. Izolacija RNK**

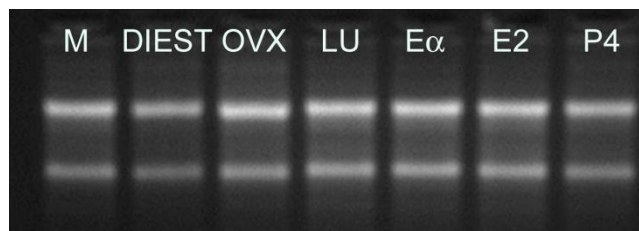
Ukupna RNK iz hipokampusa izolovana je po modifikovanoj metodi Chomczynski i Sacchi (1987). Tkivo Hip iz pojedinačnih životinja homogenizovano je u staklenom homogenizeru sa teflonskim tučkom, u 10 zapremina TRIzol reagensa (Invitrogen, SAD). TRIzol reagens je monofazni reagens fenola i guanidin-izotiocijanata koji razgrađuje ćelije i većinu njihovih komponenti, pritom čuva integritet RNK. Homogenat je centrifugiran 10

min na  $12000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf 5417). Dobijeni supernatant je dalje odvojen, inkubiran 5 min na  $30^{\circ}\text{C}$  i mešan sa 0,2 ml hloroforma/ml supernatanta. Nakon centrifugiranja na  $12000 \times g$ , 10 min, izdvajaju se tri faze: donja, organska (hloroform), interfaza (fenol) i gornja vodena faza. RNK se nalazi u vodenoj fazi, dok proteini i DNK ostaju u donjoj fazi, odnosno, interfazi. Zapremina vodene faze obično iznosi oko 60% početne zapremine TRIzola korišćenog za homogenizaciju.

Vodena faza je prebačena u nove ependorvice u koje je dodata 1 zapremina izopropanola i ostavljena preko noći na  $-20^{\circ}\text{C}$ , kako bi se RNK staložila. Posle inkubacije tokom noći, uzorci su centrifugirani ( $10 \text{ min}/12\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ), talog RNK resuspendovan u 1 ml hladnog 75% etanola, i ponovo centrifugiran ( $5 \text{ min}/12\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Dobijeni talog je osušen na vazduhu 10-15 min i rastvoren u 100  $\mu\text{l}$  sterilne vode sa 0,1 % DEPC-om.

## 11.2. Određivanje koncentracije RNK

Koncentracija RNK određena je spektrofotometrijski na aparatu Nano Drop (Thermo scientific), merenjem apsorpcije uzorka na 260 nm. Prečišćenost izolata, odnosno eventualna kontaminacija proteinima određena je na osnovu odnosa apsorpcija na 260 i 280 nm ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ). Vrednost  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 2$  ukazuje na odsustvo proteina u analiziranom uzorku. Procena integriteta RNK određena je elektroforezom ukupne RNK na 2 % agaroznom gelu u trajanju od 30 min i pri konstantnom naponu od 100 V. Prikazani rezultati (Slika 13) predstavljaju ukupne iRNK izolovane iz hipokampusa intaktnih mužjaka (M), ženki u diestrusnoj fazi ciklusa (DIEST), ovarijsktomisanih ženki (OVX) i OVX ženki nakon sedmodnevnih tretmana, a koje su korišćene u PCR analizi.



**Slika 13. Reprezentativna elektroforeza ukupne RNK izolovane iz hipokampusa ispitivanih grupa životinja.** (objašnjenje u tekstu)

### 11.3. Semi-kvantitativni RT-PCR

Za sintezu komplementarne DNK (cDNK) iz RNK korišćen je *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, USA). Po 2 µg ukupne RNK inkubirano je sa 50 U enzima *MultiScribe™* reverzne transkriptaze u prisustvu 10 mM dNTP, 2 µl 10× nasumičnim prajmera, 20 U *RiboLock* ribonukleaznog inhibitora i 2× pufera u ukupnoj zapremini od 20 µl. Sintetisane cDNK čuvane su na -20°C do upotrebe.

Za određivanje nivoa genske ekspresije eN korišćena je reakcija lančanog umnožavanja (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), pri čemu je cDNK amplifikovana upotrebom „prajmera“ karakterističnih za eN i endogene kontrole (engl. *housekeeping gene*), gena za glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) (Tabela 6). Za PCR reakciju, odgovarajuća razblaženja uzoraka cDNK koji predstavljaju 2,5 µg totalne RNK pomešana su sa puferom za PCR, koji sadrži: 10 mM dNTP, 2,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µM prajmera za eN (*CD73*) ili NTPD-azu 3 (*NTPD3*), 0,125 µM prajmera za GAPDH (Tabela 6) i 1U Taq polimeraze (Kapa Biosystems), u ukupnoj zapremini od 25 µl. PCR proizvodi analizirani su na 2% agaroznom gelu sa dodatim etidijum-bromid, zajedno sa *O'GeneRuler* (Fermentas); elektroforeza je trajala 30 min pri konstantnom naponu od 100 V. Gelovi su snimljeni pod UV svetlom, na aparatu GelDoc 1 000 (BioRad), a signali su kvantifikovani u programu za analizu slika, *ImageJ*. Relativna količina PCR proizvoda za eN normalizovana je u odnosu na signal GAPDH dobijen u istoj PCR reakciji.



**Tabela 6. Sekvence "prajmera" korišćenih u RT-PCR analizi**

Gen pacova	Sekvenca „prajmera“ (5'- -3')	Veličina produkta
<i>NTPD3</i>	F: 5'-CGGGATCCTTGCTGTGCGTGGCATTCTT-3' R: 5'-TCTAGAGGTGCTCTGGCAGGAATCAGT-3'	267 bp
<i>CD73</i>	F: 5'-CCCGGGGGCCACTAGCACCTCA-3' R: 5'-GCC TGG ACC ACG GGA ACC TT-3'	403 bp
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AAGGTGAAGGTCTGGAGTCAACG-3' R: 5'-GGCAGAGATGATGACCCTTTTGGC-3'	332 bp

Sekvence prajmera su preuzete od Vollmayer i saradnika (2001).

## 12. Statistička analiza podataka

Svi enzimski eseji izvedeni su u triplikatu u  $n \geq 4$  ponavljanja. Aktivnosti enzima izražene su u nmol Pi/mg protein/min  $\pm$  SEM. Promene kinetičkih svojstava eN procenjene su na osnovu kinetičkih parametara  $V_{max}$  (maksimalna brzina) i  $K_m$  (Michaelis-ova konstanta), koji su dobijeni transformacijom podataka kinetičkih analiza u prisustvu rastućih koncentracija supstrata, Eadie-Hofstee transformacijom ( $V$  vs.  $V/[S]$ ) u programskom paketu *Origin 8.6*. Rezultati Western blot i RT-PCR analize normalizovani su u odnosu na odgovarajuće interne kontrole i prikazani su u relativnim jedinicama kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. Značajnost razlika između grupa procenjena je Student-ovim t-testom i jednofaktorskom analizom varijanse (engl. *One-way analysis of variance*, ANOVA), uz *post hoc* Tukey test za multiplu komparaciju ili *One-way repeated measures* ANOVA uz Dunett's *post hoc* test za poređenje eksperimentalnih grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Razlike su smatrane statistički značajnima za vrednosti  $p < 0,05$ . Za statističku obradu podataka korišćen je programski paket *Origin 8.6*.

## IV REZULTATI

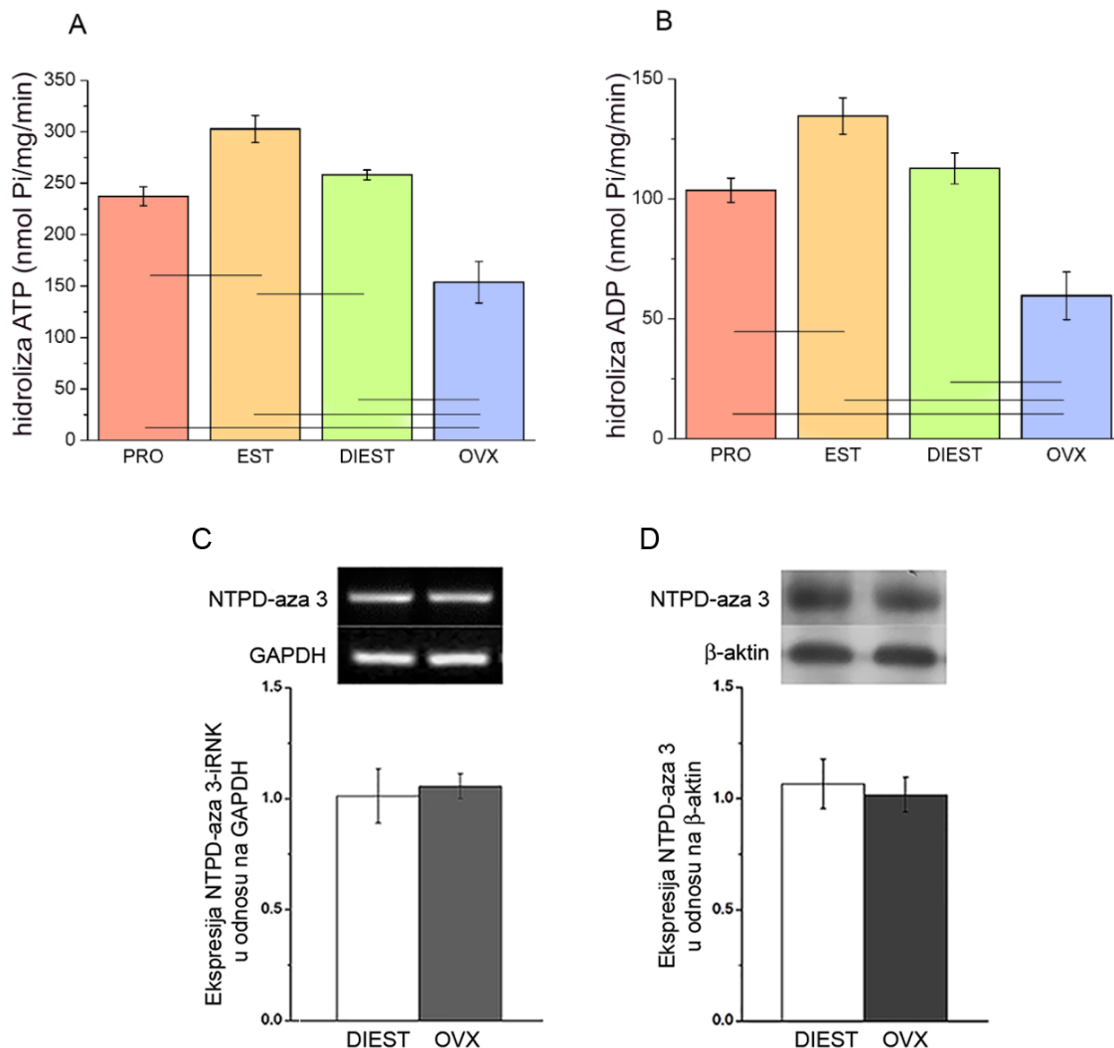
Polazeći od definisanih ciljeva, u ovoj doktorskoj disertaciji praćena je promena aktivnosti i ekspresije odabranih ektonukleotidaza, enzima odgovornih za vanćelijsku hidrolizu adeninskih nukleotida, u hipokampusu ženki i mužjaka pacova nakon razlićitih hormonskih manipulacija (estrusni ciklus, ovarijektomija, arhiektomija, sistemska jednokratna i ponovljena administracija  $17\beta$ -estradiola,  $17\alpha$ -estradiola i progesterona). Ispitana je promena proteinske ekspresije NTPD-aze 1, NTPD-aze 2 i NTPD-aze 3, koje hidrolizuju nukleotide ATP i ADP, kao i promena aktivnosti i zastupljenosti ekto-5-nukleotidaze (CD73, eN), jedinog enzima odgovornog za razgradnju AMP i nastanak adenzina u CNS, kao i uloga klasićnih estradiolskih receptora ( $ER\alpha$  i  $ER\beta$ ) u modulaciji funkcije ovog enzima.

# **1. Uloga ženskih polnih hormona u modulaciji vanćelijskog metabolizma adeninskih nukleotida u sinaptozomima hipokampusa**

## **1.1. Fluktuacije ovarijalnih hormona tokom estrusnog ciklusa utiču na aktivnost NTPDaza u hipokampalnim sinaptozomima ženki pacova**

Promene aktivnosti NTPD-aza praćene su u hipokampalnim sinaptozomima ženki pacova u pojedinačnim fazama estrusnog ciklusa. S obzirom na to da NTPD-aze hidrolizuju nukleotid tri- i -difosfate, specifična aktivnost ovih enzima praćena je u prisustvu ATP i ADP kao supstrata. Na slici 14. prikazana je hidroliza ATP i ADP u sinaptozomima hipokampusa ženki pacova tokom estrusnog ciklusa. Rezultati ANOVA testa pokazali su da hidroliza ATP fluktuirala tokom estrusnog ciklusa ( $[F(2,51) = 11,99; p < 0,01]$ ). Hidroliza ATP značajno je veća u estrusu ( $302,80 \pm 13,10$  nmol Pi/mg/min) nego u proestrusu ( $237,43 \pm 9,22$  nmol Pi/mg/min) i diestrusu ( $258,22 \pm 4,69$  nmol Pi/mg/min). Rezultati ANOVA testa su pokazali da i hidroliza ADP fluktuirala tokom estrusnog ciklusa ( $[F(2,51) = 6,05; p < 0,01]$ ). Hidroliza ADP prati profil hidrolize ATP i najveća je u estrusu ( $134,48 \pm 7,56$  nmol Pi/mg/min) i značajno manja u proestrusu ( $103,59 \pm 5,03$  nmol Pi/mg/min,  $p < 0,01$ ).

Doprinos endogenih ovarijalnih hormona ispitan je upoređivanjem hidrolize ATP i ADP u sinaptozomima hipokampusa OVX ženki pacova sa aktivnostima u istom uzorku izolovanom iz ženki u ispitivanim fazama estrusnog ciklusa. Rezultati ANOVA testa pokazali su statistički značajne razlike između grupa ( $F(3,56) = 20,73; p < 0,001$ ] za ATP i  $[F(3,56) = 12,13; p < 0,001]$  za ADP), pri čemu je kod OVX ženki zabeležen statistički značajan pad hidrolize ATP ( $153,76 \pm 20,19$  nmol Pi/mg/min) i ADP ( $59,62 \pm 9,93$  nmol Pi/mg/min) u odnosu na sve tri ispitivane faze estrusnog ciklusa intaktnih životinja (Slika 14).



**Slika 14. Hidroliza ATP (A) i ADP (B) u sinaptozomima hipokampusa ženki pacova po fazama estrusnog ciklusa i nakon ovarijektomije i ekspresija NTPD-aze 3-iRNK (C) i proteina (D).** Specifična aktivnost enzima predstavljena je kao srednja vrednost aktivnosti (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM iz n = 2 nezavisna eksperimenata izvedenih u triplicatu. Rezultati u stubićima (C i D) predstavljeni su kao relativne srednje vrednosti  $\pm$  SEM (normalizovane u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za GAPDH za iRNK i  $\beta$ -aktin za proteinsku ekspresiju) iz n = 3 nezavisna eksperimenata. Nivo statističke značajnosti: -- p < 0,05 i manje između eksperimentalnih grupa. PRO-proestrus, EST-estrus, DIEST-diestrus, OVX-ovarijektomija.

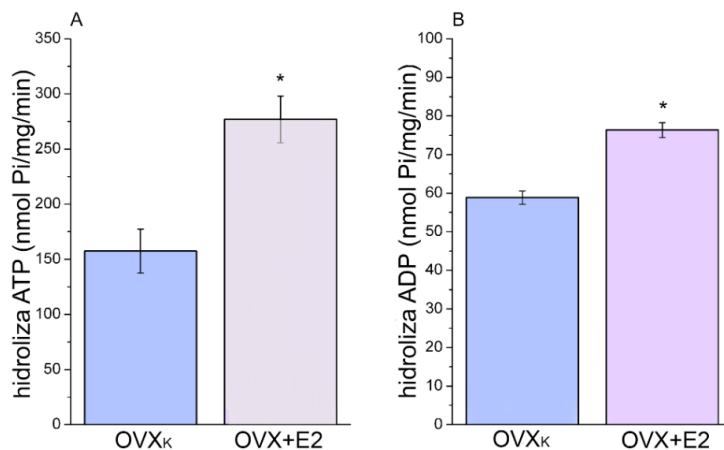
Promene hidrolize ATP i ADP tokom estrusnog ciklusa kao i smanjenje hidrolize ovih adeninskih nukleotida nakon OVX ukazuju na modulaciju aktivnosti NTPD-aza polnim hormonima. Neizmenjen odnos hidrolize ATP i ADP od oko 1:0,4 u svim ispitivanim fazama estrusnog ciklusa kao i nakon OVX ukazuje na dominantnu aktivnost NTPD-aze 3 u sinaptosomima hipokampusa. Zbog toga je ispitano da li se ekspresija NTPD-aze 3 menja nakon OVX u odnosu na ženke u DIEST. Nisu uočene promene u relativnoj količini totalne NTPD-aza3-iRNK iz hipokampusa OVX ženki (Slika 14 C) niti promene u relativnoj količini proteina NTPD-aze 3 u sinaptosomima hipokampusa OVX u odnosu na DIEST (Slika 14 D).

## **1.2. Uticaj 17 $\beta$ -estradiola na aktivnost i ekspresiju NTPDaza 1-3 *in vivo***

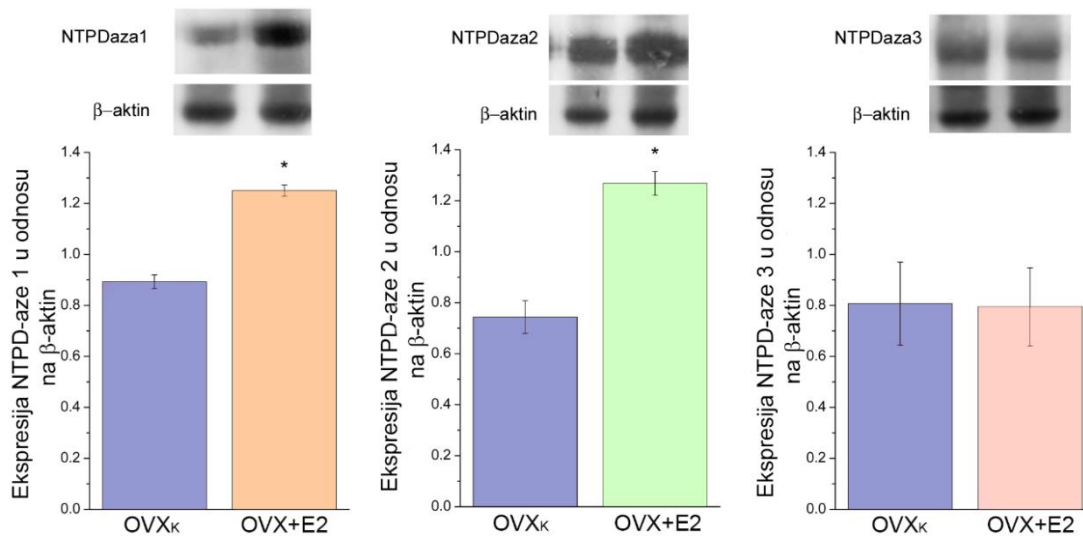
Uticaj E2 na vanćelijsku hidrolizu adeninskih nukleotida ispitan je praćenjem hidrolize ATP i ADP u sinaptosomalnoj frakciji izolovanoj iz hipokampusa OVX ženki 24h nakon akutnog tretmana E2 (OVX+E2). Kao što je prikazano na slici 15. došlo je do značajnog porasta hidrolize ATP ( $276,40 \pm 20,05$  nmol Pi/mg/min;  $p < 0,001$ ) i ADP ( $76,33 \pm 1,92$  nmol Pi/mg/min;  $p < 0,01$ ) u odnosu na odgovarajuće kontrole tretirane samo rastvaračem OVX<sub>K</sub> ( $157,40 \pm 20,05$  nmol Pi/mg/min, odnosno  $58,85 \pm 1,71$  nmol Pi/mg/min, redom).

S obzirom na to da su NTPD-aze 1-3 enzimi odgovorni za vanćelijsku hidrolizu ATP i ADP, takođe su praćene promene u njihovoj relativnoj zastupljenosti u sinaptosomima hipokampusa OVX pacova 24 h nakon tretmana E2. Na slici 16. prikazan je reprezentativni imunoblot i kvantitativna analiza ekspresije NTPD-aza 1-3. Nakon tretmana E2, uočeno je statistički značajno povećanje zastupljenosti NTPD-aze 1 ( $140,40 \pm 3,49$ ;  $p < 0,001$ ) i NTPD-aze 2 ( $170,20 \pm 16,91$ ;  $p < 0,001$ ), dok je zastupljenost NTPD-aze 3 ostala nepromenjena.

Promena nivoa hidrolize ATP i ADP nakon tretmana E2, verovatno su rezultat promene proteinske ekspresije NTPD-aza 1 i 2, dok izostanak promena na nivou NTPD-aze 3 sugeriše na njegovu dominantnu ulogu u regulaciji vanćelijske koncentracije ATP u sinaptičkoj pukotini.



**Slika 15. Hidroliza ATP (A) i ADP (B) u sinaptozomima hipokampusa OVX ženki nakon tretmana E2.** Specifična aktivnost enzima predstavljena je kao srednja vrednost (nmol Pi/mg/min) ± SEM iz n = 2 nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu. Nivo statističke značajnosti \*p < 0,01 i manje u odnosu na grupu tretiranu rastvaracem (OVX<sub>K</sub>).



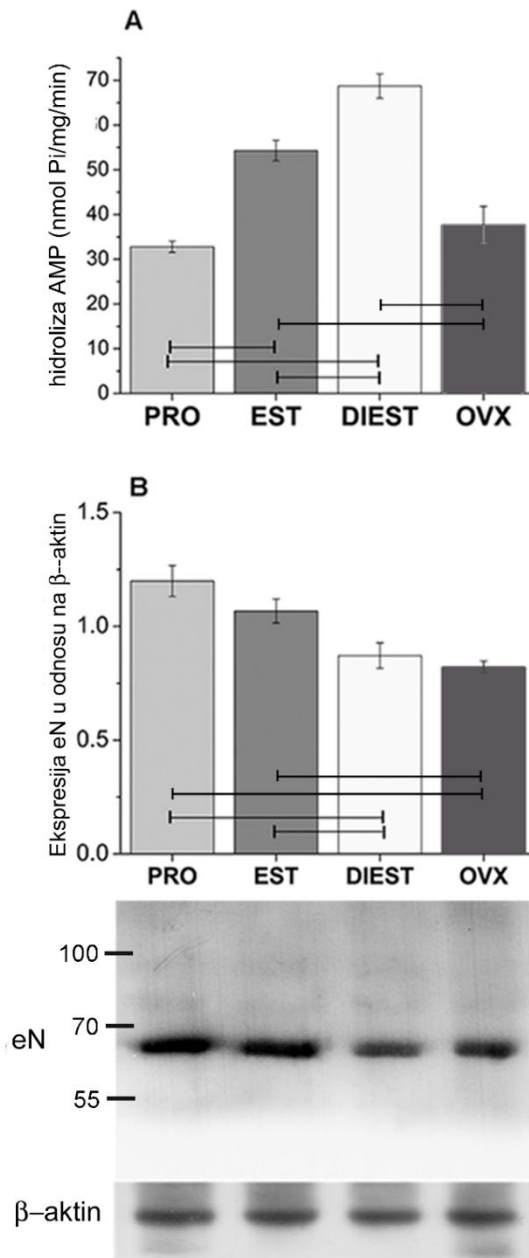
**Slika 16. Kvantitativna analiza ekspresije proteina NTPD-aze 1-3 u hipokampalnim sinaptozomima OVX pacova nakon akutnog tretmana E2.** Reprezentativna imunoblot analiza NTPD-aze 1, NTPD-aze 2, NTPD-aze 3 (gornji deo panela). Grafici prikazuju relativnu zastupljenost proteina (normalizovanu u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za β-aktin) ± SEM, iz n = 3 nezavisna ponavljanja. Nivo statističke značajnosti \*p < 0,001, u odnosu na kontrolnu grupu (OVX<sub>K</sub>).

### **1.3. Variranje nivoa ovarijalnih hormona tokom estrusnog ciklusa moduliše aktivnost i ekspresiju ekto-5'-nukleotidaze u hipokampalnim sinaptozomima ženki pacova**

Ekto-5'-nukleotidaza je jedini enzim koji katalizuje defosforilaciju AMP do adenzina u CNS. Promene u aktivnosti eN praćene su u hipokampalnim sinaptozomima ženki pacova u pojedinačnim fazama estrusnog ciklusa, u prisustvu AMP kao supstrata. Aktivnost enzima fluktuirala tokom estrusnog ciklusa ( $[F(2,69) = 69,13; p < 0,001]$ ); najniža hidroliza AMP zabeležena je u proestrusu ( $32,7 \pm 1,25$  nmol Pi/mg/min), a gotovo dva puta veća u diestrusu ( $68,72 \pm 2,72$  nmol Pi/mg/min) (Slika 17). Sa druge strane, detektovan je suprotan obrazac proteinske ekspresije, relativna zastupljenost proteina eN najveća je u proestrusu, dok je najniža u diestrusu ( $[F(2,27) = 7,79; p < 0,01]$ ).

Doprinos endogenih ovarijalnih hormona ispitan je na osnovu stepena hidrolize AMP u sinaptozomima hipokampusu nakon bilateralne ovarijektomije ženki pacova. Rezultati ANOVA testa pokazali su statistički značajne razlike između grupa (aktivnost ( $[F(3,80) = 53,50; p < 0,001]$ , Slika 17A; proteinska ekspresija  $[F(3,35)=12,515; p < 0,001]$ , Slika 17B). Nakon OVX, izmerena aktivnost eN ( $37,66 \pm 4,15$  nmol Pi/mg/min) slična je aktivnosti u proestrusu i značajno je niža od one izmerene u diestrusu, dok proteinska ekspresija eN ostaje nepromenjena u odnosu na diestrus.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da postoje razlike u regulaciji aktivnosti i proteinske ekspresije eN polnim hormonima tokom estrusnog ciklusa u hipokampalnim sinaptozomima ženki pacova.



**Slika 17. Hidroliza AMP (A) i imunoblot analiza ekspresije eN (B) tokom estrusnog ciklusa i nakon OVX.** Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SEM iz  $n = 3$  nezavisna eksperimenta. Reprezentativna imunoblot analiza eN (donji deo panela); vrednosti optičke gustine normalizovane su u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za  $\beta$ -aktin. Nivo statističke značajnosti  $\square \square \square \square \square$   $\dashv$   $p < 0,05$  i manje; PRO-proestrus, EST-estrus, DIEST-diestrus, OVX-ovarijektomija.



#### 1.4. Kinetička analiza aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze u hipokampalnim sinaptozomima OVX ženki

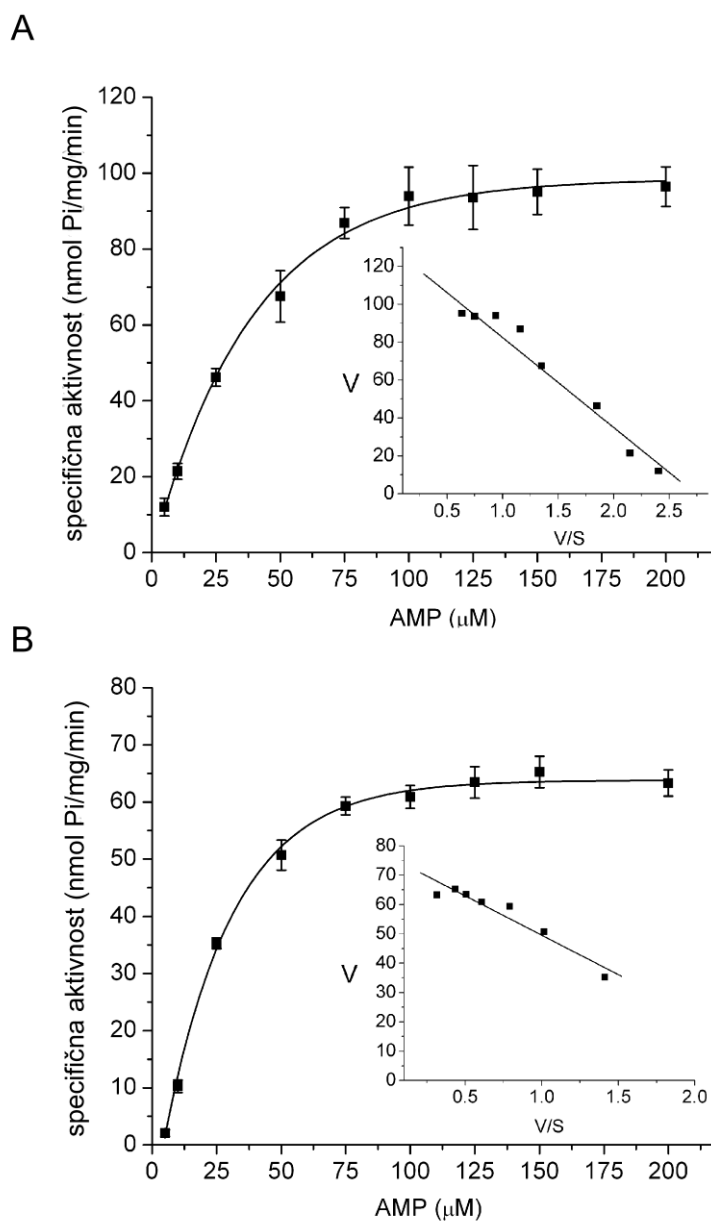
S obzirom na to da je u prethodnim analizama uočen suprotan obrazac promena aktivnosti i proteinske ekspresije eN u sinaptozomima izolovanim iz OVX ženki i ženki u diestrusu, u narednim eksperimentima analizirani su kinetički parametri enzimske aktivnosti eN. Praćene su promene brzina enzimske reakcije (specifične aktivnosti) u funkciji rastućih koncentracija supstrata (5-200  $\mu$ M AMP). Michaelis-Menten-ovi grafikoni inicijalnih brzina reakcija u odnosu na rastuće koncentracije AMP prikazani su na slici 18. Kinetički parametri  $K_m$  i  $V_{max}$  izračunati su na osnovu Eadie-Hofstee transformacija (ubačeni grafikoni) podataka iz Michaelis-Menten-ovih grafikona (Tabela 7).

Poređenjem kinetičkih parametara za DIEST i OVX životinje može se zaključiti da je ovarijektomija dovela do povećanja afiniteta eN za supstrat, ali i do smanjenja maksimalne brzine reakcije ( $V_{max}$ ), što za rezultat ima nepromenjenu enzimsku efikasnost eN nakon OVX u odnosu na ženke u DIEST, što ukazuje na nepromenjenu produkciju adenzina.

**Tabela 7. Vrednost kinetičkih parametara  $K_m$  i  $V_{max}$  za hidrolizu AMP u hipokampalnim sinaptozomima OVX ženki**

	$K_m$ ( $\mu$ mol/l)	$V_{max}$ (nmol Pi/mg/min)	$V_{max}/K_m$
<b>DIEST</b>	47,44 $\pm$ 4,01	129,85 $\pm$ 5,83	2,73
<b>OVX</b>	26,88 $\pm$ 2,79 *	76,41 $\pm$ 2,79 *	2,88

Nivo statističke značajnosti \*p < 0,001 u odnosu na ženke u diestrusnoj fazi ciklusa (DIEST)



**Slika 18. Michaelis-Menten-ovi grafikoni zavisnosti inicijalnih brzina od koncentracije AMP kod ženki u diestrusnoj fazi ciklusa (A) i OVX pacova (B).** Aktivnost enzima praćena je u prisustvu rastućih koncentracija AMP (5-200  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM iz  $n = 3$  nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu. Ubaćeni linearni Eadie-Hofstee grafikoni  $V$  vs.  $V/[S]$ .

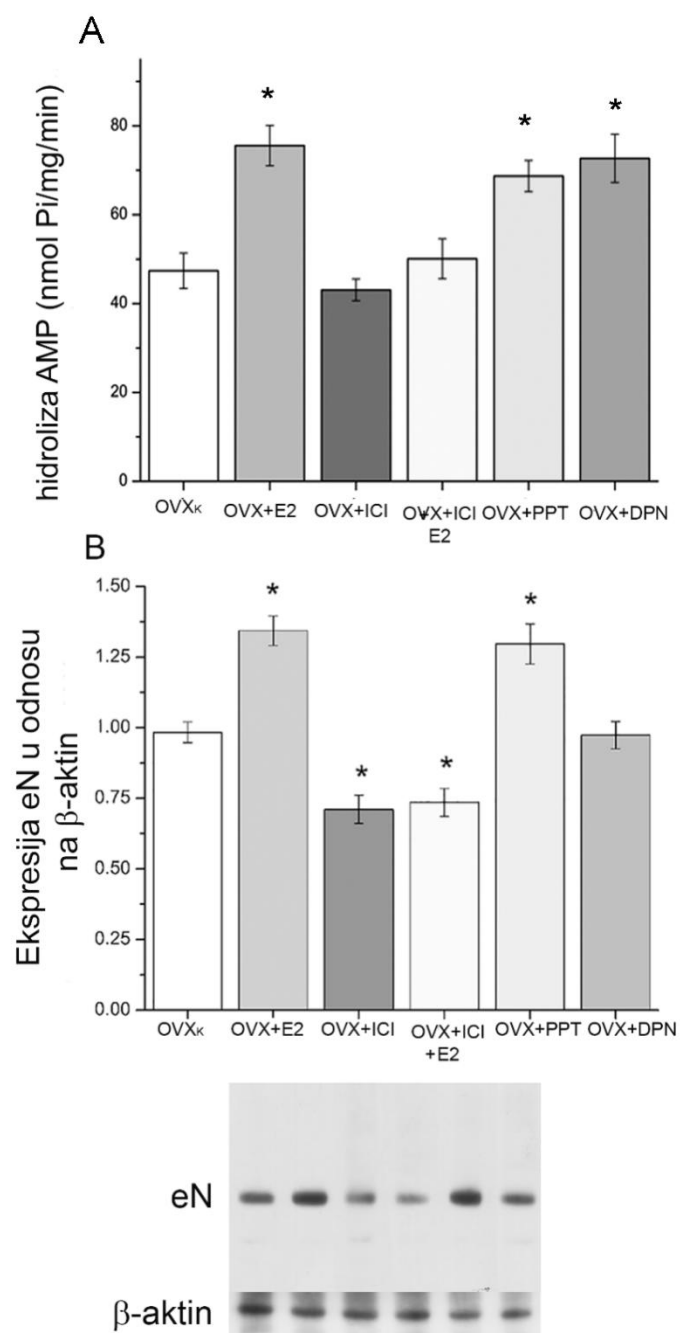
## 1.5. Modulacija aktivnost i ekspresije eN 17 $\beta$ -estradiolom - uloga ER $\alpha$ i ER $\beta$

U skladu sa primarnim ciljem ove doktorske teze, OVX ženke su akutno tretirane 17 $\beta$ -estradiolom, nakon čega je zabeležen porast hidrolize AMP ( $75,54 \pm 4,53$  nmol Pi/mg/min,  $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolu ( $47,38 \pm 3,99$  nmol Pi/mg/min), kao i povećanje relativne količine proteina eN ( $136,6 \pm 5,2$  %;  $p < 0,001$ ) u odnosu na netretirane OVX ženke.

Uloga klasičnih estradiolskih receptora (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) u uočenoj modulaciji aktivnosti i ekspresije eN analizirana je nakon tretmana OVX ženki neselektivnim antagonistom estradiolskih receptora (ICI 182.780), 2 h pre tretmana estradiolom (ICI+E2). Efekti pretratmana ICI antagonistom utvrđeni su poređenjem aktivnosti eN kod OVX životinja koje su tretirane samo ICI. S obzirom na to da tretman OVX životinja ICI antagonistom ili ICI antagonistom i E2 nije izazvao promenu aktivnosti eN u odnosu na OVX životnje (Slika 19A), zaključeno je da su receptori ER $\alpha$  i ER $\beta$  uključeni u modulaciju aktivnosti sinaptičke eN.

Stoga su u daljim eksperimentima OVX životinje tretirane selektivnim agonistima estradioloskih receptora, kako bi se ispitala pojedinačna uloga ER u modulaciji eN. Nakon tretmana selektivnim agonistom ER $\alpha$  (PPT,  $68,70 \pm 3,51$  nmol Pi/mg/min) i ER $\beta$  (DPN,  $72,69 \pm 5,41$  nmol Pi/mg/min) aktivnost eN je porasla u sličnoj meri kao nakon tretmana E2 (Slika 19A), Ovaj nalaz ukazao je na to da je efekat E2 u povećanju aktivnosti eN posredovan aktivacijom oba tipa ER receptora.

Nakon navedenih tretmana praćen je i profil proteinske ekspresije eN (Slika 19B). Akutni tretmani ICI i ICI+E2 smanjili su ekspresiju eN (za oko 25%,  $p < 0,01$  i 28%,  $p < 0,05$ , redom). Tretman E2 ( $136,6 \pm 5,2$  %;  $p < 0,001$ ) i PPT ( $132,6 \pm 7,8$  %;  $p < 0,001$ ) izazvali su statistički značajno povećanje relativne zastupljenosti eN. Budući da je kod životinja tretiranih ICI i ICI+E2 sprečena aktivacija ER $\alpha$  i ER $\beta$ , došlo je do statistički značajnog smanjenja proteinske ekspresije eN, što može ukazivati na neophodnost aktivnosti jednog ili oba ER za bazalnu ekspresiju eN.



**Slika 19. In vivo efekat E2 i uloga ER u modulaciji (A) aktivnosti i (B) proteinske ekspresije eN u sinaptosomima hipokampusu OVX ženki.** Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SEM iz  $n = 3$  nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu. Reprezentativna imunoblot analiza eN (donji deo panela); vrednosti optičke gustine normalizovane u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za  $\beta$ -aktin. Nivo statističke značajnosti \* $p < 0,05$  i manje u odnosu na grupu tretiranu OVX<sub>K</sub>.

Rezultati dobijeni primenom agonista i antagonista ukazuju na regulaciju/modulaciju eN koordinisanom aktivnošću ER, ali i na potencijalni mehanizam delovanja E2. Estradiol, aktivacijom ER $\alpha$ , povećava proteinsku ekspresiju eN u sinaptičkim membranama što dovodi i do povećanja hidrolize AMP.

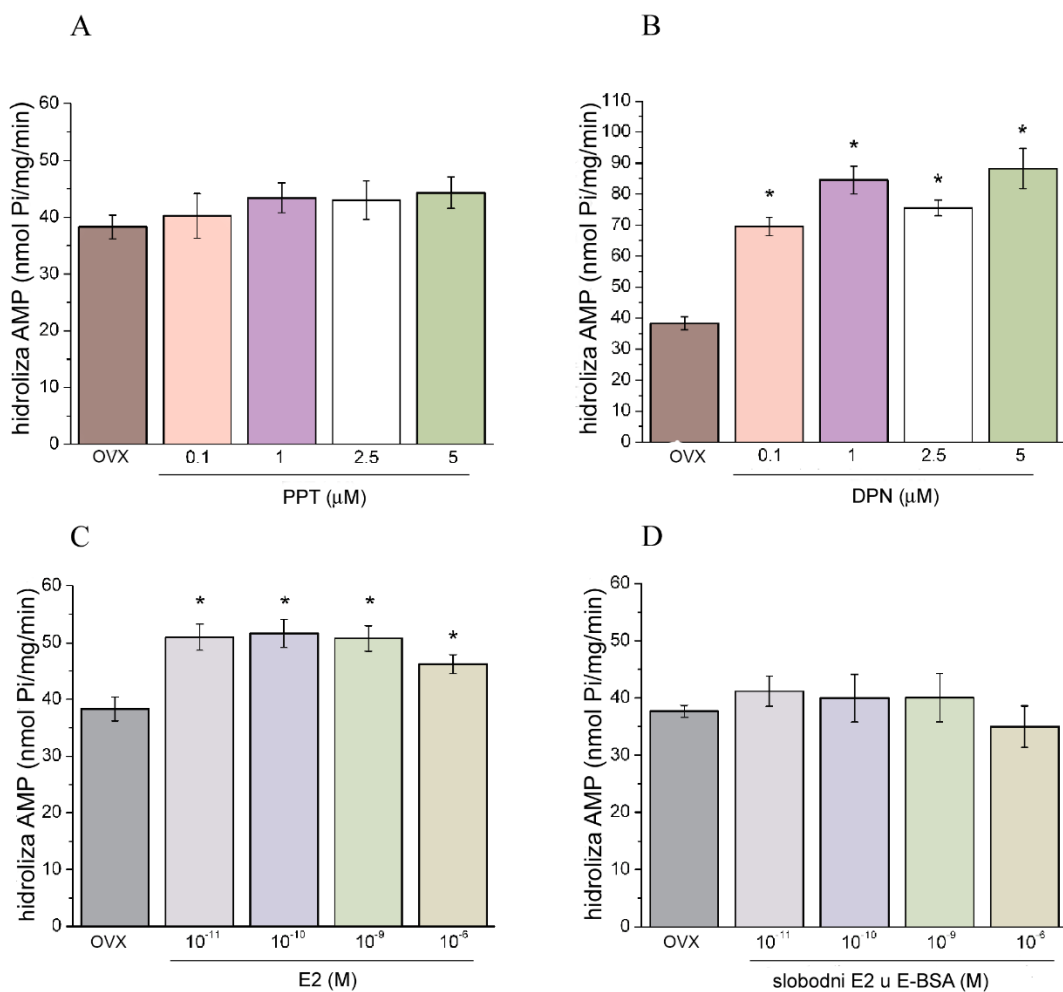
## 1.6. Uloga ER $\alpha$ i ER $\beta$ u modulaciji aktivnosti eN *in vitro*

Različiti efekti agoniste ER $\beta$  (DPN) na aktivnost i ekspresiju sinaptičke eN u *in vivo* eksperimentima objašnjeni su u narednim eksperimentima u kojima je efekat agonista praćen *in vitro*. Sveže izolovani sinaptozomi inkubirani su u prisustvu PPT, DPN, E2 i E-BSA kao što je opisano u poglavlju Materijali i Metode (Slika 20 A-D).

Inkubacija sinaptozoma sa PPT nije promenila nivo hidrolize AMP. Na osnovu ovog rezultata može se zaključiti da je uočeno povećanje aktivnosti i ekspresije eN nakon tretmana E2 *in vivo* posredovano ER $\alpha$  receptorom i moguće, transkripcionom i translacionom aktivacijom eN. Sa druge strane, na sinaptozomima koji su inkubirani u prisustvu DPN, izmerena je dva puta veća hidroliza AMP u poređenju sa kontrolnom grupom ( $38,29 \pm 2,09$  nmol Pi/mg/min;  $p < 0,001$ ).

Prečišćeni sinaptozomi su dalje inkubirani sa rastućim koncentracijama E2 *in vitro*, pri čemu je izmerena značajno veća hidroliza AMP u prisustvu svih ispitivanih koncentracija E2 ( $p < 0,001$ ). Sinaptozomi su takođe inkubirani sa E-BSA, konjugatom 17 $\beta$ -estradiola koji ne može proći kroz ćelijsku membranu.

S obzirom na to da su sinaptozomi funkcionalno specijalizovani fragmenti ćelija, odvojeni od jedra i *de novo* sinteze proteina, ovi rezultati sugerišu da efekat E2 na biohemijske karakteristike eN aktivacijom ER $\beta$  nije genomski i verovatno je indukovano direktnim alosteričnim akcijama ER $\beta$ /E2 na eN. E-BSA nije imao nikakvog efekta na hidrolizu vanćelijskog AMP, što ukazuje da E2 mora proći kroz ćelijsku membranu da bi aktivirao potencijalne genomske i negenomske efekte na eN.



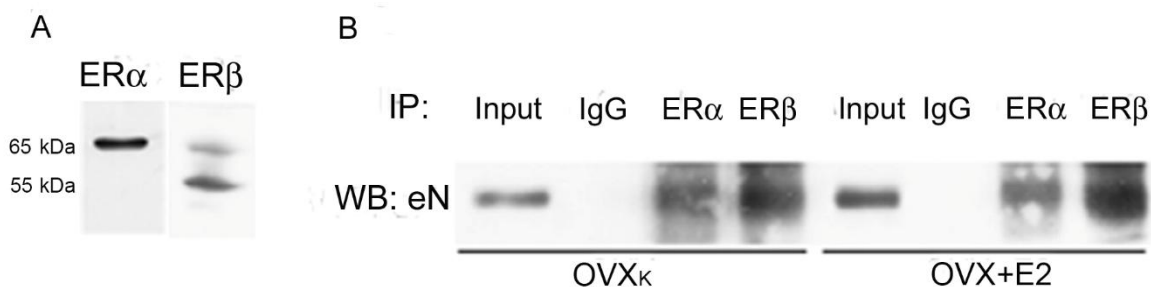
**Slika 20. In vitro efekat E2 i ER na aktivnost sinaptičke eN.** Nivo hidrolize AMP je određena nakon inkubacije prečišćenih hipokampalnih sinaptozoma OVX ženki sa (A) PPT, (B) DPN, (C) E2 i (D) E-BSA. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM iz n = 4 nezavisna eksperimenata izvedena u triplikatu. Nivo statističke značajnosti \*p < 0,01 i manje u odnosu na specifičnu aktivnost izmerenu u sinaptozomima OVX životinja.

## 1.7. Fizička interakcija eN i ER u sinaptosomima hipokampusa OVX

### ženki

U daljem toku eksperimenata testirana je hipoteza da su efekti E2 na eN uslovljeni direktnom interakcijom ovog hormona na enzimski molekul. Stoga je izveden eksperiment kojim je ispitano da li ER stupa u fizičku interakciju sa eN molekulom. Specifičnost antitela za ER $\alpha$  i ER $\beta$  ispitana je imunoblot analizom. Poliklonsko antitelo na ER $\alpha$ , detektuje jednu specifičnu traku na 65 kDa, dok je primarno antitelo na ER $\beta$  detektovalo traku na oko 50 kDa koja odgovara molekularnoj masi ER $\beta$ , ali i traku na oko 65kDa (Slika 21A). Kako je pokazano prisustvo ER $\alpha$  i ER $\beta$ -sličnog proteina u frakciji sinaptosoma izolovanoj iz hipokampusa OVX ženki, ova antitela su dalje korišćena za koimunoprecipitaciju. Ovom analizom utvrđeno je da su oba ER u fizičkoj interakciji sa molekulom eN u sinaptosomima OVX, kao i u sinaptosomima E2 ženki (Slika 21B).

Ovi rezultati ukazuju da su membranski ER u kompleksu sa eN kako u OVX tako i u sinaptosomima OVX ženki nakon tretmana E2.



**Slika 21. Fizička interakcija eN i ER u hipokampalnim sinaptosomima OVX ženki i nakon tretmana E2.** (A) Proteinska ekspresija ER $\alpha$  i ER $\beta$  u hipokampalnim sinaptosomima OVX ženki. (B) Reprezentativni imunoblot koimunoprecipitacije eN sa ER $\alpha$  i ER $\beta$ . Uzorci prečišćenih sinaptosoma su podvrgnuti imunoprecipitaciji sa anti-ER $\alpha$ , -ER $\beta$  ili IgG antitelom, nakon čega je urađena imunoblot analiza precipitata sa anti-eN antitelom. *Input*-prečišćeni sinaptosomi pre solubilizacije i imunoprecipitacije.

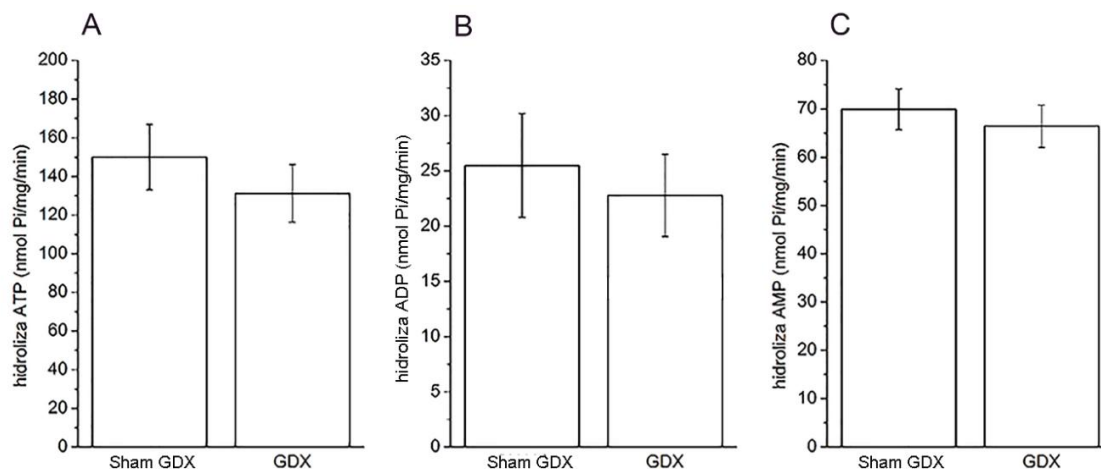
## **2. Uticaj $17\beta$ -estradiola na aktivnost i ekspresiju ektonukleotidaza u hipokampalnim sinaptozomima mužjaka pacova**

Brojna istraživanja bave se efekatima ženskih polnih hormona na organizaciju i funkciju sinapsi u hipokampusu ženki sisara, dok su rezultati koji se odnose na ispitivanje uticaja na organizaciju sinapsi mužjaka znatno ređi. Nedavno je pokazano da E2 indukuje spinogenezu i porast gustine trnolikih izraštaja u hipokampusu mužjaka. Brojne studije ukazuju da ženski polni hormoni mogu ostvariti pozitivne efekte u neurološkim stanjima mužjaka. Proširivanje i produbljivanje naučnih saznanja o mehanizmima delovanja ženskih polnih hormona u muškom mozgu značajno bi doprineo i eventualnoj sigurnijoj primeni steroidnih hormona u terapiji pojedinih oboljenja CNS.

### **2.1. Uticaj gonadektomije na hidrolizu adeninskih nukleotida**

Uticaj endogenih hormona testisa na aktivnost ektonukleotidaza praćen je u hipokampalnim sinaptozomima mužjaka, sedam dana nakon orhiektomije, GDX (Slika 22). S obzirom na to da nisu uočene statistički značajne promene hidrolize nukleotida nakon eksperimentalnog uklanjanja testisa, zaključeno je da cirkulišući gonadni hormoni ne utiču na aktivnost ektonukleotidaza. Stoga su u daljim eksperimentima efekti E2 praćeni na intaktnim mužjacima, primenom istih doza E2 koje se korišćene i na ženkama.



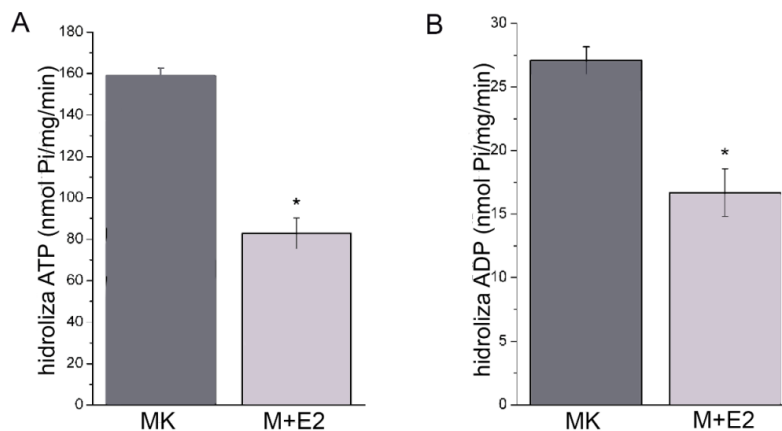


**Slika 22. Hidroliza ATP (A), ADP (B) i AMP (C) u sinaptozomima hipokampusa mužjaka nakon bilateralne gonadektomije.** Specifična aktivnost enzima predstavljena je kao srednja vrednost (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM iz n = 2 nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu. Sham GDX- lažno operisani mužjaci, GDX-orhiektomisani mužjaci.

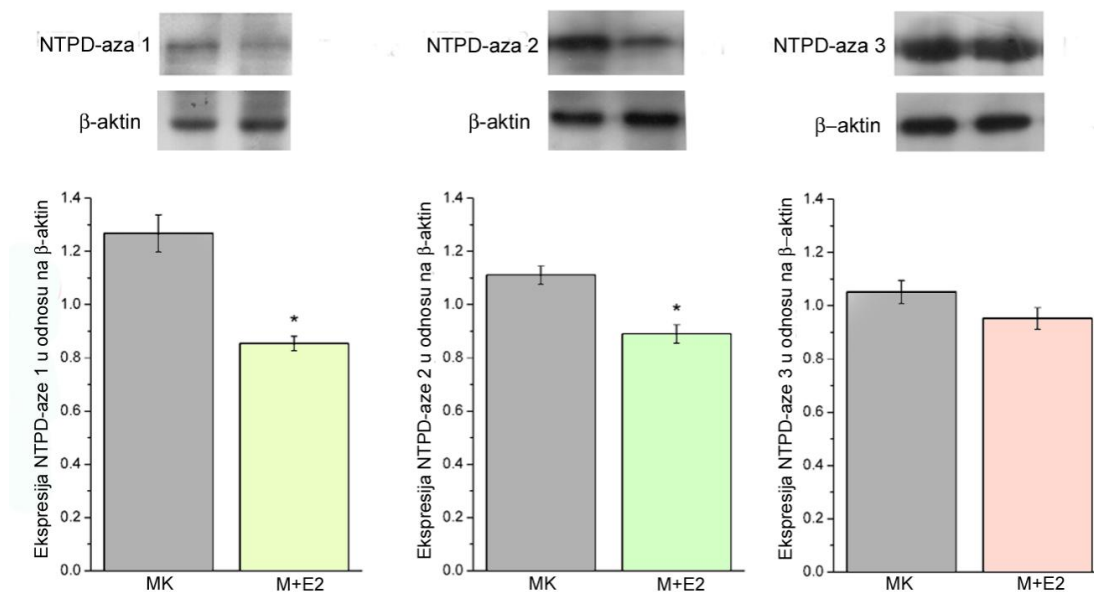
## 2.2. Uticaj E2 na aktivnost i ekspresiju NTPD-aza 1-3 u sinaptozomima hipokampusa mužjaka pacova

Uticaj  $17\beta$ -estradiola na aktivnost ektonukleotidaza praćen je merenjem hidrolize ATP i ADP u frakciji prečišćenih hipokampalnih sinaptozoma mužjaka, 24 h nakon jednokratne injekcije E2. Nivo hidrolize ATP i ADP značajno je smanjen kod tretiranih mužjaka ( $82,8 \pm 7,4$  nmol Pi/mg/min za ATP;  $p < 0,001$  i  $16,7 \pm 1,9$  nmol Pi/mg/min za ADP;  $p < 0,001$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom ( $159,0 \pm 3,7$  nmol Pi/mg/min za ATP i  $27,1 \pm 1,1$  nmol Pi/mg/min za ADP) (Slika 23).

Na istim uzorcima praćene su promene zastupljenosti NTPD-aze 1-3. Uočeno je statistički značajno smanjenje zastupljenosti NTPD-aze 1 ( $63,5 \pm 3,9$  %;  $p < 0,001$ ) i NTPD-aze 2 ( $80,2 \pm 1,1$  %;  $p < 0,05$ ), dok je nivo proteina za NTPD-azu 3 ostao nepromenjen (Slika 24). Može predpostaviti da je smanjena hidroliza ATP i ADP nakon tretmana E2, uzrokovana smanjenjem ekspresije NTPD-aze 1 i NTPD-aze 2 u hipokampusnim sinaptozomima mužjaka pacova.



**Slika 23. Hidroliza ATP (A) i ADP (B) u sinaptozomima hipokampusa mužjaka pacova nakon tretmana E2.** Specifična aktivnost enzima predstavljena je kao srednja vrednost (nmol Pi/mg/min) ± SEM iz n = 3 nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu. Statistička značajnost \*p < 0,001 u odnosu na kontrolnu grupu (MK).

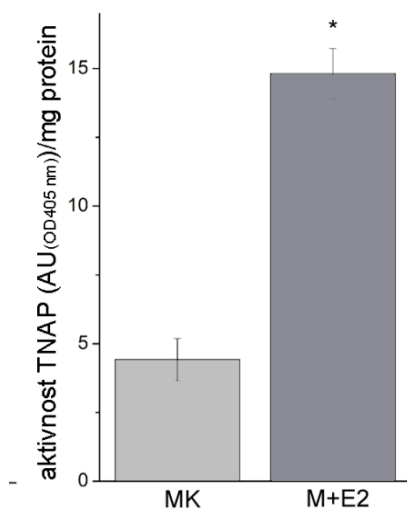


**Slika 24. Kvantitativna analiza ekspresije proteina NTPD-aze 1-3 u hipokampalnim sinaptozomima mužjaka pacova nakon akutnog tretmana E2.** Repräsentativna imunoblot analiza NTPD-aze 1, NTPD-aze 2, NTPD-aze 3 (gornji deo panela). Grafici prikazuju relativnu zastupljenost proteina (normalizovanu u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za β-aktin) ± SEM, iz n = 3 nezavisna ponavljanja. Nivo statističke značajnosti \*p < 0,05 i manje, u odnosu na kontrolnu grupu (MK).

### 2.3. Uticaj $17\beta$ -estradiola na aktivnost tkivno nespecifične alkalne fosfataze

S obzirom na to da jednokratni tretman E2 dovodi do smanjenja aktivnosti NTPD-aza, što može dovesti do akumulacije ATP u sinaptičkoj pukotini i ekscitotoksičnosti, ispitana je i aktivnost TNAP, enzima koji takođe katalizuje defosforilaciju adeninskih nukleotida u vanćelijskom prostoru. Izmerena je gotovo tri puta veća aktivnost enzima nakon jednokratnog tretmana E2 u sinaptozomima hipokampusa mužjaka ( $14,8 \pm 2,2$   $OD_{405nm}/mg$ ;  $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolne vrednosti ( $4,4 \pm 1,9$   $OD_{405nm}/mg$ ) (Slika 25).

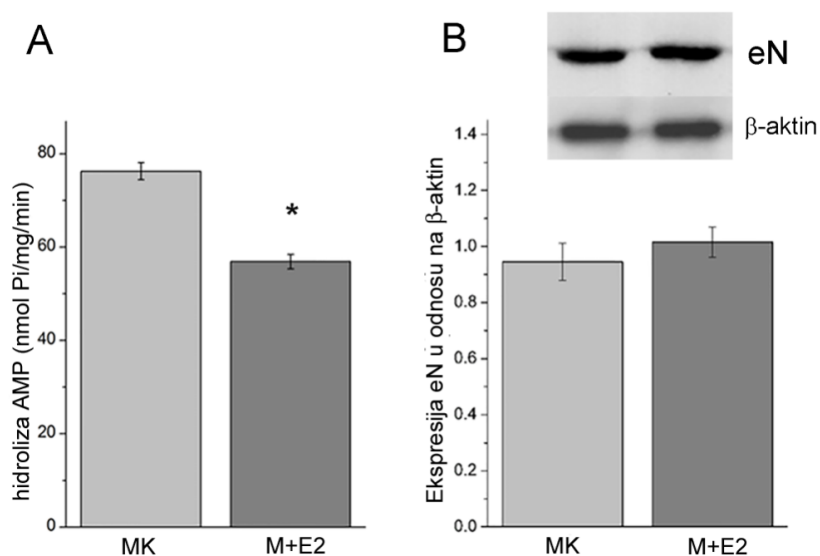
Povećana aktivnost TNAP ukazuje da se, i pored smanjene aktivnosti NTPD-aza, adeninski nukleotidi efikasno uklanjaju iz sinaptičke pukotine.



**Slika 25. Aktivnost TNAP.** Aktivnost enzima predstavljena je kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (arbitrarne jedinice), iz  $n = 3$  nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu. Nivo statističke značajnosti  $*p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu grupu (MK).

## 2.4. Uticaj 17 $\beta$ -estradiola na aktivnost i ekspresiju eN u sinaptozomima hipokampusa mužjaka pacova

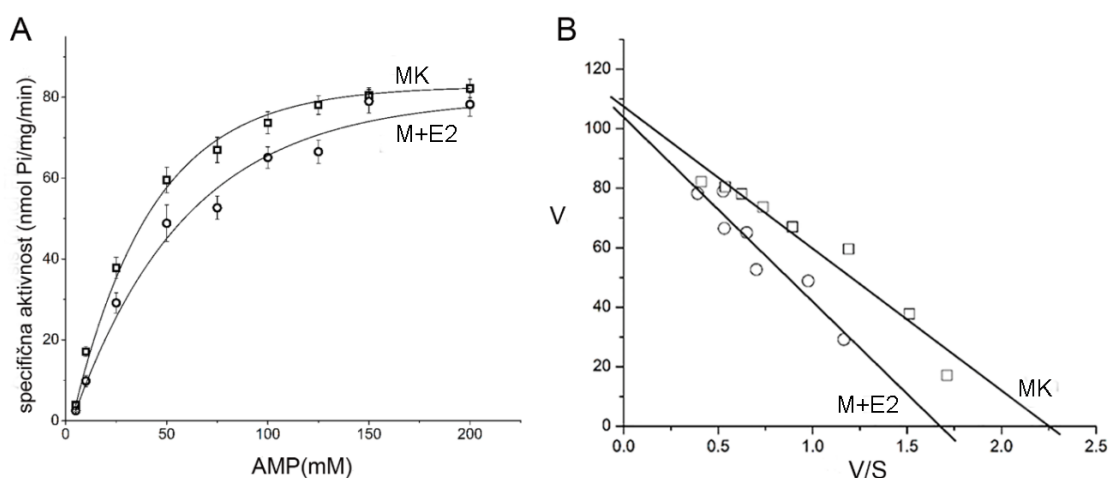
Suprotno nalazima dobijenim na ženka, kod mužjaka je uočeno smanjenje hidrolize AMP u frakciji prečišćenih sinaptozoma izolovanih iz hipokampusa, 24 h nakon tretmana E2. Izmereno je značajno smanjenje hidrolize AMP ( $56,93 \pm 1,56$  nmol Pi/mg/min;  $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu (MK) ( $74,69 \pm 2,33$  nmol Pi/mg/min), dok isti tretman nije doveo do promene relativne količine proteina eN (Slika 26).



**Slika 26.** *In vivo* efekat E2 na aktivnost (A) i proteinsku ekspresiju (B) sinaptičke eN mužjaka pacova. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM iz  $n = 3$  nezavisna eksperimenta. Reprezentativna imunoblot analiza eN (*desni deo panela*); vrednosti optičke gustine normalizovane u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za  $\beta$ -aktin (normalizovane u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za  $\beta$ -aktin). Nivo statističke značajnosti \* $p < 0,01$  u odnosu na kontrolnu (MK) grupu.

## 2.5. Kinetička analiza aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze u sinaptozomima hipokampusa mužjaka pacova nakon tretmana E2

Priroda uočenih razlika u aktivnosti eN nakon tretmana E2, a bez promena u relativnoj količini proteina izučena je analizom kinetičkih parametara enzimske aktivnosti eN. Praćene su promene brzina enzimske reakcije (specifične aktivnosti) u funkciji rastućih koncentracija supstrata (5-200  $\mu\text{M}$  AMP). Michaelis-Menten-ovi grafikoni zavisnosti brzine enzimske reakcija od koncentracije AMP prikazani su na Slici 27A. Kinetički parametri  $K_m$  i  $V_{max}$  izračunati su na osnovu Eadie-Hofstee transformacije podataka iz Michaelis-Menten-ovih grafikona (Slika 27B).



**Slika 27. Promena kinetičkih parametara eN u hipokampalnim sinaptozomima mužjaka pacova nakon tretmana E2.** (A) Michaelis-Menten-ovi grafikoni zavisnosti inicijalnih brzina od koncentracije AMP kod kontrolnih mužjaka tretiranih DMSO (MK) i E2 (M+E2) i (B) linearni Eadie-Hofstee grafikoni V vs. V/[S]. Aktivnost enzima praćena je u prisustvu AMP u opsegu koncentracija 5-200  $\mu\text{M}$ . Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM iz n = 3 nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu.

Nakon akutnog tretmana E2, nije došlo do promene maksimalne brzine hidrolize AMP ( $V_{max}$ ), dok je vrednost  $K_m$  značajno veća u odnosu na kontrolu (Tabela 8), što ukazuje na smanjenje afiniteta enzima prema supstratu. Ove promene  $K_m$  i  $V_{max}$

uslovljavaju smanjenje katalitičke efikasnosti enzima u sinaptozomima hipokampusa 24 h nakon tretmana E2.

Porast vrednosti  $K_m$  i nepromenjena vrednost  $V_{max}$  ukazuju da je aktivnost eN kompetitivno inhibirana, mogućim delovanjem kompleksa E2/ER na katalitičko mesto enzima.

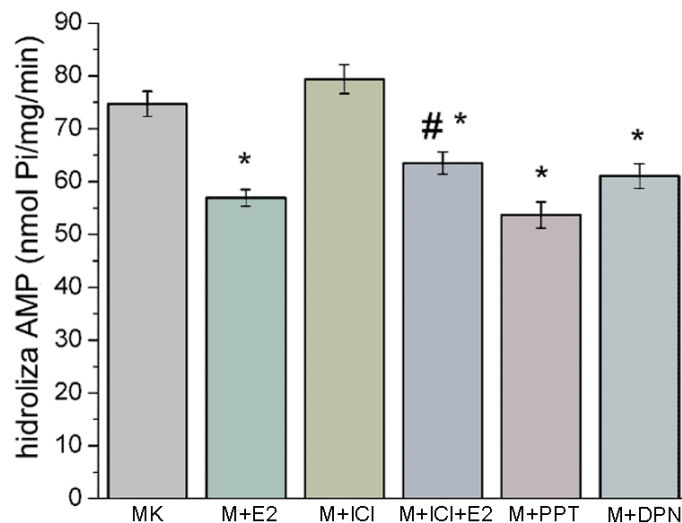
**Tabela 8. Vrednost kinetičkih parametara  $K_m$  i  $V_{max}$  za hidrolizu AMP u sinaptozomima hipokampusa mužjaka nakon tretmana E2**

	$K_m$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	$V_{max}$ (nmol Pi/mg/min)	$V_{max}/K_m$
<b>MK</b>	47,70 $\pm$ 4,61	107,39 $\pm$ 4,85	2,27
<b>M+E2</b>	61,75 $\pm$ 8,93*	103,53 $\pm$ 6,70	1,66*

Nivo statističke značajnosti \*p  $\square$  0,01 u odnosu na kontrolnu grupu (MK)

## 2.6. Uloga ER $\alpha$ i ER $\beta$ u modulaciji aktivnosti i ekspresije eN u sinaptozomima hipokampusa mužjaka pacova

Potencijalni mehanizam estradiolom indukovano smanjenja aktivnosti eN izučen je u narednom eksperimentu u kojem je jedna grupa mužjaka tretirana neselektivnim antagonistom ER, ICI 182.780, a druga ICI 182.780 u kombinaciji sa E2. Kako je prikazano na slici 28., sam ICI ne dovodi do promena u aktivnosti eN, dok je E2, apliciran nakon ICI doveo do smanjene hidrolize AMP (62,35  $\pm$  2,69 nmolPi/mg/min; p < 0,05) u odnosu na kontrolnu grupu MK (74,69  $\pm$  2,33 nmol Pi/mg/min) i na grupu tretiranu samo ICI 182.780 (79,38  $\pm$  2,73 nmol Pi/mg/min). Primenom selektivnih agonista ispitana je pojedinačna uloga ER u modulaciji aktivnosti sinaptičke eN. Nakon tretmana PPT i DPN, nivo hidrolize AMP značajno je smanjen (53,69  $\pm$  2,48 nmol Pi/mg/min, 61,03  $\pm$  2,35 nmolPi/mg/min, redom) do nivoa hidrolize izmerene nakon tretmana E2.



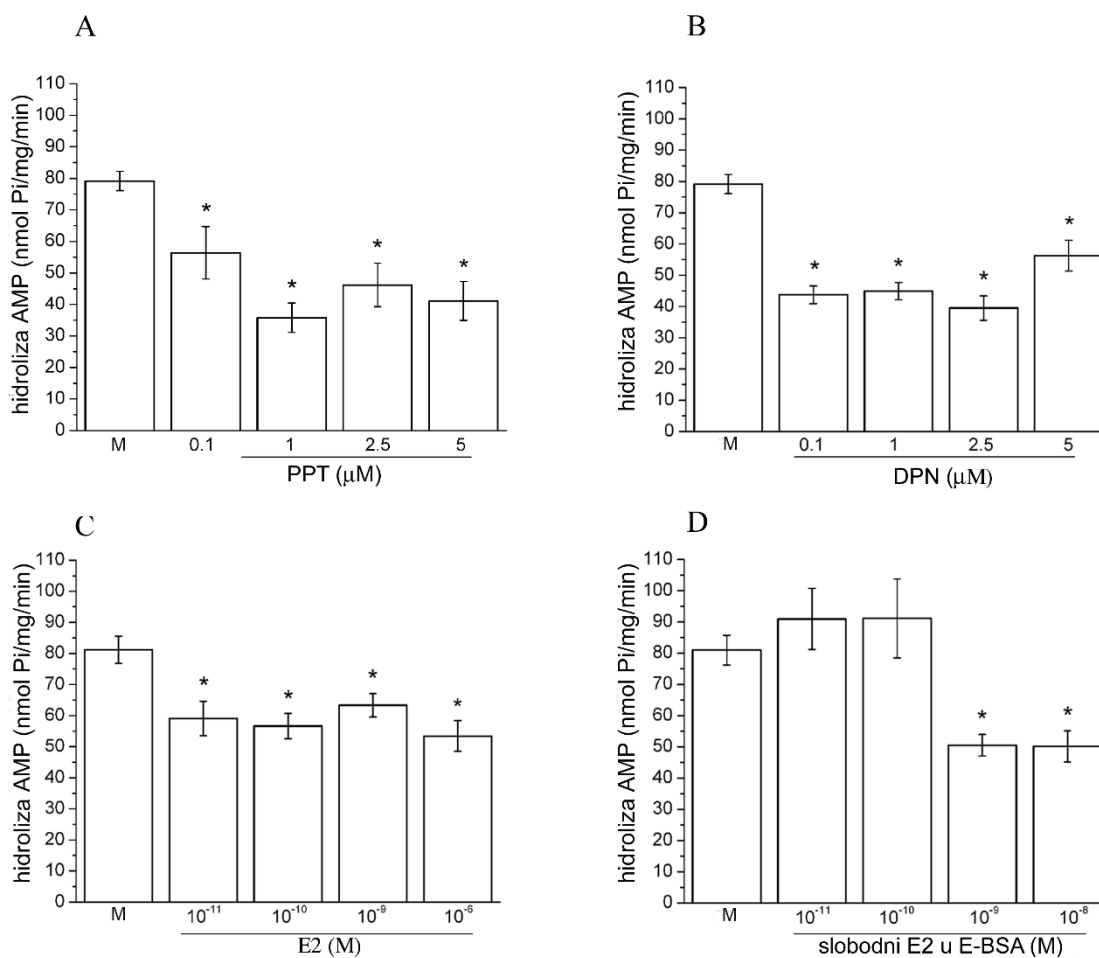
**Slika 28. Doprinos ER u modulaciji aktivnosti sinaptičke eN mužjaka pacova.** Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SEM iz  $n = 2$  nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu. Nivo statističke značajnosti \* $p < 0,05$  i manje u odnosu na grupu tretiranu DMSO (MK); # $p < 0,05$  u odnosu na ICI grupu (M+ICI).

Ovi rezultati ukazuju na to da E2 može dovesti do modulacije aktivnosti eN koordinisanom aktivacijom klasičnih ER, kao i pokretanjem mehanizama nezavisnih od ER $\alpha$  i ER $\beta$ , a bez uticaja na relativnu količinu proteina eN u sinaptozomima hipokampusa.

## 2.7. Uloga ER $\alpha$ i ER $\beta$ u modulaciji aktivnosti sinaptičke eN mužjaka pacova *in vitro*

Kako bi se objasnili efekti agonista ER $\alpha$  i ER $\beta$  na aktivnost eN u sinaptozomima izolovanim iz hipokampusa mužjaka pacova, njihov efekat je praćen i *in vitro*. Sveže izolovani sinaptozomi su inkubirani sa rastućim koncentracijama PPT, DPN, E2 i E2 konjugovanim sa BSA (E-BSA) (Slika 29 A-D). Hidroliza AMP značajno je smanjena nakon inkubacije sinaptozoma sa PPT i DPN ( $p < 0,001$ , Slika 29A,B) u poređenju sa kontrolom. Kada su sinaptozomi tretirani PPT smanjenje aktivnosti eN zavisi od

primenjene doze, dok je pri inkubaciji sa DPN stepen hidrolize bio 2 puta manji nezavisno od primenjene doze. Može se pretpostaviti da je promena nivoa hidrolize AMP *in vivo* posledica ER $\alpha$ - i ER $\beta$ -posredovanog efekta E2 na eN nezavistan od *de novo* sinteze i verovatno je indukovana direktnim alosteričnim akcijama ER $\alpha$  $\beta$ /E2 na eN.



**Slika 29. In vitro efekat E2 i ER na aktivnost sinaptičke eN.** Nivo hidrolize AMP je određena nakon inkubacije prečišćenih hipokampalnih sinaptozoma mužjaka pacova sa (A) PPT, (B) DPN, (C) E2 i (D) E-BSA. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM iz n = 4 nezavisna eksperimenta izvedenih u triplicatu. Nivo statističke značajnosti \*p < 0,01 i manje u odnosu na u odnosu na specifičnu aktivnost izmerenu u sinaptozomima intaktnih mužjaka (M).

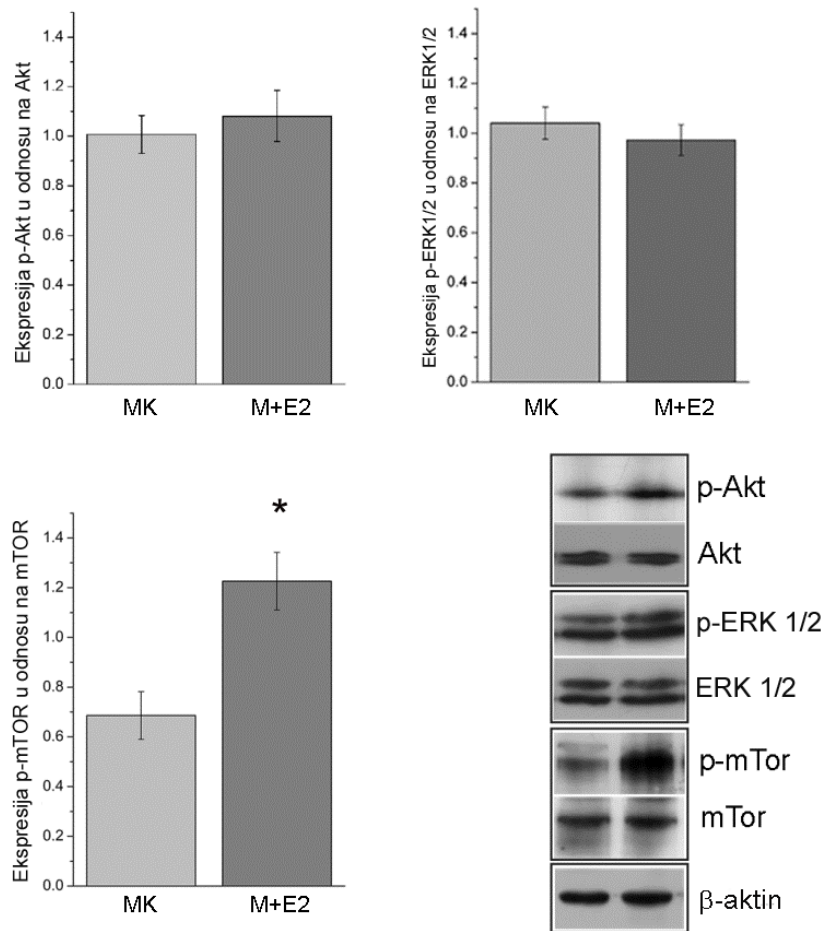


Inkubacija sinaptozoma sa E2 dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti eN pri svim testiranim koncentracijama E2. Sinaptozomi su takođe inkubirani sa E-BSA, konjugatom  $17\beta$ -estradiola koji ne prolazi kroz ćelijsku membranu. Niže koncentracije E-BSA ( $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$  M) nisu uticale na aktivnost eN dok su više koncentracije ( $10^{-9}$  i  $10^{-8}$  M), dovele do smanjenog stepena hidrolize, što ukazuje da se, pri višim koncentracijama, E2 može vezati za membranske receptore sa aktivnim mestom na spoljašnjoj strani membrane ili membranska vezujuća mesta za estradiol (engl. *membrane-associated binding sites*), koji mogu dovesti do modulacije biohemijskih karakteristika eN.

## **2.8. Jednokratni tretman E2 dovodi do sinaptičkih rearanžmana u hipokampusu mužjaka**

Pokazano je da estradiol ima značajnu ulogu u formiranju novih i reorganizaciji postojećih sinapsi u mozgu ženki sisara. Ovaj efekat estradiola posredovan je signalnim putevima koji dovode do povećanja ekspresije sinaptičkih proteina ili njihove preraspodele unutar sinaptičkog kompartmana. Da bismo ispitali da li estradiol u apliciranoj dozi dovodi do sinaptičkih rearanžmana i u hipokampusu mužjaka, praćena je aktivacija ERK1/2, Akt, mTOR signalnih puteva i ekspresija pre- i postsinaptičkih markera, sinaptofizina (SYP) i sintaksina 1 (Syn1), s jedne, odnosno PSD95 proteina s druge strane. Takođe smo izučavali ekspresiju NR1 i NR2B subjedinica glutamatnog receptora i NCAM glikoproteina, koji predstavljaju funkcionalne markere formiranja trnolikih izraštaja.

Uočeno je značajno povećanje nivoa fosforilacije mTOR ( $178,98 \pm 16,25\%$ ;  $p < 0,001$ ) nakon tretmana E2, što ukazuje na aktivaciju ovog signalnog puta, dok aktivacija ERK1/2 i Akt signalnih molekula nije uočena (Slika 30).

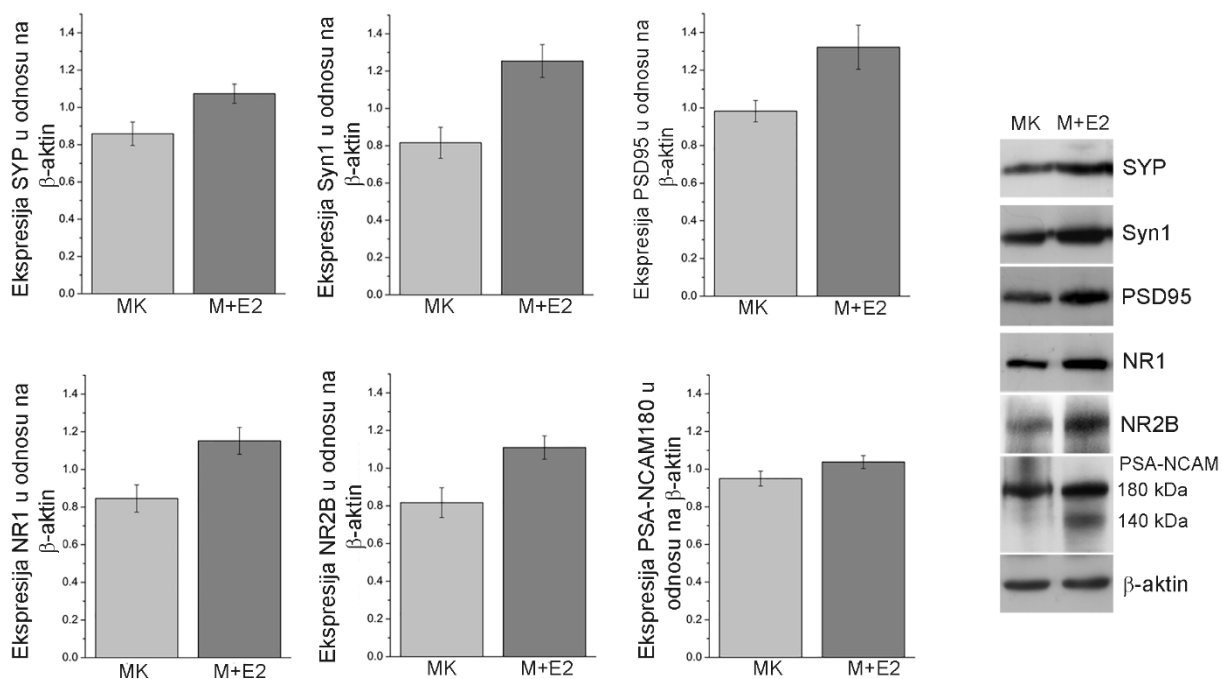


**Slika 30. Kvantitativna analiza ekspresije signalnih molekula u sinaptozomima hipokampusa mužjaka nakon akutnog tretmana E2.** Reprezentativni snimci imunoblota urađeni sa antitelima na fosfo-Akt, ukupni Akt, fosfo-ERK1/2, ukupni ERK1/2, fosfo-mTOR, ukupni mTOR. Rezultati su predstavljeni kao relativne srednje vrednosti  $\pm$  SEM (normalizovane u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za  $\beta$ -aktin) iz  $n = 3$  nezavisna eksperimenata. Nivo statističke značajnosti  $*p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu grupu (MK).

Kako je prikazano na Slici 31. isti tretman doveo je do povećanja ekspresije ključnih proteina za formiranje i sazrevanje sinapsi. Jedan od prvih događaja u procesima spinogeneze i sazrevanja sinapsi je grupisanje adaptornog proteina PSD95 koji će dalje ostvarivati interakcije sa subjedinicama NMDA receptora (Gerrow i sar., 2006; Sheng i Kim, 2011). Tretman E2 doveo je do povećanja sinaptičke ekspresije PSD95 ( $134 \pm 8,51$ ;  $p < 0,01$ ), kao i subjedinica NMDA receptora, NR1 ( $136,33 \pm 6,47$  %;  $p < 0,01$ ) i NR2B ( $135,86 \pm 11,21$  %;  $p < 0,01$ ). Takođe, zabeleženo je i povećanje ekspresije presinaptičkih markera SYP ( $122,63 \pm 6,03$  %;  $p < 0,05$ ) i Syn1 ( $153 \pm 9,79$  %;  $p < 0,001$ ; Slika 31). Ovi proteini imaju ključnu ulogu u formiranju i transportu sinaptičkih vezikula i indikatori su sinaptogeneze, sinaptičke potencijacije i jačanja sinapsi (Sudhof, 1995; Glantz i sar., 2007).

Praćena je i ekspresija NCAM i PSA-NCAM, membranskih proteina važnih za procese sinaptogeneze, regeneracije, ćelijske adhezije i neuronske plastičnosti u hipokampusu. Pokazano je da u hipokampalnim sinaptozomima nije došlo do promene ekspresije NCAM-180 i -140 kDa (rezultati nisu prikazani). Međutim, jednokratni tretman je doveo do ekspresije PSA-NCAM-140 izoforme, koja nije detektovana u kontrolnim uzorcima (Slika 31).

Može se reći da E2 inicira remodelovanje i formiranje novih sinapsi u hipokampusu mužjaka pacova i ovi procesi su u osnovi uočenog smanjenja stepena hidrolize adeninskih nukleotida u sinaptozomima mužjaka pacova.



**Slika 31. Kvantitativna analiza promena ekspresije pre- i postsinaptičkih markera sinaptogeneze u sinaptozomima hipokampusa mužjaka, nakon akutnog tretmana E2.** Reprezentativni snimci imunoblota urađeni sa antitelima na SYP, Syn1, PSD95, subjedinicu NMDA receptora, NR1 i NR2B, NCAM i PSA-NCAM. Rezultati su predstavljeni kao relativne srednje vrednosti  $\pm$  SEM (normalizovane u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za  $\beta$ -aktin) iz  $n = 3$  nezavisna eksperimenta. Nivo statističke značajnosti  $*p < 0,05$  i manje u odnosu na kontrolnu grupu (MK).

### **3. Efekat sedmodnevnog tretmana steroidnim hormonima na aktivnost i ekspresiju eN u hipokampusu OVX ženki i mužjaka pacova**

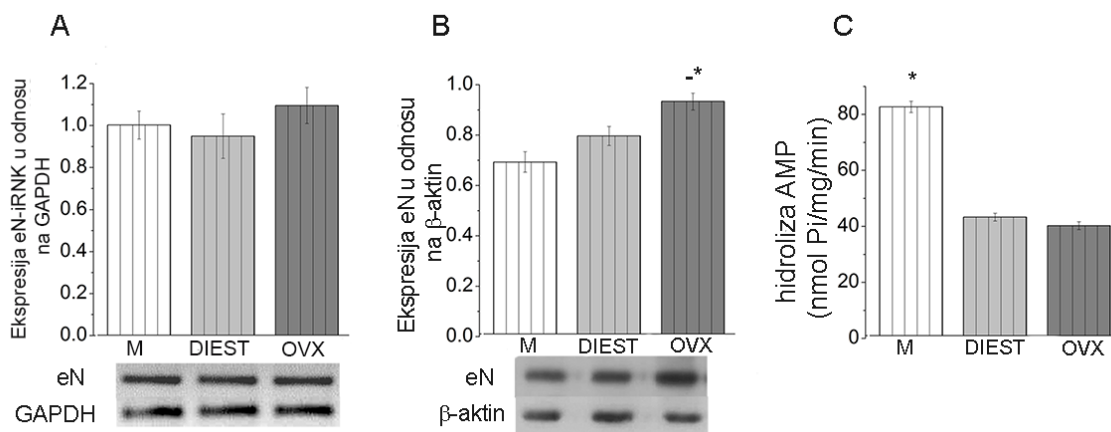
Nakon ispitivanja potencijalne modulacije/regulacije eN estradiolom u OVX ženkama i efekata akutnog tretmana E2 na aktivnost i proteinsku ekspresiju ovog enzima u sinaptozomima izolovanim iz hipokampusa mužjaka, praćeni su efekti sedmodnevnog tretmana ženskim polnim hormonima u totalnoj membranskoj frakciji izolovanoj iz hipokampusa OVX ženki i mužjaka pacova. Ovakav tretman je odabran jer se često koristi pri ispitivanju neuroprotektivnih efekata polnih hormona E2 ili P4. Takođe je, za epimer E $\alpha$ , pokazano da poseduje neuroprotektivni potencijal delujući nezavisno od klasičnih ER, u sličnim koncentracijama i dozama kao i E2 (Moos i sar., 2009). S obzirom da su već decenijama prisutni oprečni rezultati o neuroprotektivnom potencijalu E2, koji je i izrazito feminizirajući hormon, traga se za jedinjenjem kojim bi se efekti estrogena farmakološki odvojili. Poznato je da E $\alpha$  ispoljava slabe feminizirajuće efekte i smatra se da može biti prikladan kandidat za klinička testiranja zbog izostanka negativnih efekata koji se javljaju nakon tretmana E2. Kao osnova za dalja istraživanja u tom smeru, cilj je bio ispitati kakvi su efekti ovih hormona na eN enzim čijom aktivnošću nastaje adenzin, jedan od najvažnijih neuromodulatora i neuroprotektivnih molekula u CNS.

#### **3.1. Bazalna ekspresija ekto-5'-nukleotidaze u hipokampusu pacova – polne specifičnosti i efekat ovarijskektomije**

Polno-specifične razlike u ekspresiji eN ispitane su na nivou iRNK, ekspresije proteina eN i specifične aktivnosti (Slika 32). Razlike su uočene samo na nivou aktivnosti eN, pri čemu je izmerena aktivnost kod polno zrelih mužjaka skoro 2 puta veća ( $82,7 \pm 2,0$  nmol Pi/mg/min;  $p < 0,001$ ) u odnosu na aktivnost izmerenu kod ženki u diestrusu ( $43,3 \pm 1,4$  nmol Pi/mg/min). Kako bi se utvrdio doprinos endogenih hormona, navedeni parametri

su praćeni kod ženki pacova nakon bilateralne ovarijskeektomije. OVX je dovela samo do diskretnog povećanja proteinske ekspresije eN ( $17,6 \pm 3,6 \%$ ;  $p < 0,05$ ).

Može se, dakle, reći da razlike među polovima postoje samo na nivou aktivnosti eN u totalnoj membranskoj frakciji hipokampusu pacova.



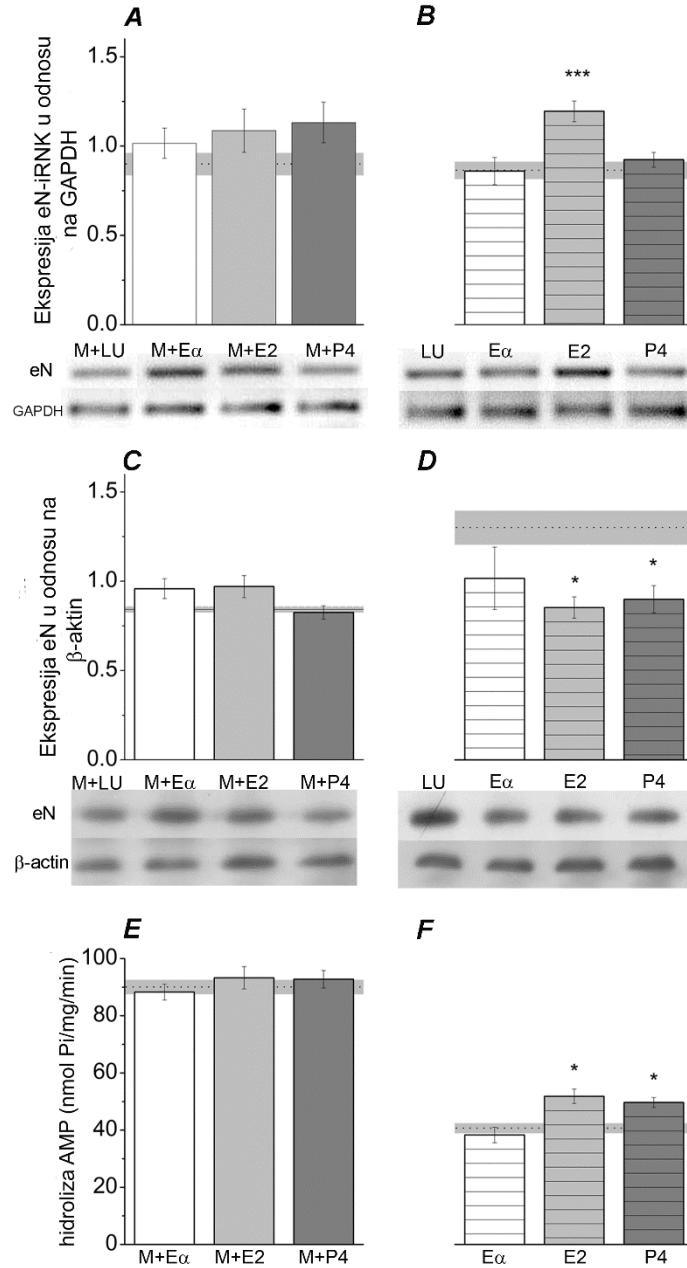
**Slika 32. Polno specifične razlike i efekat ovarijskeektomije na iRNA (A), proteinsku ekspresiju (B) i aktivnost (C) eN u hipokampusu mužjaka i ženki pacova.** Rezultati u stubićima predstavljeni su kao relativne srednje vrednosti  $\pm$  SEM (normalizovane u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za GAPDH za iRNA i  $\beta$ -aktin za proteinsku ekspresiju) iz  $n = 3$  nezavisna eksperimenta. Specifična aktivnost enzima predstavljena je kao srednja vrednost (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM. Nivo statističke značajnosti \* $p < 0,05$  i manje, u odnosu na ženke u diestrusnoj fazi ciklusa (DIEST). M-intaktni mužjaci, DIEST-ženke u diestrusnoj fazi ciklusa, OVX-ovarijskeektomija.

### **3.2. Uticaj sedmodnevnog tretmana steroidnim hormonima na relativnu količinu eN-iRNK, proteina i hidrolizu AMP u hipokampusu OVX ženki i mužjaka pacova**

Sedmodnevni tretmani steroidnim hormonima nisu doveli do promena karakteristika aktivnosti eN u hipokampusu mužjaka, ni na jednom ispitivanom nivou (iRNK [F(3,27) = 1,059; p = 0,383], ekspresija proteina [F(3,28) = 2,929; p = 0,051], aktivnost [F(3,53) = 0,596; p = 0,621]) (Slika 33. A, C, E). S druge strane, kod OVX ženki (Slika 33. B, D, E), sedmodnevni tretman E $\alpha$  nije doveo do promena ekspresije eN, dok je tretman ovarijalnim hormonima, E2 i P4, izazvao promene. Naime, hroničan tretman E2 izazvao je statistički značajan porast ekspresije eN, kako na nivou iRNK ( $17.6 \pm 3.6$  %; [F(3,31) = 6,635; p = 0,0014], Tucky test p  $\leq$  0,001), tako i u pogledu aktivnosti enzima ([F(3,59) = 8,761; p = 0,00007], Tucky test p  $\leq$  0,05,  $51,8 \pm 2,5$  nmol Pi/mg/min) u odnosu na kontrolnu grupu ( $40,70 \pm 1,7$  nmol Pi/mg/min). Ekspresija eN na proteinskom nivou, međutim, značajno je smanjena, za oko 35 %, nakon tretmana E2 ([F(3,26) = 4,092; p = 0,0166] Tucky test p  $\leq$  0,05).

Nakon sedmodnevnog tretmana P4 zabeleženo je smanjenje proteinske ekspresije eN za oko 30% (p  $\leq$  0,05), kao i povećanje nivoa hidrolize AMP ( $49,8 \pm 1,7$  nmol Pi/mg/min; p  $\leq$  0,05), dok promene na nivou iRNK nisu detektovane.

Može se zaključiti da E2 i P4 ispoljavaju različite efekte na nivou genske ekspresije eN u hipokampusu OVX ženki pacova, dok iste efekte ispoljavaju na nivou relativne količine proteina i aktivnosti eN. Za razliku od ženki, u hipokampusu intaktnih mužjaka, nakon hroničnih tretmana steroidnim hormonima, nije zabeležena promena eN ni na jednom ispitivanom nivou.



**Slika 33. Uticaj sedmodnevnog tretmana steroidnim hormonima na ekspresiju eN. Ekspresija eN je određena na nivou iRNAK, proteina i aktivnosti kod mužjaka (A,C,E) i OVX ženki (B,D,E). Rezultati u stubićima predstavljeni su kao relativne srednje vrednosti  $\pm$  SEM (normalizovane u odnosu na optičku gustinu traka dobijenih za GAPDH za iRNAK i  $\beta$ -aktin za proteinsku ekspresiju) iz  $n = 3$  nezavisna eksperimenta. Specifična aktivnost enzima predstavljena je kao srednja vrednost (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM. Nivo statističke značajnosti \* $p < 0,05$  i manje, u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu uljem (M+LU odn. LU).**



# V DISKUSIJA

Strukturna plastičnost hipokampusa veoma je važna za njegovu funkcionalu adaptaciju u odgovoru na različite stimuluse iz spoljašnje sredine ili fiziološke procese, uključujući i promene u nivoima polnih hormona. Tokom estrusnog ciklusa kod ženki pacova, ali i nakon tretmana hormonima, a posebno nakon aplikacije E2, promene u koncentracijama polnih hormona u hipokampusu utiču na promene u veličini, morfologiji i gustini sinapsi, ekscitabilnosti neurona, sinaptičkoj transmisiji u glutamatskim sinapsama i sinaptičkoj plastičnosti, što dovodi do poboljšanja u procesima učenja koji zavise od hipokampusa, ali deluje i na glijske ćelije koje direktno utiču na formiranje i održavanje sinaptičkih kontakata.

Kako je opisano u uvodu, ATP u CNS ima ulogu brzog ekscitatornog neurotransmitera i kotransmitera koji moduliše oslobađanje i funkcionisanje drugih neurotransmitera (pregled u Burnstock, 2007), ali i gliotransmitera i signalnog molekula koji učestvuje u komunikaciji između ćelija CNS, kao i trofičkog faktora koji kontroliše razviće neuronske mreže i sinaptičku plastičnost. Vanćelijski ATP je kratkoživeći molekul koji se brzo defosforiliše u vanćelijskom prostoru do adenzina, setom ektonukleotidaza (NTPD-aze i eN). Adenzin je potentni neuromodulator i homeostatski regulator u CNS, koji reguliše neurotransmisiju, sinaptičku plastičnost i procese učenja i memorije, delujući preko svojih adenzinskih receptora. Analizom literaturnih podataka koji se odnose na

purinsku signalizaciju može se zaključiti da je hipokampus struktura sa najvećim nivoom aktivnosti eN (Bjelobaba i sar., 2009; Nagata i sar., 1984; Nedeljković i sar., 2006), najnižom aktivnošću enzima adenzin deaminaze (Geiger i Nagy, 1986; Yamamoto i sar., 1987) i najnižom relativnom količinom ENT1 (Anderson i sar., 1999) među ispitivanim moždanim strukturama, što ukazuje na visoke vanćelijske koncentracije adenzina u ovom moždanom regionu (Pani i sar., 2014). Ovo potvrđuju i nalazi koji govore u prilog tome da je distribucija P1 receptora u korelaciji sa visokim koncentracijama adenzina, budući da je hipokampus jedan od regiona sa najvećom ekspresijom A1R (Rudolphi i sar., 1992).

S obzirom da su polni hormoni odgovorni za polnu diferencijaciju mozga, ali i čitavog organizma, može se pretpostaviti da su potencijalne polne razlike u aktivnosti različitih signalnih sistema, uključujući ATP i adenzina, indukovane polnim hormonima. Kako bi se proširila saznanja o potencijalnim polnim razlikama u aktivnosti članova purinske signalizacije, u ovoj tezi ispitan je uticaj hormonskog statusa i potencijalni mehanizam regulacije/modulacije sinaptičkih NTPD-aza i eN, 17 $\beta$ -estradiolom u hipokampusu mužjaka i ženki pacova, jer do danas nije poznato da li neki od ženskih polnih hormona direktno moduliše/reguliše ove komponente purinskog transmitterskog sistema. Takođe, ispitivani su efekti pojedinačnih polnih hormona na komponente ovog izuzetno važnog signalnog sistema u CNS oba pola.

## **1. 17 $\beta$ -estradiol pozitivno reguliše NTPD-azu 1 i 2 u sinaptozomima hipokampusa OVX ženki pacova**

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da se nivo hidrolize ATP i ADP menja tokom estrusnog ciklusa: najviši stepen hidrolize i ATP i ADP zabeležen je u estrusu u odnosu na proestrus i diestrus. Razlike između nivoa hidrolize verovatno leže u različitim intrahipokampalnim koncentracijama E2 i P4, koje lokalno variraju zajedno sa koncentracijama u cirkulaciji (Kato i sar., 2013). Može se reći da je stepen hidrolize i ATP i ADP najveći u estrusu, kada nivoi hormona i E2 i P4 opadaju. S obzirom na to da su za vanćelijsku hidrolizu ATP i ADP odgovorne NTPD-aze 1-3, doprinos svake od njih, kao i

mehanizam njihove regulacije tokom estrusnog ciklusa ostaju predmet narednih istraživanja.

Fluktuacije u hidrolizi ATP i ADP tokom estrusnog ciklusa ukazuju na modulaciju NTPD-aza polnim hormonima. Kako bi se ispitao doprinos hormona poreklom iz gonada na aktivnost NTPD-aza, praćena je vanćelijska hidroliza ATP i ADP nakon bilateralne ovarijektomije i aplikacije jedne doze E2. Nivo hidrolize ATP i ADP kod OVX životinja značajno je smanjen u sinaptozomima hipokampusa u odnosu na ispitivane grupe estrusnog ciklusa. Međutim, dobijeni rezultati nisu u saglasnosti sa literaturnim podacima. Naime, Rucker i saradnici (2005) nisu zabeležili promene u nivou hidrolize ATP i ADP u hipokampalnim sinaptozomima nakon OVX, dok je u prethodnoj studiji iz naše laboratorije hidroliza ATP u prečišćenim sinaptičkim membranama nakon OVX bila povećana (Nedeljković i sar., 2000). Razlog ovih neslaganja može biti u metodološkom pristupu, načinu pripreme frakcija kao i nižoj senzitivnosti ranije primenjivanih metoda za određivanje koncentracija neorganskog Pi.

Jedna doza E2 bila je dovoljna da anulira efekte OVX. Iako su podaci o regulaciji ekspresije i *de novo* sinteze NTPD-aza 1 i 2 oskudni, u skladu sa navedenim podacima može se pretpostaviti da je porast ekspresije sinaptičkih NTPD-aze 1 i 2, posledica direktne regulacije ekspresije ovih enzima estradiolom. Literaturni podaci ukazuju na to da gustina sinapsi nakon jednokratnog tretmana počinje da raste, te tako porast nivoa hidrolize nakon tretmana E2 može biti i posledica povećane ekspresije NTPD-aze 1 i 2 u novoformiranim sinapsama. Sa druge strane proteinska ekspresija NTPD-aze 3 se nije promenila nakon tretmana E2. Literaturni podaci (Cunha, 2001; Robson i sar., 2006), kao i izmereni odnos hidrolize ATP i ADP u hipokampalnim sinaptozomima OVX ženki od oko 1:0,4 govore u prilog NTPD-aze 3 kao glavnog enzima ove familije u sinaptičkom odeljku, a čija se aktivnost i proteinska ekspresija ne menjaju 24 h nakon tretmana E2. U prilog navedenom ide i studija Kiss i saradnika (2009) koji su pokazali da, nakon aplikacije E2, dolazi do prolaznog porasta relativne količine proteina NTPD-aze 3, da bi se nakon 24 h proteinska ekspresija vratila na nivo kao i pre tretmana. Ova promena je u saglasnosti sa metabolizmom E2 nakon egzogene aplikacije: nivo E2 raste u cirkulaciji, da bi se nakon 24 h vratio na nivo izmeren pre tretmana (Wooley i McEwen, 1993). Takođe, rezultati

prikazani u ovoj tezi su pokazali da ne postoje promene u genskoj niti u proteinskoj ekspresiji NTPD-aze 3 između OVX i ženki u diestrusu. Zajedno, ovi rezultati ukazuju da NTPD-aza 3 nije pod direktnom regulacijom cirkulišućih ženskih polnih hormona, pa ni estradiola, već je on verovatnije modulator ovog enzima. Stabilnost ovog enzima je, izgleda, neophodna zbog njegove važne uloge u autonomnim funkcijama i obrascima ponašanja koji su regulisani hormonima, kao što su ishrana, ciklus spavanja i budnosti i reprodukcija (Belcher i sar., 2006). Može se, dakle, reći da je promena nivoa hidrolize ATP i ADP, nakon tretmana E2, rezultat izmenjene proteinske ekspresije NTPD-aza 1 i 2, dok izostanak promena na nivou NTPD-aze 3 ukazuje na dominantnu ulogu ovog enzima u regulaciji sinaptičke funkcije.

## **2. 17 $\beta$ -estradiol pozitivno reguliše ekto-5'-nukleotidazu u hipokampalnim sinaptozomima OVX ženki pacova aktivacijom klasičnih estradiolskih receptora**

U ovoj doktorskoj tezi, pokazano je da aktivnost i proteinska ekspresija eN variraju tokom estrusnog ciklusa u hipokampalnim sinaptozomima ženki pacova. Aktivnost eN je najveća u diestrusu, pri smanjenoj intrahipokampalnoj koncentraciji E2 i povećanoj koncentraciji P4 (Kato i sar., 2013), a kao rezultat povećane aktivnosti eN i produkcija adenzina bi trebalo da bude povećana, dok je u proestrusu (lokalna koncentracija E2 najviša, P4 niska) specifična aktivnost eN najniža. Sa druge strane, zabeležen je recipročan obrazac proteinske ekspresije eN i to: najveća relativna količina eN zabeležena je u prostrusu, a nešto niža u estrusu i diestrusu što ukazuje na to da E2 indukuje ekspresiju ovog enzima u sinaptičkim završecima hipokampusa. Inače, uočeni različiti trendovi između aktivnosti i ekspresije eN nisu neuobičajeni (Stanojević i sar., 2011; Brisevac i sar., 2012; Da Silva i sar., 2012), s obzirom da se aktivnost eN može menjati kao rezultat promena kinetičkih parametara, a ne nužno zbog promena u relativnoj količini proteina. Sa druge strane, eN, pored katalitičke uloge, ima funkciju i adhezivnog molekula koji učestvuje u procesima ćelijske migracije, sinaptičke plastičnosti i remodelovanja

(Zimmerman, 1992; Zimmerman i sar., 2012). Tako ovi rezultati ukazuju da suptilne promene na nivou eN, mogu biti deo kompleksne molekulske mreže koja učestvuje u sinaptičkim rearanžmanima, a koji se dešavaju tokom estrusnog ciklusa kod pacova (Kato i sar., 201; Frick i sar., 201).

Doprinos cirkulišućih polnih hormona poreklom iz gonada u regulaciji aktivnosti i relativne količine sinaptičke eN, dalje je ispitan nakon ovarijektomije životinja. Iako je nivo cirkulišućih polnih hormona značajno smanjen nakon OVX, u hipokampusu se odvija intenzivna lokalna sinteza polnih hormona zahvaljujući kojoj intrahipokampalna koncentracija E2 ostaje na istom nivou kao i u diestrusu. (Kato i sar., 2013). Isto tako i relativna količina eN je nepromenjena u sinaptičkom kompartmanu OVX ženki u odnosu na diestrus. Međutim, izmerena aktivnost eN je skoro dva puta niža od one u diestrusu i posledica je promena u kinetičkim parametarima enzima. Ovarijektomija je dovela do povećanja afiniteta eN za supstrat, ali i do smanjenja maksimalne brzine reakcije ( $V_{max}$ ), što za rezultat ima nepromenjenju enzimsku efikasnost eN nakon OVX u odnosu na ženke u diestrusu, što dalje ukazuje na nepromenjenju produkciju adenzina. U prilog ovoj pretpostavci ide i preliminarni rezultat koji je pokazao da ne dolazi do promena u relativnoj količini A2A receptora nakon OVX (rezultat nije prikazan), a koji je funkcionalo povezan sa eN (Augusto i sar., 2013).

Potencijalni mehanizam regulacije/modulacije eN estradiolom u sinaptičkom odeljku hipokampusa OVX ženki ispitan je nakon tretmana E2 ali i nakon aplikacije neselektivnog antagoniste ER $\alpha$  i ER $\beta$  i njihovih selektivnih agonista. Tretman jednom dozom E2 doveo je do povećanja stepena hidrolize AMP i relativne količine proteina eN. Kako su klasični estradiolski receptori, ER $\alpha$  i ER $\beta$ , lokalizovani u sinaptičkom odeljku (Nishio i sar., 2004; Tabatadze i sar., 2013; Sellers i sar., 2015a, 2015b) testirana je hipoteza da E2 svoje efekte ostvaruje aktivacijom klasičnih ER. Aplikacija neselektivnog agoniste ER $\alpha$  i ER $\beta$ , ICI 182.780, potvrdila je uključenost klasičnih ER u modulaciji/regulaciji sinaptičke eN. S obzirom na to da su tretmani ICI i ICI+E2 doveli do smanjenja proteinske ekspresije eN može se pretpostaviti da je aktivnost klasičnih ER neophodna za bazalnu ekspresiju eN proteina. Selektivni agonist ER $\alpha$ , PPT, doveo je do povećanja kako aktivnosti, tako i proteinske ekspresije eN, dok je tretman DPN (selektivni agonista ER $\beta$ ) doveo do

povećanja aktivnosti eN, bez promena u relativnoj količini proteina eN. Ovi rezultati ukazuju na uključenost oba estradiolska receptora u modulaciji sinaptičke eN ali i na različite mehanizme njihovog delovanja. U oba slučaja, E2 mora proći ćelijsku membranu kako bi aktivirao klasične ER, što je pokazano na sinaptozomima inkubiranim sa E-BSA, konjugatom E2 koji ne može proći kroz ćelijsku membranu.

Klasični model po kome E2 ispoljava svoje efekte uključuje prolazak E2 kroz ćelijsku membranu i njegovo vezivanje za unutarćelijske receptore, koji se dalje transportuju u jedro i vezuju za specifične ERE sekvence u promotorskom regionu ciljnog gena. Ultrastrukturalna lokalizacija ER $\alpha$  ukazuje na to da, aktivacija ER $\alpha$  može dovesti i do genomskih i do negenomskih efekata E2 (Milner i sar., 2001, 2005). Iako promotorski region gena za eN (*Nt5e*) ne sadrži specifičnu ERE sekvencu (Hansen i sar., 1995; Spsychala i sar., 2004), mnogobrojne studije ukazuju na mogućnost interakcije ER $\alpha$  sa transkripcionim faktorima Ap-1 i Sp1 (Jones i sar., 2002; Zelinski i sar., 2002; Vivar i sar., 2010) za koje je pokazano da su aktivni na nivou promotora *NT5E* gena (Spsychala i sar., 1999; Carroll i sar., 2006). Tako E2, aktivacijom ER $\alpha$ , verovatno pokreće transkripciju *Nt5e* gena, *de novo* sintezu proteina i kao rezultat povećane količine proteina povećana je i aktivnosti eN. Drugi potencijalni mehanizam uključuje direktnu aktivaciju signlnih puteva, kao npr. protein kinaze C (Sellers i sar., 2015a), za koji je pokazano da dovodi i do povećanja ekspresije eN (Spsychala i sar., 1997, 1999).

Za razliku od ER $\alpha$ , rezultat aktivacije ER $\beta$  je povećanje aktivnosti eN. Predpostavlja se da ER $\beta$  posreduje u brzim, tzv. ne-genomskim efektima E2 (Millner i sar., 2005). ER $\beta$  (kao i ER $\alpha$ ) može biti lokalizovan sa unutrašnje strane ćelijske membrane, gde je fizički i funkcionalno povezan sa kaveolinom, glutamatskim receptorima, receptorima za tirozin kinazu i aktivira signalne puteve koji zavise od povećanog Ca<sup>2+</sup> i NO, a koji dovode do različitih fizioloških promena u ćelijama (Sellers i sar., 2015a). S obzirom na to da je i eN u fizičkoj interakciji sa proteinom kaveolinom (Sadej i sar., 2006) i takođe lokalizovan u lipidnim splavovima kao i ER, moguće je da ER $\beta$  intereaguje direktno sa eN i tako dovede do alosternih modifikacija enzima koje utiču na njegovu aktivnosti (Misumi i sar., 1990; Schicker i sar., 2009). Dakle, na potencijalnu direktnu interakciju eN i ER $\alpha/\beta$  ukazuje njihova anatomsko lokalizacija – oba proteina su lokalizovana u lipidnim splavovima

sinaptičkih membrana, ali i rezultat koimunoprecipitacije, koji je ovo delimično potvrdio. Rezultati koimunoprecipitacije možda nisu u potpunosti specifični za ER $\beta$ , s obzirom na to da dostupna antitela na ER $\beta$  prepoznaju i protein(e) koji nije ER $\beta$  (Snyder i sar., 2010). Zbog toga, rezultate ovih eksperimenata treba prihvatiti sa rezervom.

Nedavno je pokazano da E2, aktivacijom ER $\beta$  (ali ne i ER $\alpha$ ), dovodi do povećanja broja dendritskih trnčica, koji mogu uspostaviti funkcionalne sinaptičke kontakte (Sellers i sar., 2015b). Takođe, pokretanje signalnih puteva aktivacijom ovog receptora dovode do brzih promena na nivou glutamatske neurotransmisije (Liu i sar., 2008; Kramar i sar., 2009). Sa druge strane, aktivacija A2A receptora adenozinom koji je rezultat aktivnosti eN, takodje je neophodna za pokretanje plastičnih promena na nivou ekscitatornih sinapsi (Cunha, 2008) jer dovodi do pojačanog oslobađanja glutamata i aktivacije NMDA receptora. Tako, uočeno povećanje aktivnosti eN aktivacijom ER $\beta$  ukazuje na brzu regulaciju sinaptičke transmisije pri sinaptičkim rearanžmanima koji se dešavaju pod uticajem E2. Aktivacija A2A receptora usled visokofrekventne produkcije adozina, koja se dešava kada je aktivnost eN povećana, u ovom slučaju nakon tretmana E2, može pojačati BDNF signalizaciju (Sebastiao i sar., 2011) kao i mehanizam dugotrajne potencijacije, i tako doprineti procesima sinaptičke plastičnosti (Rebola i sar., 2008; Costenla i sar., 2010) koji su takođe regulisani E2 i aktivacijom njegovih receptora (Frankfurt i Luine, 2015; Frick i sar., 2015; Arevalo i sar., 2015; Sellers i sar., 2015a).

I dok doprinos ER $\alpha$  i ER $\beta$  na nivou genske ekspresije i/ili translacije proteina familije ektonukleotidaza zahteva dodatna istraživanja, rezultati ukazuju na to da svaki od receptora ima različitu ulogu u fiziologiji neurona, sinaptičkoj plastičnosti i procesima ponašanja zavisnim od hipokampusa (Frankfurt i Luine, 2015; Frick i sar., 2015; Sellers i sar., 2015a). Rezultati ove doktorske teze govore u prilog tome da poznati efekti E2 na nivou funkcionalnih karakteristika sinapsi u hipokampusu, mogu delom biti posledica zapaženih efekata na nivou eN, glavnog enzima odgovornog za vanćelijsko formiranje adozina u CNS.

### **3. Sinaptički rearanžmani indukovani 17 $\beta$ -estradiolom praćeni su promenama u ekspresiji ektonukleotidaza u hipokampalnim sinaptozomima muŹjaka pacova**

Kao Źto je već opisano, ATP i finalni produkt njegove vanćelijske defosforilacije, adenzin, imaju vaŹnu ulogu u kontroli ekscitatorne glutamatske neurotransmisije u hipokampusu (Burnstock, 2007; Koles i sar., 2016), a vanćelijska koncentracija ATP i drugih adeninskih nukleotida/nukleozida je fino regulisana aktivnoŹću ektonukleotidaza (Zimmerman i sar., 2012). Medjutim, informacije o uticaju Źenskih ali i muŹkih polnih hormona na ove grupe enzima kod muŹjaka su takođe oskudne. Rezultati prikazani u ovoj tezi ukazuju da hormoni poreklom iz testisa muŹjaka ne utiću na stepen hidrolize adeninskih nukleotida. Poznato je da nakon bilateralne kastracije dolazi do značajnog smanjenja nivoa testosterona i dihidrotestosterona (DHT), kako u cirkulaciji, tako i u hipokampusu (Hojo i sar., 2009), za razliku od E2, ćiji nivo u hipokampusu ostaje veoma visok a pod ćijim su uticajem NTPD-aze i eN Źto smo prethodno pokazali kod Źenki pacova. MoŹe se zakljućiti da sinaptićeke ektonukleotidaze nisu pod direktnim uticajem testosterona poreklom iz gonada i njegovog potentnijeg metabolita DHT.

S obzirom na to da se intaktni, polno zreli muŹjaci veoma ćesto koriste za ispitivanje neuroprotektivnih efekata hormona u modelima neurodegeneracije (kako bi se izbegle fluktuacije hormona tokom estrusnog ciklusa kod Źenki) jedan od ciljeva ove doktorske teze bio je ispitati efekat E2 na vanćelijski metabolizam adeninskih nukleotida u frakciji prećišćenih sinaptozoma hipokampusa intaktnih muŹjaka. Tretman E2 doveo je do smanjenja proteinske ekspresije i/ili aktivnosti NTPD-aze 1, NTPD-aze 2 i eN, Źto ukazuje na smanjenu aktivnost enzimskog lanca koji hidrolizuje vanćelijski ATP, a Źto moŹe rezultovati povećanim odnosom ATP:adenozin u vanćelijskom prostoru. Ovi rezultati su neoćekivani, s obzirom na to da je pokazano da E2 dovodi do povećanja aktivnosti eN u hipokampalnim sinaptozomima OVX Źenki pacova. Razlike u efektima E2 među polovima verovatno leŹe u razlićitim intrahipokampalnim koncentracijama E2, koja je mnogo veća kod muŹjaka u odnosu na Źenke u svim fazama estrusnog ciklusa ali i nakon OVX (Hojo i



sar., 2009; Kato i sar., 2013). Uočene razlike mogu biti i posledica različitog metabolizma E2 kod mužjaka i ženki. Kod gonadektomisanih ženki, primenjena doza E2 dovodi do nadfizioloških koncentracija E2 u cirkulaciji, a metaboliše se 24 h nakon aplikacije (Wooley i McEwen, 1993), za razliku od mužjaka, kod kojih ista doza E2 dovodi do povećanja koncentracije E2 u cirkulaciji iznad fizioloških vrednosti, a povećana vrednost ostaje i 24 h nakon aplikacije (Obradovic i sar., 2014).

U sinaptozomima mužjaka, aplikacija E2 dovodi do smanjenja aktivnosti NTPD-aze 1, NTPD-aze 2 i eN, ali i povećanja aktivnosti TNAP. Odnos hidrolize ATP:ADP od oko 1:0.2 u frakciji prečišćenih sinaptozoma hipokampusa mužjaka pre i nakon tretmana E2, ukazuje na aktivnost NTPD-aze 3 kao glavne ektonukleotidaze prisutne u sinapsama (Cunha, 2001; Robson i sar., 2006), što je uočeno i kod OVX ženki. Imunohistohemijske studije su, takođe, potvrdile lokalizaciju NTPD-aze 3 na sinaptičkim strukturama (Belcher i sar., 2006; Kiss i sar., 2009; Bjelobaba i sar., 2010; Grkovic i sar., 2016). Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da E2 smanjuje aktivnost sinaptičkih NTPD-aze 1 i 2, ali ne utiče na aktivnost i ekspresiju NTPD-aze 3. Kinetičke karakteristike NTPD-aze 3 su između NTPD-aze 1 i 2, što rezultuje prolaznom akumulacijom ADP u sinaptičkoj pukotini. Aktivacija ADP-senzitivnih purinoreceptora, P2Y1 i P2Y13, koji se eksprimiraju u distalnim domenima aksona pospešuje formiranje sinaptičkih kontakata (del Puerto i sar., 2012, 2013) dok ovi nukleotidi mogu biti razgrađeni aktivnošću tkivno nespecifične alkalne fosfataze (TNAP) čija je aktivnost u ovim uslovima značajno povećana. Pokazano je da je TNAP uključen u procese formiranja i sazrevanja sinapsi i zato značajno povećanje aktivnosti ovog enzima može biti pokazatelj sinaptičkih rearanžmana (Hanics i sar., 2012; Sebastian-Serrano i sar., 2015), ali i efikasne eliminacije viška ATP iz vanćelijskog prostora. Aktivnost TNAP je funkcionalno povezana sa P2X7 receptorm, pri čemu TNAP sprečava aktivaciju P2X7 receptora, hidrolizujući ATP u njegovoj neposrednoj blizini, a samim tim i inhibiciju formiranja sinapsi (Diez-Zaera i sar., 2011; Sebastian-Serrano i sar., 2015).

Dalje, rezultati ukazuju da tretman E2 dovodi do smanjene aktivnosti eN, bez uticaja na njegovu proteinsku ekspresiju. Već je opisano da promene u aktivnosti eN ne zavisi od relativne količine ovog enzima (Stanojevic i sar., 2011; Brisevac i sar., 2012). Naime,

smanjenje nivoa hidrolize AMP nakon tretmana E2 u hipokampalnim sinaptozomima mužjaka pacova, nije posledica promena na nivou transkripcije proteina eN, već promena kinetičkih parametara enzima. Iako nakon tretmana E2 maksimalna brzina enzimske reakcije ostaje nepromenjena, dolazi do smanjenja afiniteta eN za supstrat što dovodi do smanjene enzimske efikasnosti eN. Dobro je poznato da su ATP i ADP kompetitivni inhibitori eN (Cunha, 2001). Zato je moguće da povećana koncentracija ATP i ADP u sinaptičkoj pukotini, a kao rezultat smanjene aktivnosti NTPD-aza 1 i 2, dovodi do „upozoravajuće“ inhibicije eN, bez promena u relativnoj količini proteina.

Nakon tretmana neselektivnim antagonistom i selektivnim agonistima ER, može se pretpostaviti da su u modulaciji sinaptičke eN pored klasičnih, uključeni i mehanizmi nezavisni od aktivacije klasičnih ER $\alpha$  i ER $\beta$ , što je i potvrđeno *in vitro* eksperimentima u prečišćenoj frakciji sinaptozoma hipokampusu mužjaka. E2 se može vezati za membranske receptore sa aktivnim mestom na spoljašnjoj strani membrane, kakav je GPR30, i/ili membranska vezujuća mesta za E2 (engl. *membrane-associated binding sites*), koji mogu dovesti do modulacije biohemijjskih karakteristika eN. Međutim, tačan mehanizam modulacije i kako oni intereaguju sa familijom NTPD-aza i vanćelijskim metabolizmom ATP, ostaje predmet daljih istraživanja.

Da bi se ispitalo šta je u pozadini uočenih promena u aktivnosti i proteinskoj ekspresiji NTPD-aza i eN, tj. da li E2 kod mužjaka inicira procese koji dovode do formiranja novih sinapsi, praćeni su signalni putevi i proteinska ekspresija sinaptičkih proteina koji su neophodni za proces spinogeneze. S obzirom na to da vanćelijski ATP i adenzin imaju važnu ulogu tokom sinaptogeneze i sinaptičke plastičnosti, ektonukleotidaze mogu imati važnu ulogu u procesima sinaptičkih rearanžmana koji se dešavaju kod mužjaka nakon tretmana E2 podjednako brzo kao i kod ženki (Leranth i sar., 2003, Frick i sar., 2015, Jacome i sar., 2016), a čiji mehanizam još uvek nije poznat. Rezultati pokazuju da tretman E2 dovodi do povećanja ekspresije ključnih sinaptičkih proteina u hipokampusu intaktnih mužjaka, što ukazuje na formiranje nezrelih sinpsi.

Poznato je da E2 aktivacijom membranskih ER u kratkom vremenskom intervalu i aktiviraju signalne molekule koji dovode do brze lokalne sinteze proteina i indukuju sinaptičke rearanžmane, kao što je mTOR signlni put, a koji pokreću brojne kinaze,

uključujući ERK 1/2 i Akt (Fortress i sar., 2013; Sellers i sar., 2015a, 2015b; Tuscher i sar., 2016). U saglasnosti sa već poznatim rezultatima, rezultati prikazani u ovoj tezi pokazuju da su aktivne forme ERK1/2 i Akt nepromenjene, dok je aktivirani, fosforilisani mTOR protein prisutan i 24h nakon tretmana E2, što ukazuje na odvijanje lokalne sinteze proteina u hipokampusu intaktnih mužjaka. Povećanje proteinske ekspresije SYP i Syn1, kao i PSD95, NR1 i NR2B, ukazuje na to da E2 dovodi do spinogeneze i sinaptičkih rearanžmana, što je u saglasnosti sa prethodnim *in vitro* studijama na presecima mozga mužjaka (Srivastava i sar., 2008; Smith i sar., 2009; Potier i sar., 2015; Sellers i sar., 2015b). Procesi sinaptičkih rearanžmana zavise od interakcija između ćelija i ćelija sa vanćelijskim matriksom, a koje se ostvaruju adhezivnim molekulima kakav je NCAM. Poznato je da estrogini regulišu proces polisijalinacije proteina NCAM tokom estrusnog ciklusa u hipotalamusu ženki pacova (Tan i sar., 2009). Rezultati pokazuju da E2 nije doveo do promena ukupne ekspresije proteina NCAM, ali je indukovao polisijalinaciju izoforme NCAM 140kDa, što je još jedan od pokazatelja formiranja nezrelih sinapsi (Cox i sar., 2009). Ovi rezultati, zajedno sa već publikovanim studijama (Jacome i sar., 2016; Frick i sar., 2015), ukazuju na to da tretman E2 aktivira molekulsku mašineriju neophodnu za formiranje novih sinaptičkih kontakata i kod intaktnih mužjaka, što može rezultovati remodelovanjem neuronskih kola i poboljšanju kognitivnih funkcija (Frick i sar., 2015; Sellers i sar., 2015a).

Može se reći da jednokratni tretman E2 dovodi do negativne regulacije enzimskog lanca odgovornog za vanćelijsku hidrolizu ATP u sinaptičkoj pukotini. Aplikacija jedne doze E2 smanjuje proteinsku ekspresiju NTPD-aze 1 i 2, povećava aktivnost TNAP i održava dominantnu sinaptičku funkciju NTPD-aze 3, što ide u prilog pretpostavci o specifičnoj ulozi ektonukleotidaza u E2-indukovanim sinaptičkim rearanžmanima i formiranju dendritskih trnolikih izraštaja.

#### **4. Efekat ponovljenih (sedmodnevnih) tretmana E $\alpha$ , E2 i P4 na ekspresiju eN u hipokampusu mužjaka i OVX ženki**

Adenozin je veoma potentan neuromodulator i homeostatski regulator u CNS, čije promene u vanćelijskoj sredini mogu uticati na aktivnost P1 receptora, a samim tim i na preuzimanje i oslobađanje drugih neurotransmitera kao što su glutamat i acetilholin (Gomes i sar., 2011). Pošto je eN jedini enzim u CNS odgovoran za vanćelijsko formiranje adenozina, a rezultati jednokratnog tretmana su pokazali da je modulisan/regulisan estradiolom, praćen je efekat sedmodnevnog E $\alpha$ , E2 i P4 na nivou ekspresije iRNK, proteina i aktivnosti eN u hipokampusu mužjaka i OVX ženki. Ovakav tretman je odabran jer se često koristi pri ispitivanju neuroprotektivnih efekata polnih hormona E2 ili P4 (Stanojlovic i sar., 2015a, 2015b). Takodje je pokazano da prirodni epimer E2, E $\alpha$ , poseduje neuroprotektivni potencijal delujući nezavisno od klasičnih ER, u sličnim koncentracijama i dozama kao i E2 (Moos i sar., 2009).

Doprinos cirkulišućih polnih hormona na ekspresiju i aktivnost eN u totalnim membranama hipokampusa ženki prvo je ispitan nakon bilateralne ovarijske tomije ženki. Iako je ovarijska tomija, dovela do blagog povećanja relativne količine proteina eN, ekspresija iRNK i aktivnost enzima je ostala nepromenjena u odnosu na intaktne ženke u diestrusnoj fazi ciklusa. Za razliku od ovih rezultata, u prečišćenoj sinaptosomalnoj frakciji nije uočena promena u relativnoj količini proteina eN nakon OVX. Ove razlike ukazuju na to da je uloga polnih hormona u modulaciji/regulaciji ekspresije eN specifična za tip ćelija, s obzirom na to da totalna membranska frakcija, korišćena u ovim eksperimentima sadrži pored sinaptosoma, i membrane neurona i astrocita, a poznato je da je eN mnogo zastupljenija u astrocitima (Brisevac i sar., 2012; Zimmermann, 1992). Tako, povećana relativna količina proteina eN u membranama hipokampusa nakon OVX može ukazivati na promene u ekspresiji eN u astrocitima. Iako je pokazano da jednokratni tretman E2 dovodi do smanjenja aktivnosti eN u sinaptosomima hipokampusa mužjaka, ni jedan od primenjenih hormona nije doveo do promena u aktivnosti i ekspresiji eN. Poznato je da je nakon ponovljenog tretmana E2, nivo ovog hormona značajno viši i u cirkulaciji i u

hipokampusu u odnosu na koncentracije u kontrolnim životinjama (Barker i Galea, 2009). Izostanak efekata u totalnoj membranskoj frakciji hipokampusa mužjaka pacova možda se može objasniti adaptacijama eN na promene hormonskog statusa, nastale nakon ponovljenih tretmana.

Isto tako, nakon ponovljenih (sedmodnevnih) tretmana,  $E\alpha$ , nije doveo do promena ekspresije eN ni na jednom ispitivanom nivou (ekspresija iRNK, relativna količina proteina, aktivnost eN) kod OVX ženki.  $E\alpha$  ima mali afinitet za vezivanje za klasične ER i pretpostavlja se da svoje efekte ispoljava primarno vezujući se za ER-X (Torran Allerand, 2005). S obzirom na to da ER-X nije detektovan u adultima, već se primarno eksprimira tokom razvića i u patološkim stanjima CNS (Torran Allerand, 2005), izostanak efekata nakon ponovljenog tretmana  $E\alpha$ , kod oba pola je očekivan. Sa druge strane, ponovljeni tretman E2 doveo je do povećanja iRNK za eN i smanjenja relativne količine proteina kod OVX ženki, dok ponovljeni tretman P4 nije imao efekta na nivou eN-iRNK, ali je doveo do smanjenja relativne količine eN u odnosu na kontrolu. Može se pretpostaviti da E2 i P4 ispoljavaju različite efekte na nivou procesa transkripcije i translacije, a efekti mogu zavisiti od njihove intrahipokampalne koncentracije. Međutim, tačni mehanizmi regulacije ostaju predmeti daljih istraživanja. Poznato je da steroidni hormoni deluju direktno na transkripciju ciljnih gena, vezujući se za klasične, jedarne receptore, koji su i transkripcioni faktori koji se aktiviraju ligandima, ili indirektno interakcijom sa drugim transkripcionim faktorima (Mani i Oyola, 2012; Sellers i sar., 2015a, 2015b; Singh i sar., 2013; Tetel i sar., 2009). Kako je već opisano, steroidni hormoni regulišu aktivnost AP-1 i Sp1 transkripcionih faktora (Faivre i sar., 2008; Jones i sar., 2002; Vivar i sar., 2010), koji su aktivni na nivou promotora eN gena (Spychala i sar., 1999).

Hronični tretmani E2 i P4, u trajanju od sedam dana, doveli su do povećanja nivoa hidrolize AMP u hipokampusu. Poznato je da nakon OVX koncentracija E2 u hipokampusu opada, dok nakon ponovljenog tretmana koncentracija E2 značajno raste (Barker i Galea, 2009). Međutim, ne treba zanemariti činjenicu da dobijeni rezultati mogu biti posledica samo poslednje aplikovane doze, s obzirom na to da je koncentracija E2 nakon tretmana prolazno povećana i da se E2 metabliše u toku 24 h (Wooley i McEween, 1993). Sa druge strane, funkcionalni eN enzimi su homodimeri sa različitim obrascima glikozilacije

(Misumi i sar., 1990), koji mogu uticati na kinetičke parametre enzima. Uočene promene u aktivnosti eN nakon ponovljenih tretmana polnim hormonima, mogu biti posledica izmenjene glikozilacije proteina što može biti objašnjenje u slučajevima kada nema korelacije između eN genske/proteinske ekspresije i enzimske aktivnosti (Bavaresco i sar., 2007; Brisevac i sar., 2012; Da Silva i sar., 2012; Grkovic i sar., 2014; Stanojevic i sar., 2011). Takođe, moguće je da egzogeno aplicirani polni hormoni modulišu aktivnost eN tako što, indirektno, utiču na specifične regulatorne faktore ili signalne puteve koji menjaju topografiju i konformaciju proteina (Zimmermann, 1992), kao što je pokazano u ćelijskim linijama kancera dojki (Spsychala i sar., 2004). Pored toga, dimeri eN stupaju u međusobne interakcije, interakcije sa drugim ektonukleotidazama, P1 i P2 receptorim i nukleozidnim transporterima i formiraju hetero-oligomerne komplekse (Schicker i sar., 2009) koji mogu fino modulisati aktivnost eN. Tako, topologija komponenti purinskog sistema na ćelijskoj membrani, kao i interakcija sa drugim molekulima, koji mogu biti ciljna mesta delovanja hormona, mogu biti odgovorni za promene aktivnosti eN koje su uočene nakon ponovljenih tretmana hormonima.

## **5. Potencijalne polne specifičnosti u metabolizmu vanćelijskih adeninskih nukleotida u hipokampusu**

Dosadašnji rezultati istraživanja metabolizma vanćelijskih adeninskih nukleotida u CNS ukazuju na to da se komponente adenozienskog sistema razlikuju među polovima, po svojoj koncentraciji, ekspresiji, distribuciji (Kovacs i sar., 2011). Zbog postojanja navedenih razlika moguće je da nukleotidi i nukleozidi imaju važnu ulogu u polno-specifičnim adaptacijama mozga u odgovoru na različite stimulse, međutim neophodna su dodatna istraživanja na ovom polju kako bi se eventualne polne razlike potvrdile ili opovrgle.

Ukoliko se uporede aktivnosti ispitivanih ektonukleotidaza u frakciji prečišćenih sinaptozoma hipokampusu može se zaključiti da se one razlikuju među polovima. Naime, stepen hidrolize ATP i ADP značajno je niži u sinaptozomima mužjaka u odnosu na

intaktne ženke u ispitivanim fazama estrusnog ciklusa. Stepem hidrolize ATP kod mužjaka odgovara izmerenoj hidrolizi kod OVX ženki, dok je stepen hidrolize ADP skoro dva puta manji, što može biti objašnjeno različitim doprinosima pojedinačnih ektonukleotidaza koje su zadužene za vanćelijsku hidrolizu ATP i ADP, ne samo u neuronima već i u astrocitima koji su funkcionalni partneri sinapsama, a za koje se zna da bogato eksprimiraju NTPD-azu 2 (Wink i sar., 2006).

Nakon tretmana E2, u hipokampalnim sinaptozomima OVX ženki dolazi do povećanja stepena hidrolize ATP i ADP, što može biti posledica povećanja ekspresije NTPD-aza 1 i 2. Suprotno, kod mužjaka je uočen niži nivo hidrolize ATP i ADP nakon tretmana E2, verovatno kao posledica smanjenja relativne količine NTPD-aza 1 i 2 u sinaptičkom odeljku.

Bazalna aktivnost eN u sinaptozomima hipokampusa mužjaka odgovara aktivnosti izmerenoj kod ženki u diestrusnoj fazi ciklusa, ali je mnogo veća u poređenju sa nivoom kod OVX ženki. Takođe, različiti su mehanizmi kojim E2 moduliše/reguliše eN u sinaptozomima mužjaka i ženki pacova. Naime, E2 slobodnom difuzijom ulazi u ćeliju gde aktivira  $ER\alpha$  i dovodi do povećanja relativne količine proteina i aktivnosti eN, dok aktivacija  $ER\beta$ , verovatno alosteričnom modulacijom eN u sinptozomima hipokampusa OVX ženki, dovodi do promena u aktivnosti ovog enzima. Sa druge strane, E2 kod mužjaka, osim aktivacije klasičnih ER, verovatno dovodi do aktivacije i GPR30 i/ili nespecifičnih vezujućih mesta za E2 na membrani ćelija, pri čemu smanjuje i stepen hidrolize ATP i ADP koji su kompetitivni inhibitori eN i na taj način moduliše aktivnost eN, a bez promena u ekspresiji proteina.

Razlike u efektima E2 među polovima verovatno leže u različitim intrahipokampalnim koncentracijama E2, koja je mnogo veća kod mužjaka u odnosu na ženke u svim fazama estrusnog ciklusa kao i nakon OVX (Hojo i sar., 2009; Kato i sar., 2013). Dalje, razlike mogu biti posledica i različitog metabolizma E2 kod mužjaka i ženki. Kao što je već navedeno u prethodnim delovima teksta, kod gonadektomisanih ženki, primenjena doza E2 dovodi do pojave nadfiziološke koncentracije E2 u cirkulaciji, koji se metaboliše 24 h nakon aplikacije (Wooley i McEwen, 1993), za razliku od mužjaka, kod kojih se nakon apliciranja iste doze E2, povećana koncentracija ovog hormona zadržava u

circulaciji i nakon 24 h (Obradovic i sar., 2014). Razlike u efektima E2 između mužjaka i ženki mogu biti rezultat izraženih razlika u morfologiji i fiziologiji hipokampusa koji su posledica polne diferencijacije mozga tokom pre- i postnatalnog perioda razvića (pregled u Gillies i McArthur, 2010).

Pored frakcije prečišćenih sinaptozoma, u eksperimentima je korišćena i totalna membranska frakcija koja pored sinaptozoma sadrži i membrane neurona i astrocita, ali i fragmente ostalih ćelija CNS. Skoro 2,5 puta veća aktivnost eN izmerena je u totalnim membranama hipokampusa mužjaka pacova u odnosu na ženke u disetrusnoj fazi ciklusa što se razlikuje od rezultata u frakciji prečišćenih sinaptozoma. Ova razlika u specifičnim aktivnostima eN može se pripisati astrocitima koji čine bar trećinu totalne membranske frakcije, a koji u velikoj meri ekspimiraju eN.

Na kraju, može se reći da su ispitivane ektonukleotidaze u hipokampusu mužjaka i ženki pacova regulisane/modulisane  $17\beta$ -estradiolom. Pošto se nivo hidrolize adeninskih nukleotida nije promenio nakon GDX u sinaptozomima hipokampusa mužjaka pacova, može se zaključiti da aktivnost ektonukleotidza koje su zadužene za vanćelijsku hidrolizu ATP, ADP i AMP nisu pod kontrolom testosterona i DHT poreklom iz gonada mužjaka. Takođe, intrahipokampalna koncentracija muških polnih hormona značajno opada nakon GDX, dok se koncentracija E2 ne menja značajno (Hojo i sar., 2009). Zato se može pretpostaviti da su ektonukleotidaze u sinapsama hipokampusa oba pola, regulisane E2 ili samim procesima koje E2 inicira. Egzogeno aplicirani E2 aktivira različite mehanizme i izaziva suprotne efekte na nivou enzima koji učestvuju u vanćelijskom metabolizmu adeninskih nukleotida u hipokampusu mužjaka i OVX ženki pacova, a šta je u osnovi ovih razlika i da li polne razlike zaista postoje, ostaje predmet daljih istraživanja.



# VI ZAKLJUČCI

Saglasno postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije i dobijenim rezultatima izvedeni su sledeći zaključci:

1. Aktivnost i ekspresija ektonukleotidaza u sinaptičkim odeljcima hipokampusa ženki pacova pod regulatornom su kontrolom endogenih hormona jajnika. Na ovaj zaključaj jasno ukazuju sledeći nalazi:

- Aktivnost ispitivanih ektonukleotidaza, NTPD-aza 1-3 i eN, u sinaptozomima hipokampusa ženki pacova diskretno fluktura tokom estrusnog ciklusa: hidroliza ATP i ADP najintenzivnija je u estrusu, dok je hidroliza AMP najveća u diestrusu kada je ekspresija eN proteina najniža;
- Uklanjanje jajnika kao primarnog izvora ženskih polnih hormona, smanjuje aktivnost ektonukleotidaza, odnosno hidrolizu ATP, ADP i AMP u sinaptozomima hipokampusa ženki. Uočena razlika u hidrolizi AMP između OVX i ženki u diestrusu, a bez promene u količini proteina, posledica je promena kinetičkih parametara: nakon OVX afinitet eN za supstrat raste, maksimalna brzina enzimske reakcije opada, što za rezultat ima nepromenju enzimsku efikasnost u odnosu na diestrus.
- Jednokratni tretman E2 povećava ekspresiju NTPD-aze 1, NTPD-aze 2 i eN u sinaptozomima hipokampusa OVX ženki, a ne utiče na ekspresiju NTPD-aze 3;

- Efekti estradiola u regulaciji eN posredovani su koordinisanom aktivnošću unutarćelijskih estradiolskih receptora, ER $\alpha$  i ER $\beta$ . Aktivacija ER $\alpha$ , stimuliše aktivnost i proteinsku ekspresiju eN, dok aktivacija ER $\beta$  dovodi do povećanja aktivnosti eN, verovatno direktnom interakcijom ovih proteina i alosternom modulacijom eN.
2. E2 moduliše vanćelijski metabolizam adeninskih nukleotida u sinaptozomima hipokampusu mužjaka pacova:
- Nije uočen direktan efekat testosterona i njegovog metabolita DHT u modulaciji/regulaciji vanćelijskog metabolizma adeninskih nukleotida u sinaptozomima hipokampusu mužjaka pacova;
  - E2 smanjuje proteinsku ekspresiju i/ili aktivnost NTPD-aza 1, 2 i eN, ali ne menja relativnu zastupljenost NTPD-aze 3 u sinaptozomima hipokampusu mužjaka.
  - E2 povećava aktivnost TNAP koja razgrađuje ATP i ADP iz sinaptičke pukotine. E2, uprkos smanjenju aktivnosti NTPD-aza, ne izaziva štetnu akumulaciju ovih nukleotida, jer se stimulacijom TNAP efikasno eliminiše višak ATP iz sinaptičke pukotine nastao smanjenjem aktivnosti NTPD-aza 1-2, odnosno višak ADP koji se akumulira usled nepromenjene aktivnosti NTPD-aze 3;
  - E2 ostvaruje kompetitivni tip inhibicije eN, što se zaključuje na osnovu smanjenja afiniteta ovog enzima prema susptratu, uz nepromenjenju maksimalnu aktivnost enzimske reakcije. Postojanje kompetitivne inhibicije aktivnosti eN u prisustvu E2 ukazuje na moguću interakciju E2/eN u membrani;
  - Aktivnost eN je modulirana posredstvom unutarćelijskih ER, ali i pokretanjem mehanizama nezavisnih od ER $\alpha$  i ER $\beta$ .
3. Ponovljeni (sedmodnevni) tretmani estradiolom (E2) i progesteronom (P4) i 17 $\alpha$ -estradiolom (E $\alpha$ ) ne dovode do promena ekspresije eN u hipokampusu mužjaka pacova.
4. Ponovljeni (sedmodnevni) tretmani E2, P4 i E $\alpha$  menjaju ekspresiju eN i metabolizam adeninskih nukleotida u hipokampusu ženki pacova:
- E2 i P4 povećavaju aktivnost eN, uz istovremeno smanjenje ekspresije ovog proteina u hipokampusu OVX ženki pacova;
  - E $\alpha$  ne ostvaruje uticaj na aktivnost/ekspresiju eN ni na jednom ispitivanom nivou.

5. Upoređivanjem efekata hormona na uzorcima muškog i ženskog mozga pacova, nisu utvrđene jasne razlike između polova u pogledu hormonske regulacije ektonukleotidaza u hipokampusu:

- NTPD-aza 1, NTPD-aza 2 i eN su modulirane/regulirane E2, dok NTPD-aza 3 nije pod kontrolom ženskih polnih hormona u sinaptozomima hipokampusa oba pola;
- Efekti E2 na nivou eN su specifični za tip ćelija;
- Uočene razlike među polovima mogu se pripisati različitim mehanizmima kojima E2 ostvaruje svoje efekte na ektonukleotidaze u sinaptozomima hipokampusa, a koji verovatno zavise od intrahipokampalne koncentracije i različitog metabolizma E2 kod ženki i mužjaka.

Na osnovu svega izloženog može se reći da su ispitivane ektonukleotidaze u sinaptičkim odeljcima hipokampusa pod finom i složenom kontrolom endogenih hormona jajnika. Imajući u vidu mnogobrojne uloge vanćelijskog ATP i adenzina kao signalnih molekula, kao i činjenicu da NTPD-aza 1 i eN, pored katalitičke, imaju i funkciju adhezionih molekula, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da bi ispitivani enzimi mogli biti uključeni u procese sinaptičkih rearanžmana i održanju konektivnosti unutar kognitivnih mreža hipokampusa. Takođe, promene u funkcionalnosti ispitivanih enzima, mogu predstavljati jedan od mehanizama adaptacije hipokampusa u odgovoru na mnoga fiziološka i afiziološka stanja koja se odlikuju promenom nivoa ženskih polnih hormona u cirkulaciji (pubertet, trudnoća, menopauza, hirurško uklanjanje jajnika). Takođe, rezultati ukazuju i na moguće mehanizme delovanja i efekte  $17\beta$ -estradiola u zamenskim terapijama oba pola.

## VII LITERATURA

- Abbracchio, M.P., Ceruti, S., 2006. Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. *Purinergic Signal.* 2, 595-604.
- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., Zimmermann, H., 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32, 19-29.
- Abdipranoto, A., Liu, G.J., Werry, E.L., Bennett, M.R., 2003. Mechanisms of secretion of ATP from cortical astrocytes triggered by uridine triphosphate. *Neuroreport.* 14, 2177-81.
- Agresti, C., Meomartini, M.E., Amadio, S., Ambrosini, E., Serafini, B., Franchini, L., Volonte, C., Aloisi, F., Visentin, S., 2005. Metabotropic P2 receptor activation regulates oligodendrocyte progenitor migration and development. *Glia.* 50, 132-44.
- Agteresch, H.J., Dagnelie, P.C., van den Berg, J.W., Wilson, J.H., 1999. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs.* 58, 211-32.
- Akama, K.T., McEwen, B.S., 2003. Estrogen stimulates postsynaptic density-95 rapid protein synthesis via the Akt/protein kinase B pathway. *J Neurosci.* 23, 2333-9.
- Alfinito, P.D., Chen, X., Atherton, J., Cosmi, S., Deecher, D.C., 2008. ICI 182,780 penetrates brain and hypothalamic tissue and has functional effects in the brain after systemic dosing. *Endocrinology.* 149, 5219-26.
- Amaral, D.G., Witter, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 31, 571-91.
- Arevalo, M.A., Azcoitia, I., Gonzalez-Burgos, I., Garcia-Segura, L.M., 2015. Signaling mechanisms mediating the regulation of synaptic plasticity and memory by estradiol. *Horm Behav.* 74, 19-27.
- Augusto, E., Matos, M., Sevigny, J., El-Tayeb, A., Bynoe, M.S., Muller, C.E., Cunha, R.A., Chen, J.F., 2013. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated formation of adenosine is critical for the striatal adenosine A2A receptor functions. *J Neurosci.* 33, 11390-9.
- Bailly, Y., Schoen, S.W., Delhaye-Bouchaud, N., Kreutzberg, G.W., Mariani, J., 1995. 5'-nucleotidase activity as a synaptic marker of parasagittal compartmentation in the mouse cerebellum. *J Neurocytol.* 24, 879-90.
- Barker, J.M., Galea, L.A., 2009. Sex and regional differences in estradiol content in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of adult male and female rats. *Gen Comp Endocrinol.* 164, 77-84.

- Bavaresco, L., Bernardi, A., Braganhol, E., Wink, M.R., Battastini, A.M., 2007. Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity in C6 rat glioma cell line. *J Neurooncol.* 84, 1-8.
- Bayer, S.A., 1980. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol.* 190, 87-114.
- Baykov, A.A., Evtushenko, O.A., Avaeva, S.M., 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem.* 171, 266-70.
- Bean, L.A., Kumar, A., Rani, A., Guidi, M., Rosario, A.M., Cruz, P.E., Golde, T.E., Foster, T.C., 2015. Re-Opening the Critical Window for Estrogen Therapy. *J Neurosci.* 35, 16077-93.
- Belcher, S.M., Zsarnovszky, A., Crawford, P.A., Hemani, H., Spurling, L., 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, 1331-46.
- Bernardinelli, Y., Muller, D., Nikonenko, I., 2014. Astrocyte-synapse structural plasticity. *Neural Plast.* 2014, 232105.
- Bianchi, V., Sychala, J., 2003. Mammalian 5'-nucleotidases. *J Biol Chem.* 278, 46195-8.
- Bjelobaba, I., Stojiljkovic, M., Pekovic, S., Dacic, S., Lavrnja, I., Stojkov, D., Rakic, L., Nedeljkovic, N., 2007. Immunohistological determination of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (NTPDase1) and 5'-nucleotidase in rat hippocampus reveals overlapping distribution. *Cell Mol Neurobiol.* 27, 731-43.
- Bjelobaba, I., Stojiljkovic, M., Lavrnja, I., Stojkov, D., Pekovic, S., Dacic, S., Laketa, D., Rakic, L., Nedeljkovic, N., 2009. Regional changes in ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rat. *Gen Physiol Biophys.* 28 Spec No, 62-8.
- Bjelobaba, I., Lavrnja, I., Parabucki, A., Stojkov, D., Stojiljkovic, M., Pekovic, S., Nedeljkovic, N., 2010. The cortical stab injury induces beading of fibers expressing ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3. *Neuroscience.* 170, 107-16.
- Bjelobaba, I., Parabucki, A., Lavrnja, I., Stojkov, D., Dacic, S., Pekovic, S., Rakic, L., Stojiljkovic, M., Nedeljkovic, N., 2011. Dynamic changes in the expression pattern of ecto-5'-nucleotidase in the rat model of cortical stab injury. *J Neurosci Res.* 89, 862-73.
- Bjornstrom, L., Sjoberg, M., 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 19, 833-42.
- Braun, N., Sevigny, J., Robson, S.C., Enjyoji, K., Guckelberger, O., Hammer, K., Di Virgilio, F., Zimmermann, H., 2000. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur J Neurosci.* 12, 4357-66.
- Braun, N., Sevigny, J., Mishra, S.K., Robson, S.C., Barth, S.W., Gerstberger, R., Hammer, K., Zimmermann, H., 2003. Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 17, 1355-64.
- Brisevac, D., Bjelobaba, I., Bajic, A., Clarner, T., Stojiljkovic, M., Beyer, C., Andjus, P., Kipp, M., Nedeljkovic, N., 2012. Regulation of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in cultured cortical astrocytes by different inflammatory factors. *Neurochem Int.* 61, 681-8.
- Burnstock, G., 2004. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol.* 4, 47-52.
- Burnstock, G., 2006. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1, S172-81.
- Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 87, 659-797.
- Burnstock, G., 2009. Purinergic cotransmission. *F1000 Biol Rep.* 1, 46.
- Burnstock, G., Dale, N., 2015. Purinergic signalling during development and ageing. *Purinergic Signal.* 11, 277-305.

- Carroll, J.S., Meyer, C.A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T.R., Eeckhoutte, J., Brodsky, A.S., Keeton, E.K., Fertuck, K.C., Hall, G.F., Wang, Q., Bekiranov, S., Sementchenko, V., Fox, E.A., Silver, P.A., Gingeras, T.R., Liu, X.S., Brown, M., 2006. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet.* 38, 1289-97.
- Cersosimo, M.G., Benarroch, E.E., 2015. Estrogen actions in the nervous system: Complexity and clinical implications. *Neurology.* 85, 263-73.
- Chadwick, B.P., Frischauf, A.M., 1997. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. *Mamm Genome.* 8, 668-72.
- Chen, W., Guidotti, G., 2001. Soluble apyrases release adp during ATP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 282, 90-5.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-9.
- Christoforidis, S., Papamarcaki, T., Galaris, D., Kellner, R., Tsolas, O., 1995. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. *Eur J Biochem.* 234, 66-74.
- Corera, A.T., Doucet, G., Fon, E.A., 2009. Long-term potentiation in isolated dendritic spines. *PLoS One.* 4, e6021.
- Costenla, A.R., Cunha, R.A., de Mendonca, A., 2010. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. *J Alzheimers Dis.* 20 Suppl 1, S25-34.
- Cotman, C.W., Matthews, D.A., 1971. Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes: isolation and partial characterization. *Biochim Biophys Acta.* 249, 380-94.
- Cox, E.T., Brennaman, L.H., Gable, K.L., Hamer, R.M., Glantz, L.A., Lamantia, A.S., Lieberman, J.A., Gilmore, J.H., Maness, P.F., Jarskog, L.F., 2009. Developmental regulation of neural cell adhesion molecule in human prefrontal cortex. *Neuroscience.* 162, 96-105.
- Cunha, R.A., Sebastiao, A.M., Ribeiro, J.A., 1992. Ecto-5'-nucleotidase is associated with cholinergic nerve terminals in the hippocampus but not in the cerebral cortex of the rat. *J Neurochem.* 59, 657-66.
- Cunha, R.A., 2001. Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem Res.* 26, 979-91.
- Cunha, R.A., 2008. Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochem Int.* 52, 65-72.
- Da Silva, R.S., Richetti, S.K., Tonial, E.M., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2012. Profile of nucleotide catabolism and ectonucleotidase expression from the hippocampi of neonatal rats after caffeine exposure. *Neurochem Res.* 37, 23-30.
- Darby, M., Kuzmiski, J.B., Panenka, W., Feighan, D., MacVicar, B.A., 2003. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol.* 89, 1870-7.
- de Paula Cognato, G., Bonan, C.D., 2010. Ectonucleotidases and Epilepsy. *Open Neurosci J.* 4, 44-52.
- Del Puerto, A., Diaz-Hernandez, J.I., Tapia, M., Gomez-Villafuertes, R., Benitez, M.J., Zhang, J., Miras-Portugal, M.T., Wandosell, F., Diaz-Hernandez, M., Garrido, J.J. 2012. Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation. *J Cell Sci.* 125:176- 88.
- Del Puerto, A., Wandosell, F., Garrido, J.J., 2013. Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease. *Front Cell Neurosci.* 7, 197.
- Di Virgilio, F., 2005. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signal.* 1, 205-9.
- Diez-Zaera, M., Diaz-Hernandez, J.I., Hernandez-Alvarez, E., Zimmermann, H., Diaz-Hernandez, M., Miras-Portugal, M.T., 2011. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 22, 1014-24.

- Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Robinson, P.J., 2008. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat Protoc.* 3, 1718-28.
- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 24, 31-55.
- Dykens, J.A., Moos, W.H., Howell, N., 2005. Development of 17alpha-estradiol as a neuroprotective therapeutic agent: rationale and results from a phase I clinical study. *Ann N Y Acad Sci.* 1052, 116-35.
- Eichenbaum, H., 2000. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci.* 1, 41-50.
- Enjyoji, K., Seigny, J., Lin, Y., Frenette, P.S., Christie, P.D., Esch, J.S., 2nd, Imai, M., Edelberg, J.M., Rayburn, H., Lech, M., Beeler, D.L., Csizmadia, E., Wagner, D.D., Robson, S.C., Rosenberg, R.D., 1999. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med.* 5, 1010-7.
- Faivre, E.J., Daniel, A.R., Hillard, C.J., Lange, C.A., 2008. Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol Endocrinol.* 22, 823-37.
- Fenoglio, C., Scherini, E., Vaccarone, R., Bernocchi, G., 1995. A re-evaluation of the ultrastructural localization of 5'-nucleotidase activity in the developing rat cerebellum, with a cerium-based method. *J Neurosci Methods.* 59, 253-63.
- Fester, L., Prange-Kiel, J., Zhou, L., Blittersdorf, B.V., Bohm, J., Jarry, H., Schumacher, M., Rune, G.M., 2012. Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: sexual dimorphism in vivo but not in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 131, 24-9.
- Fields, R.D., Burnstock, G., 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* 7, 423-36.
- Fortress, A.M., Fan, L., Orr, P.T., Zhao, Z., Frick, K.M., 2013. Estradiol-induced object recognition memory consolidation is dependent on activation of mTOR signaling in the dorsal hippocampus. *Learn Mem.* 20, 147-55.
- Frankfurt, M., Luine, V., 2015. The evolving role of dendritic spines and memory: Interaction(s) with estradiol. *Horm Behav.* 74, 28-36.
- Frick, K.M., Kim, J., Tuscher, J.J., Fortress, A.M., 2015. Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learn Mem.* 22, 472-93.
- Geiger, J.D., Nagy, J.I., 1986. Distribution of adenosine deaminase activity in rat brain and spinal cord. *J Neurosci.* 6, 2707-14.
- Gerrow, K., Romorini, S., Nabi, S.M., Colicos, M.A., Sala, C., El-Husseini, A., 2006. A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron.* 49, 547-62.
- Gibbs, R.B., 1998. Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. *Brain Res.* 787, 259-68.
- Gibbs, R.B., 1999. Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. *Brain Res.* 844, 20-7.
- Gillies, G.E., McArthur, S., 2010. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev.* 62, 155-98.
- Glantz, L.A., Gilmore, J.H., Hamer, R.M., Lieberman, J.A., Jarskog, L.F., 2007. Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood. *Neuroscience.* 149, 582-91.

- Gomes, C.V., Kaster, M.P., Tome, A.R., Agostinho, P.M., Cunha, R.A., 2011. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1808, 1380-99.
- Gonzales, K.L., Tetel, M.J., Wagner, C.K., 2008. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha responses to estrogens in the developing rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology.* 149, 4615-21.
- Gould, E., Woolley, C.S., Frankfurt, M., McEwen, B.S., 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci.* 10, 1286-91.
- Grkovic, I., Bjelobaba, I., Nedeljkovic, N., Mitrovic, N., Drakulic, D., Stanojlovic, M., Horvat, A., 2014. Developmental increase in ecto-5'-nucleotidase activity overlaps with appearance of two immunologically distinct enzyme isoforms in rat hippocampal synaptic plasma membranes. *J Mol Neurosci.* 54, 109-18.
- Grkovic, I., Bjelobaba, I., Mitrovic, N., Lavrnja, I., Drakulic, D., Martinovic, J., Stanojlovic, M., Horvat, A., Nedeljkovic, N., 2016. Expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase3 (NTPDase3) in the female rat brain during postnatal development. *J Chem Neuroanat.* 77, 10-18.
- Habib, P., Beyer, C., 2015. Regulation of brain microglia by female gonadal steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 146, 3-14.
- Hajszan, T., Milner, T.A., Leranath, C., 2007. Sex steroids and the dentate gyrus. *Prog Brain Res.* 163, 399-415.
- Hanics, J., Barna, J., Xiao, J., Millan, J.L., Fonta, C., Negyessy, L., 2012. Ablation of TNAP function compromises myelination and synaptogenesis in the mouse brain. *Cell Tissue Res.* 349, 459-71.
- Hansen, K.R., Resta, R., Webb, C.F., Thompson, L.F., 1995. Isolation and characterization of the promoter of the human 5'-nucleotidase (CD73)-encoding gene. *Gene.* 167, 307-12.
- Hara, Y., Waters, E.M., McEwen, B.S., Morrison, J.H., 2015. Estrogen Effects on Cognitive and Synaptic Health Over the Lifecourse. *Physiol Rev.* 95, 785-807.
- Hasegawa, Y., Hojo, Y., Kojima, H., Ikeda, M., Hotta, K., Sato, R., Ooishi, Y., Yoshiya, M., Chung, B.C., Yamazaki, T., Kawato, S., 2015. Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons: Involvement of kinase networks. *Brain Res.* 1621, 147-61.
- Heilbronn, A., Maienschein, V., Carstensen, K., Gann, W., Zimmermann, H., 1995. Crucial role of ecto-5'-nucleotidase in differentiation and survival of developing neural cells. *Neuroreport.* 7, 257-61.
- Heilbronn, A., Zimmermann, H., 1995. 5'-nucleotidase activates and an inhibitory antibody prevents neuritic differentiation of PC12 cells. *Eur J Neurosci.* 7, 1172-9.
- Henke, K., 2010. A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nat Rev Neurosci.* 11, 523-32.
- Hicks-Berger, C.A., Kirley, T.L., 2000. Expression and characterization of human ecto-ATPase and chimeras with CD39 ecto-apyrase. *IUBMB Life.* 50, 43-50.
- Hojo, Y., Hattori, T.A., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H.T., Mukai, H., Morrison, J.H., Janssen, W.G., Kominami, S., Harada, N., Kimoto, T., Kawato, S., 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 865-70.
- Hojo, Y., Higo, S., Ishii, H., Ooishi, Y., Mukai, H., Murakami, G., Kominami, T., Kimoto, T., Honma, S., Poirier, D., Kawato, S., 2009. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology.* 150, 5106-12.
- Hurn, P.D., Macrae, I.M., 2000. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20, 631-52.



- Ivanenkov, V.V., Meller, J., Kirley, T.L., 2005. Characterization of disulfide bonds in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): implications for NTPDase structural modeling. *Biochemistry*. 44, 8998-9012.
- Jacome, L.F., Barateli, K., Buitrago, D., Lema, F., Frankfurt, M., Luine, V.N., 2016. Gonadal Hormones Rapidly Enhance Spatial Memory and Increase Hippocampal Spine Density in Male Rats. *Endocrinology*. 157, 1357-62.
- James, S., Richardson, P.J., 1993. Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J Neurochem*. 60, 219-27.
- Jones, D.R., Schmidt, R.J., Pickard, R.T., Foxworthy, P.S., Eacho, P.I., 2002. Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *J Lipid Res*. 43, 383-91.
- Kalita, K., Szymczak, S., Kaczmarek, L., 2005. Non-nuclear estrogen receptor beta and alpha in the hippocampus of male and female rats. *Hippocampus*. 15, 404-12.
- Kansas, G.S., Wood, G.S., Tedder, T.F., 1991. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol*. 146, 2235-44.
- Kato, A., Hojo, Y., Higo, S., Komatsuzaki, Y., Murakami, G., Yoshino, H., Uebayashi, M., Kawato, S., 2013. Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Front Neural Circuits*. 7, 149.
- Khakh, B.S., Burnstock, G., 2009. The double life of ATP. *Sci Am*. 301, 84-90, 92.
- Kinsley, C.H., Trainer, R., Stafisso-Sandoz, G., Quadros, P., Marcus, L.K., Hearon, C., Meyer, E.A., Hester, N., Morgan, M., Kozub, F.J., Lambert, K.G., 2006. Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm Behav*. 49, 131-42.
- Kiss, D.S., Zsarnovszky, A., Horvath, K., Gyorffy, A., Bartha, T., Hazai, D., Sotonyi, P., Somogyi, V., Frenyo, L.V., Diano, S., 2009. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in the ventral and lateral hypothalamic area of female rats: morphological characterization and functional implications. *Reprod Biol Endocrinol*. 7, 31.
- Knowles, A.F., Chiang, W.C., 2003. Enzymatic and transcriptional regulation of human ecto-ATPase/E-NTPDase 2. *Arch Biochem Biophys*. 418, 217-27.
- Knowles, W.D., 1992. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin Neurophysiol*. 9, 252-63.
- Knowlton, A.A., Lee, A.R., 2012. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. 135, 54-70.
- Koles, L., Kato, E., Hanuska, A., Zadori, Z.S., Al-Khrasani, M., Zelles, T., Rubini, P., Illes, P., 2016. Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glia signalling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems. *Purinergic Signal*. 12, 1-24.
- Kovacs, Z., Juhasz, G., Palkovits, M., Dobolyi, A., Kekesi, K.A., 2011. Area, age and gender dependence of the nucleoside system in the brain: a review of current literature. *Curr Top Med Chem*. 11, 1012-33.
- Kramar, E.A., Chen, L.Y., Brandon, N.J., Rex, C.S., Liu, F., Gall, C.M., Lynch, G., 2009. Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci*. 29, 12982-93.
- Kukulski, F., Komoszynski, M., 2003. Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *Eur J Biochem*. 270, 3447-54.
- Kukulski, F., Levesque, S.A., Lavoie, E.G., Lecka, J., Bigonnesse, F., Knowles, A.F., Robson, S.C., Kirley, T.L., Sevigny, J., 2005. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal*. 1, 193-204.

- Kukulski, F., Levesque, S.A., Seigny, J., 2011. Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Adv Pharmacol.* 61, 263-99.
- Langer, D., Hammer, K., Koszalka, P., Schrader, J., Robson, S., Zimmermann, H., 2008. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res.* 334, 199-217.
- Lavoie, E.G., Kukulski, F., Levesque, S.A., Lecka, J., Seigny, J., 2004. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem Pharmacol.* 67, 1917-26.
- Leranth, C., Petnehazy, O., MacLusky, N.J., 2003. Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J Neurosci.* 23, 1588-92.
- Levin, E.R., 2009. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 20, 477-82.
- Liu, F., Day, M., Muniz, L.C., Bitran, D., Arias, R., Revilla-Sanchez, R., Grauer, S., Zhang, G., Kelley, C., Pulito, V., Sung, A., Mervis, R.F., Navarra, R., Hirst, W.D., Reinhart, P.H., Marquis, K.L., Moss, S.J., Pangalos, M.N., Brandon, N.J., 2008. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci.* 11, 334-43.
- Lohman, A.W., Isakson, B.E., 2014. Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett.* 588, 1379-88.
- Lopes, L.V., Cunha, R.A., Ribeiro, J.A., 1999. Increase in the number, G protein coupling, and efficiency of facilitatory adenosine A2A receptors in the limbic cortex, but not striatum, of aged rats. *J Neurochem.* 73, 1733-8.
- Lovatt, D., Xu, Q., Liu, W., Takano, T., Smith, N.A., Schnermann, J., Tieu, K., Nedergaard, M., 2012. Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 6265-70.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.
- Lu, H., Chen, C., Klaassen, C., 2004. Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. *Drug Metab Dispos.* 32, 1455-61.
- Luine, V., Frankfurt, M., 2013. Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. *Neuroscience.* 239, 34-45.
- Luine, V.N., Jacome, L.F., Maclusky, N.J., 2003. Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats. *Endocrinology.* 144, 2836-44.
- Mani, S.K., Oyola, M.G., 2012. Progesterone signaling mechanisms in brain and behavior. *Front Endocrinol (Lausanne).* 3, 7.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 87, 206-10.
- Mateo, J., Kreda, S., Henry, C.E., Harden, T.K., Boyer, J.L., 2003. Requirement of Cys399 for processing of the human ecto-ATPase (NTPDase2) and its implications for determination of the activities of splice variants of the enzyme. *J Biol Chem.* 278, 39960-8.
- Mazzucco, C.A., Lieblich, S.E., Bingham, B.I., Williamson, M.A., Viau, V., Galea, L.A., 2006. Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Neuroscience.* 141, 1793-800.
- McClellan, J., Nunez, J.L., 2008. 17alpha-Estradiol is neuroprotective in male and female rats in a model of early brain injury. *Exp Neurol.* 210, 41-50.
- Millan, J.L., 2006. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal.* 2, 335-41.

- Milner, T.A., McEwen, B.S., Hayashi, S., Li, C.J., Reagan, L.P., Alves, S.E., 2001. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol.* 429, 355-71.
- Milner, T.A., Ayoola, K., Drake, C.T., Herrick, S.P., Tabori, N.E., McEwen, B.S., Warriar, S., Alves, S.E., 2005. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 491, 81-95.
- Misumi, Y., Ogata, S., Hirose, S., Ikehara, Y., 1990. Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycopospholipid. *J Biol Chem.* 265, 2178-83.
- Moos, W.H., Dykens, J.A., Nohynek, D., Rubinchik, E., Howell, N., 2009. Review of the Effects of 17 alpha-Estradiol in Humans: A Less Feminizing Estrogen With Neuroprotective Potential. *Drug Development Research.* 70, 1-21.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 297, 681-3.
- Murakami, G., Tsurugizawa, T., Hatanaka, Y., Komatsuzaki, Y., Tanabe, N., Mukai, H., Hojo, Y., Kominami, S., Yamazaki, T., Kimoto, T., Kawato, S., 2006. Comparison between basal and apical dendritic spines in estrogen-induced rapid spinogenesis of CA1 principal neurons in the adult hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 351, 553-8.
- Murakami, G., Hojo, Y., Ogiue-Ikeda, M., Mukai, H., Chambon, P., Nakajima, K., Ooishi, Y., Kimoto, T., Kawato, S., 2015. Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus. *Brain Res.* 1621, 133-46.
- Murrin, L.C., Talbot, J.N., 2007. RanBPM, a scaffolding protein in the immune and nervous systems. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2, 290-5.
- Nagata, H., Mimori, Y., Nakamura, S., Kameyama, M., 1984. Regional and subcellular distribution in mammalian brain of the enzymes producing adenosine. *J Neurochem.* 42, 1001-7.
- Nagy, A.K., Shuster, T.A., Delgado-Escueta, A.V., 1986. Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: identification and enzymic characterization. *J Neurochem.* 47, 976-86.
- Nedeljkovic, N., Djordjevic, V., Horvat, A., Nikezic, G., Kanazir, D.T., 2000. Effect of steroid hormone deprivation on the expression of ecto-ATPase in distinct brain regions of female rats. *Physiol Res.* 49, 419-26.
- Nedeljkovic, N., Bjelobaba, I., Subasic, S., Lavrnja, I., Pekovic, S., Stojkov, D., Vjestica, A., Rakic, L., Stojiljkovic, M., 2006. Up-regulation of ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rats. *Cell Biol Int.* 30, 541-6.
- Newman, E.A., 2001. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J Neurosci.* 21, 2215-23.
- Newman, E.A., 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 26, 536-42.
- Nishio, M., Kuroki, Y., Watanabe, Y., 2004. Subcellular localization of estrogen receptor beta in mouse hippocampus. *Neurosci Lett.* 355, 109-12.
- O'Keefe, J., Conway, D.H., 1978. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res.* 31, 573-90.
- Obradovic, M., Stewart, A.J., Pitt, S.J., Labudovic-Borovic, M., Sudar, E., Petrovic, V., Zafirovic, S., Maravic-Stojkovic, V., Vasic, V., Isenovic, E.R., 2014. In vivo effects of 17beta-estradiol on cardiac Na(+)/K(+)-ATPase expression and activity in rat heart. *Mol Cell Endocrinol.* 388, 58-68.
- Ogiue-Ikeda, M., Tanabe, N., Mukai, H., Hojo, Y., Murakami, G., Tsurugizawa, T., Takata, N., Kimoto, T., Kawato, S., 2008. Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons. *Brain Res Rev.* 57, 363-75.

- Ooishi, Y., Kawato, S., Hojo, Y., Hatanaka, Y., Higo, S., Murakami, G., Komatsuzaki, Y., Ogiue-Ikeda, M., Kimoto, T., Mukai, H., 2012. Modulation of synaptic plasticity in the hippocampus by hippocampus-derived estrogen and androgen. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 131, 37-51.
- Pani, A.K., Jiao, Y., Sample, K.J., Smeyne, R.J., 2014. Neurochemical measurement of adenosine in discrete brain regions of five strains of inbred mice. *PLoS One.* 9, e92422.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhatsky, A., North, R.A., 2006. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 452, 589-97.
- Petersen, S.L., Intlekofer, K.A., Moura-Conlon, P.J., Brewer, D.N., Del Pino Sans, J., Lopez, J.A., 2013a. Novel progesterone receptors: neural localization and possible functions. *Front Neurosci.* 7, 164.
- Petersen, S.L., Intlekofer, K.A., Moura-Conlon, P.J., Brewer, D.N., Del Pino Sans, J., Lopez, J.A., 2013b. Nonclassical progesterone signalling molecules in the nervous system. *J Neuroendocrinol.* 25, 991-1001.
- Picher, M., Seigny, J., D'Orleans-Juste, P., Beaudoin, A.R., 1996. Hydrolysis of P2-purinoceptor agonists by a purified ectonucleotidase from the bovine aorta, the ATP-diphosphohydrolase. *Biochem Pharmacol.* 51, 1453-60.
- Plesner, L., 1995. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol.* 158, 141-214.
- Potier, M., Georges, F., Brayda-Bruno, L., Ladepeche, L., Lamothe, V., Al Abed, A.S., Groc, L., Marighetto, A., 2015. Temporal Memory and Its Enhancement by Estradiol Requires Surface Dynamics of Hippocampal CA1 N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *Biol Psychiatry.*
- Potter, P.E., White, T.D., 1982. Lack of effect of 6-hydroxydopamine pretreatment on depolarization-induced release of ATP from rat brain synaptosomes. *Eur J Pharmacol.* 80, 143-7.
- Rasooli-Nejad, S., Palygin, O., Lalo, U., Pankratov, Y., 2014. Cannabinoid receptors contribute to astroglial Ca(2)(+)-signalling and control of synaptic plasticity in the neocortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369, 20140077.
- Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A., Reed, J.K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F., 1999. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol.* 59, 663-90.
- Rebola, N., Pinheiro, P.C., Oliveira, C.R., Malva, J.O., Cunha, R.A., 2003. Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res.* 987, 49-58.
- Rebola, N., Rodrigues, R.J., Lopes, L.V., Richardson, P.J., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., 2005. Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. *Neuroscience.* 133, 79-83.
- Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R.A., Mulle, C., 2008. Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron.* 57, 121-34.
- Robson, S.C., Seigny, J., Zimmermann, H., 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2, 409-30.
- Rodrigues, R.J., Almeida, T., Richardson, P.J., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., 2005. Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 25, 6286-95.
- Rucker, B., Pereira, G.S., Furstenau, C.R., Izquierdo, I., Bonan, C.D., Sarkis, J.J., 2004. Inhibitory avoidance task reveals differences in ectonucleotidase activities between male and female rats. *Neurochem Res.* 29, 2231-7.

- Rucker, B., Pochmann, D., Furstenu, C.R., Carneiro-Ramos, M.S., Battastini, A.M., Barreto-Chaves, M.L., Sarkis, J.J., 2005. Effects of steroid hormones on synaptosomal ectonucleotidase activities from hippocampus and cortex of adult female rats. *Gen Comp Endocrinol.* 140, 94-100.
- Rudick, C.N., Gibbs, R.B., Woolley, C.S., 2003. A role for the basal forebrain cholinergic system in estrogen-induced disinhibition of hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci.* 23, 4479-90.
- Rudolphi, K.A., Schubert, P., Parkinson, F.E., Fredholm, B.B., 1992. Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 4, 346-69.
- Rune, G.M., Frotscher, M., 2005. Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neurosci.* 136, 833-42.
- Sadej, R., Sychala, J., Skladanowski, A.C., 2006. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Res.* 16, 213-22.
- Salgado, A.H., Prado, M.A., Moraes-Santos, T., Romano-Silva, M.A., Gomez, M.V., 1997. Tityustoxin-induced release of ATP from rat brain cortical synaptosomes. *Neurosci Lett.* 229, 113-6.
- Sawynok, J., Downie, J.W., Reid, A.R., Cahill, C.M., White, T.D., 1993. ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res.* 610, 32-8.
- Scharfman, H.E., MacLusky, N.J., 2014. Differential regulation of BDNF, synaptic plasticity and sprouting in the hippocampal mossy fiber pathway of male and female rats. *Neuropharmacology.* 76 Pt C, 696-708.
- Schicker, K., Hussl, S., Chandaka, G.K., Kosenburger, K., Yang, J.W., Waldhoer, M., Sitte, H.H., Boehm, S., 2009. A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. *Biochim Biophys Acta.* 1793, 325-34.
- Schoen, S.W., Graeber, M.B., Toth, L., Kreutzberg, G.W., 1988. 5'-Nucleotidase in postnatal ontogeny of rat cerebellum: a marker for migrating nerve cells? *Brain Res.* 467, 125-36.
- Schulte am Esch, J.S.A., Sevigny, J., Kaczmarek, E., Siegel, J.B., Imai, M., Koziak, K., Beaudoin, A.R., Robson, S.C., 1999. Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. *Biochemistry* 38: 2248-252.
- 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, C281-3.
- Sebastian-Serrano, A., de Diego-Garcia, L., Martinez-Frailes, C., Avila, J., Zimmermann, H., Millan, J.L., Miras-Portugal, M.T., Diaz-Hernandez, M., 2015. Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase Regulates Purinergic Transmission in the Central Nervous System During Development and Disease. *Comput Struct Biotechnol J.* 13, 95-100.
- Sebastiao, A.M., Assaife-Lopes, N., Diogenes, M.J., Vaz, S.H., Ribeiro, J.A., 2011. Modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) actions in the nervous system by adenosine A(2A) receptors and the role of lipid rafts. *Biochim Biophys Acta.* 1808, 1340-9.
- Sellers, K., Raval, P., Srivastava, D.P., 2015a. Molecular signature of rapid estrogen regulation of synaptic connectivity and cognition. *Front Neuroendocrinol.* 36, 72-89.
- Sellers, K.J., Erli, F., Raval, P., Watson, I.A., Chen, D., Srivastava, D.P., 2015b. Rapid modulation of synaptogenesis and spinogenesis by 17beta-estradiol in primary cortical neurons. *Front Cell Neurosci.* 9, 137.
- Sevigny, J., Sundberg, C., Braun, N., Guckelberger, O., Csizmadia, E., Qawi, I., Imai, M., Zimmermann, H., 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, 2801-9.
- Sheng, M., Kim, E., 2011. The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.

- Shukla, V., Zimmermann, H., Wang, L., Kettenmann, H., Raab, S., Hammer, K., Seigny, J., Robson, S.C., Braun, N., 2005. Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. *J Neurosci Res.* 80, 600-10.
- Singh, M., Su, C., Ng, S., 2013. Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Front Neurosci.* 7, 159.
- Smith, C.C., Vedder, L.C., McMahon, L.L., 2009. Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Psychoneuroendocrinology.* 34 Suppl 1, S130-42.
- Smith, T.M., Kirley, T.L., 1998. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-ATPase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-ATPases1. *Biochim Biophys Acta.* 1386, 65-78.
- Snyder, M.A., Smejkalova, T., Forlano, P.M., Woolley, C.S., 2010. Multiple ERbeta antisera label in ERbeta knockout and null mouse tissues. *J Neurosci Methods.* 188, 226-34.
- Spencer, J.L., Waters, E.M., Romeo, R.D., Wood, G.E., Milner, T.A., McEwen, B.S., 2008. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol.* 29, 219-37.
- Spychala, J., Mitchell, B.S., Barankiewicz, J., 1997. Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase, and 5'-nucleotidase. *J Immunol.* 158, 4947-52.
- Spychala, J., Zimmermann, A.G., Mitchell, B.S., 1999. Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter. Role of the camp response element site in mediating repression by the upstream regulatory region. *J Biol Chem.* 274, 22705-12.
- Spychala, J., Lazarowski, E., Ostapkowicz, A., Ayscue, L.H., Jin, A., Mitchell, B.S., 2004. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10, 708-17.
- Srivastava, D.P., Woolfrey, K.M., Jones, K.A., Shum, C.Y., Lash, L.L., Swanson, G.T., Penzes, P., 2008. Rapid enhancement of two-step wiring plasticity by estrogen and NMDA receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 14650-5.
- Srivastava, D.P., 2012. Two-step wiring plasticity--a mechanism for estrogen-induced rewiring of cortical circuits. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 131, 17-23.
- Stanojevic, I., Bjelobaba, I., Nedeljkovic, N., Drakulic, D., Petrovic, S., Stojiljkovic, M., Horvat, A., 2011. Ontogenetic profile of ecto-5'-nucleotidase in rat brain synaptic plasma membranes. *Int J Dev Neurosci.* 29, 397-403.
- Stanojlovic, M., Gusevac, I., Grkovic, I., Mitrovic, N., Zlatkovic, J., Horvat, A., Drakulic, D., 2015a. Repeated Estradiol Treatment Attenuates Chronic Cerebral Hypoperfusion-Induced Neurodegeneration in Rat Hippocampus. *Cell Mol Neurobiol.*
- Stanojlovic, M., Zlatkovic, J., Gusevac, I., Grkovic, I., Mitrovic, N., Zaric, M., Horvat, A., Drakulic, D., 2015b. Repeated low-dose 17beta-estradiol treatment prevents activation of apoptotic signaling both in the synaptosomal and cellular fraction in rat prefrontal cortex following cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 83-84, 1-8.
- Su, C., Cunningham, R.L., Rybalchenko, N., Singh, M., 2012. Progesterone increases the release of brain-derived neurotrophic factor from glia via progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1)-dependent ERK5 signaling. *Endocrinology.* 153, 4389-400.
- Sudhof, T.C., 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature.* 375, 645-53.

- Swanson, L.W., 1982. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull.* 9, 321-53.
- Tabatadze, N., Smejkalova, T., Woolley, C.S., 2013. Distribution and posttranslational modification of synaptic ERalpha in the adult female rat hippocampus. *Endocrinology.* 154, 819-30.
- Tan, O., Fadiel, A., Chang, A., Demir, N., Jeffrey, R., Horvath, T., Garcia-Segura, L.M., Naftolin, F., 2009. Estrogens regulate posttranslational modification of neural cell adhesion molecule during the estrogen-induced gonadotropin surge. *Endocrinology.* 150, 2783-90.
- Terrian, D.M., Hernandez, P.G., Rea, M.A., Peters, R.I., 1989. ATP release, adenosine formation, and modulation of dynorphin and glutamic acid release by adenosine analogues in rat hippocampal mossy fiber synaptosomes. *J Neurochem.* 53, 1390-9.
- Tetel, M.J., Auger, A.P., Charlier, T.D., 2009. Who's in charge? Nuclear receptor coactivator and corepressor function in brain and behavior. *Front Neuroendocrinol.* 30, 328-42.
- Toran-Allerand, C.D., 2005. Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol. *Ann N Y Acad Sci.* 1052, 136-44.
- Toran-Allerand, C.D., Tinnikov, A.A., Singh, R.J., Nethrapalli, I.S., 2005. 17alpha-estradiol: a brain-active estrogen? *Endocrinology.* 146, 3843-50.
- Tuscher, J.J., Luine, V., Frankfurt, M., Frick, K.M., 2016. Estradiol-Mediated Spine Changes in the Dorsal Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex of Ovariectomized Female Mice Depend on ERK and mTOR Activation in the Dorsal Hippocampus. *J Neurosci.* 36, 1483-9.
- Vivar, O.I., Zhao, X., Saunier, E.F., Griffin, C., Mayba, O.S., Tagliaferri, M., Cohen, I., Speed, T.P., Leitman, D.C., 2010. Estrogen receptor beta binds to and regulates three distinct classes of target genes. *J Biol Chem.* 285, 22059-66.
- Vollmayer, P., Koch, M., Braun, N., Heine, P., Servos, J., Israr, E., Kegel, B., Zimmermann, H., 2001. Multiple ecto-nucleotidases in PC12 cells: identification and cellular distribution after heterologous expression. *J Neurochem.* 78, 1019-28.
- Vongtau, H.O., Lavoie, E.G., Sevigny, J., Molliver, D.C., 2011. Distribution of ecto-nucleotidases in mouse sensory circuits suggests roles for nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3 in nociception and mechanoreception. *Neuroscience.* 193, 387-98.
- Vorhoff, T., Zimmermann, H., Pelletier, J., Sevigny, J., Braun, N., 2005. Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signal.* 1, 259-70.
- Wang, T.F., Guidotti, G., 1998. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res.* 790, 318-22.
- Watanabe, G., Taya, K., Sasamoto, S., 1990. Dynamics of ovarian inhibin secretion during the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol.* 126, 151-7.
- Weiland, N.G., 1992. Estradiol selectively regulates agonist binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the CA1 region of the hippocampus. *Endocrinology.* 131, 662-8.
- White, T.D., 1977. Direct detection of depolarisation-induced release of ATP from a synaptosomal preparation. *Nature.* 267, 67-8.
- Wink, M.R., Braganhol, E., Tamajusuku, A.S., Casali, E.A., Karl, J., Barreto-Chaves, M.L., Sarkis, J.J., Battastini, A.M., 2003. Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem Int.* 43, 621-8.
- Wink, M.R., Braganhol, E., Tamajusuku, A.S., Lenz, G., Zerbini, L.F., Libermann, T.A., Sevigny, J., Battastini, A.M., Robson, S.C., 2006. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience.* 138, 421-32.

- Witter, M.P., Groenewegen, H.J., Lopes da Silva, F.H., Lohman, A.H., 1989. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol.* 33, 161-253.
- Woolley, C.S., Gould, E., Frankfurt, M., McEwen, B.S., 1990. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 10, 4035-9.
- Woolley, C.S., McEwen, B.S., 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci.* 12, 2549-54.
- Woolley, C.S., McEwen, B.S., 1993. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol.* 336, 293-306.
- Wu, H.Y., Opperman, K., Kaboord, B., 2012. Method to isolate functional synaptosomes: Enrich neuronal synaptic proteins while maintaining phosphoprotein integrity. *Piercenet.E.pub.*
- Wu, Y., Sun, X., Kaczmarek, E., Dwyer, K.M., Bianchi, E., Usheva, A., Robson, S.C., 2006. RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. *Biochem J.* 396, 23-30.
- Yamamoto, T., Geiger, J.D., Daddona, P.E., Nagy, J.I., 1987. Subcellular, regional and immunohistochemical localization of adenosine deaminase in various species. *Brain Res Bull.* 19, 473-84.
- Zadran, S., Qin, Q., Bi, X., Zadran, H., Kim, Y., Foy, M.R., Thompson, R., Baudry, M., 2009. 17-Beta-estradiol increases neuronal excitability through MAP kinase-induced calpain activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 21936-41.
- Zelinski, D.P., Zantek, N.D., Walker-Daniels, J., Peters, M.A., Taparowsky, E.J., Kinch, M.S., 2002. Estrogen and Myc negatively regulate expression of the EphA2 tyrosine kinase. *J Cell Biochem.* 85, 714-20.
- Zhong, X., Malhotra, R., Woodruff, R., Guidotti, G., 2001. Mammalian plasma membrane ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, CD39, is not active intracellularly. The N-glycosylation state of CD39 correlates with surface activity and localization. *J Biol Chem.* 276, 41518-25.
- Zhang, J.Q., Cai, WQ., Zhou, DS., Su, BY., 2002. Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. *Brain Res.* 935: 73-85.
- Zimmermann, H., 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 285 ( Pt 2), 345-65.
- Zimmermann, H., 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 49, 589-618.
- Zimmermann, H., 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362, 299-309.
- Zimmermann, H., 2006. Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch.* 452, 573-88.
- Zimmermann, H., Zebisch, M., Strater, N., 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* 8, 437-502.
- Zwain, I.H., Yen, S.S., 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140, 3843-852.



# VIII PRILOZI

# 17 $\beta$ -ESTRADIOL UPREGULATES ECTO-5'-NUCLEOTIDASE (CD73) IN HIPPOCAMPAL SYNAPTOSOMES OF FEMALE RATS THROUGH ACTION MEDIATED BY ESTROGEN RECEPTOR- $\alpha$ AND - $\beta$

N. MITROVIĆ,<sup>a</sup> M. ZARIĆ,<sup>a</sup> D. DRAKULIĆ,<sup>a</sup>  
J. MARTINOVIĆ,<sup>a</sup> M. STANOJLOVIĆ,<sup>a</sup> J. SÉVIGNY,<sup>b,c</sup>  
A. HORVAT,<sup>a</sup> N. NEDELJKOVIĆ<sup>d</sup> AND I. GRKOVIĆ<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Biology and Endocrinology, VINČA Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike Petrovića Alasa 12-14, 11001 Belgrade, Serbia

<sup>b</sup> Département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec G1V 0A6, QC, Canada

<sup>c</sup> Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, G1V 4G2 QC, Canada

<sup>d</sup> Institute for Physiology and Biochemistry, Faculty of Biology, University of Belgrade, Studentski trg 3, 11000 Belgrade, Serbia

**Abstract**—17 $\beta$ -Estradiol (E2) crucially affects several processes in the hippocampus of both sexes. E2 acts upon estradiol receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ , influencing target gene expression and/or modulates intracellular signaling cascades. Another potent modulator of hippocampal function is nucleoside adenosine, the final product of ectonucleotidase cascade, enzymes which hydrolyze extracellular ATP to adenosine. The last and rate-limiting step of the hydrolysis is catalyzed by membrane-bound ecto-5'-nucleotidase (eN). Previous findings obtained on adenosine metabolism in brain suggest that eN may be modulated by ovarian steroids. Therefore, the present study reports that the activity and protein abundance of membrane-bound eN fluctuates across the estrus cycle in the hippocampal synaptosomes of female rats. Further, we analyzed the role of E2 and its intracellular receptors on the expression of eN in ovariectomized females. We found that E2 upregulated eN activity and protein abundance in the hippocampal synaptosomes. Application of nonspecific ER antagonist, ICI 182,780 and selective ER $\alpha$  and ER $\beta$  agonists, PPT and DPN, respectively, demonstrated the involvement of both receptor subtypes in observed actions. Selective ER $\alpha$  receptor agonist, PPT, induced upregulation of both the protein level and activity of eN, while application of selective ER $\beta$  receptor agonist,

DPN, increased only the activity of eN. In both cases, E2 entered into the intracellular compartment and activated ER(s), which was demonstrated by membrane impermeable E2-BSA conjugate. Together these results imply that E2-induced effects on connectivity and functional properties of the hippocampal synapses may be in part mediated through observed effect on eN. © 2016 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** ecto-5'-nucleotidase (CD73), 17 $\beta$ -estradiol, estradiol receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , synaptosomes, hippocampus.

## INTRODUCTION

Accumulating data reveal that gonadal steroids have crucial role in the regulation of several processes in the hippocampus including synaptic plasticity, cognition, neuroprotection, hyperalgesia and homeostasis (Spencer et al., 2008; Gillies and McArthur, 2010; Scharfman and MacLusky, 2014). For instance, density of synapses in the CA1 hippocampal field increases at proestrus and decreases after experimentally induced ovariectomy (Frick et al., 2015). Similarly, expression of synaptic proteins, synaptic efficacy and density, synaptogenesis, neurotransmission and hippocampus-dependent learning and memory (Frankfurt and Luine, 2015; Frick et al., 2015; Sellers et al., 2015a) are all affected by circulating or exogenously administered estradiol. Estradiol acts upon several intracellular and plasma membrane estradiol receptors (ERs), including canonical and alternatively transcribed isoforms of ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which affect gene expression (Aenlle et al., 2009), intracellular signaling (Dominguez et al., 2009; Witty et al., 2012; Arevalo et al., 2015) and synaptic plasticity (Frankfurt and Luine, 2015; Frick et al., 2015; Sellers et al., 2015a) in the target cells.

Another potent modulator of hippocampal function is nucleoside adenosine (Sperlagh and Vizi, 2011). It affects neurotransmission, synaptic plasticity, learning and memory (Cunha, 2008; Gomes et al., 2011; Sperlagh and Vizi, 2011; Sebastiao and Ribeiro, 2015) by acting at inhibitory A<sub>1</sub> and facilitatory A<sub>2A</sub> adenosine receptors. Adenosine in the synaptic cleft arises as a final product of extracellular hydrolysis of adenosine triphosphate (ATP). Neurons, together with other cells of the nervous system, are able to synthesize ATP and to pack it in the synaptic vesicles as a co-transmitter (Burnstock, 2007; Sperlagh and Vizi,

\*Corresponding author. Address: Department of Molecular Biology and Endocrinology, VINČA Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike Petrovića Alasa 12-14, 11001 Belgrade, Serbia. E-mail address: istanojevic@vinca.rs (I. Grković).

**Abbreviations:** eN, ecto-5'-nucleotidase; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; E2, 17 $\beta$ -estradiol; ER, estradiol receptors; DPN, 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile; E2-BSA, 17 $\beta$ -estradiol conjugated to bovine serum albumin; ICI 182,780, 7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol; OVX, bilateral ovariectomy; PPT, 1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole; PVDF, polyvinylidene fluoride; DMSO, dimethyl sulfoxide.

2011) or to release it massively in conditions of hypoxia or injury (Burnstock, 2007). Upon the release, ATP modulates synaptic transmission by acting at either ligand-gated P2X channels or G-coupled P2Y receptor and is sequentially catabolized by the action of ectonucleotidases. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDase1-3) hydrolyze ATP to ADP and AMP (Cardoso et al., 2015). The last and rate-limiting step of ATP conversion is catalyzed by ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73), which hydrolyzes AMP to adenosine (Zimmermann, 1992; Zimmermann et al., 2012). The enzyme displays affinity for AMP in low micromolar range and is feed-forward inhibited by high extracellular ATP concentration, which results in a delayed, 'burst-like' production of adenosine (Cunha, 2001). It was shown that synaptically eN-mediated formation of extracellular adenosine is responsible for the local activation of A<sub>2A</sub> receptors (Cunha, 2008; Augusto et al., 2013).

Ecto-5'-nucleotidase is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked membrane-bound glycoprotein, localized in lipid rafts and with the active site facing extracellular compartment. It is associated with the surface of migrating and immature nerve cells during brain development and with a subset of synapses during synaptogenesis and synaptic remodeling (Zimmermann, 1992). In the adult brain, eN is widely expressed (Bjelobaba et al., 2007), predominantly at astrocytes (Cammer et al., 1985; Zimmermann, 1992; Langer et al., 2008; Bjelobaba et al., 2011), although the expression has also been demonstrated in purified hippocampal nerve terminals (Cunha et al., 1992; Grkovic et al., 2014). The enzyme protein is heavily glycosylated at five potential N-glycosylation sites (Misumi et al., 1990), whereas the type and number of glycan molecules attached to the protein core determine the molecular size and kinetics of eN variants in different physiological and pathological conditions (Vogel et al., 1991; Zimmermann, 1992; Cunha et al., 2000; Grkovic et al., 2014; Lavrnja et al., 2015).

The findings obtained on purine metabolism in the brain suggest that eN is a part of complex molecular network which may be modulated by ovarian steroids (Nedeljkovic et al., 2000; Rucker et al., 2005; Kiss et al., 2009). Based on these findings, we hypothesized that estradiol has potential to modulate the activity and expression of eN in hippocampal synapses. In the present study we demonstrated variations in eN activity and protein expression in the hippocampal synaptosomes during the estrous cycle, after ovariectomy and after *in vivo* administration of 17 $\beta$ -estradiol (E2). We have found that regulatory action of E2 is mediated by estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$ .

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Materials

Analytical grade salts and buffer reagents, 17 $\beta$ -estradiol 3-benzoate (E2),  $\beta$ -estradiol 6-(*o*-carboxy-methyl) oxime: bovine serum albumin (E2-BSA), adenosine monophosphate (AMP) were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Estradiol

receptor agonists 1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole (PPT), 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN) and nonselective estrogen receptor antagonist 7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol (ICI 182,780) were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). E2-BSA was filtered before use to eliminate free E2.

### Animals

All experiments were conducted using ten-week-old female Wistar rats (200–250 g) obtained from local colony. Care was taken to minimize the pain and discomfort of used animals (Guide for Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 80-23, Bethesda, MD, U.S.A). Research procedures were approved by Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals of VINČA Institute of Nuclear Sciences, Belgrade, Serbia (Application No. 02/11). Animals were housed (3–4/cage) under standard conditions: 12-h light/dark regime, constant ambient temperature (22  $\pm$  2 °C) and free access to food and water.

### Experimental groups and treatments

Twelve intact females ( $n = 4$ /stage of estrous cycle) were used to assess the fluctuation in eN activity and expression in hippocampal synapses throughout the estrous cycle. The estrous cycle stages were monitored between 9 and 10 am during two weeks and only the animals with regular 4–5 days cycle were included in experiments. Rats were assigned to one of the three estrous stages: proestrus, estrus and diestrus according to relative proportion of epithelial nucleated cells, squamous cells and leukocytes in vaginal smears.

Another group of females was subjected to bilateral ovariectomy (OVX) through one dorsal incision under ketamine (50 mg/kg) s.c. and xylazine (5 mg/kg) s.c. anesthesia. Three weeks after the removal of ovaries, animals were randomly divided into seven groups (6–9 rats/group) and treated as follows: (1) OVX group, without further treatment; (2) control group (Veh), received an injection of DMSO used as a solvent; (3) E2 rats, injected with one dose of 17 $\beta$ -estradiol benzoate (33.3  $\mu$ g/kg); (4) ICI group, injected with a non-selective ER antagonist, ICI 182,780 (2 mg/kg); (5) ICI + E2 group, received an injection of ICI 182,780, 2 h prior to E2 administration (2 mg/kg + 33.3  $\mu$ g/kg); (6) PPT group, received an injection of a selective ER $\alpha$  agonist PPT (2.5 mg/kg); (7) DPN group, received an injection of a selective ER $\beta$  agonist DPN (2.5 mg/kg). Level of circulating E2 rises sharply immediately after administration of indicated dose of E2 and decreases to physiological level within 24 h (Woolley and McEwen, 1993). The doses of ICI 182,780 (Alfinito et al., 2008), PPT and DPN (Mazzucco et al., 2006; Gonzales et al., 2008) were chosen based on the previous studies. The drugs were applied in the morning (9:00 am) and animals were sacrificed 24 h after the treatment.

Uteri were removed after decapitation and weighted without associated fat, to evaluate estrogenic effects of applied treatments. Mean weights are presented in Table 1.

### Synaptosomes preparation

After decapitation with a small animal guillotine (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), hippocampi from the same experimental group (three/group) were pooled for synaptosomal isolation starting with 10 volumes of ice-cold medium (0.32 M sucrose, 5 mM Tris–HCl, pH 7.4) and homogenized in a Teflon/glass homogenizer (clearance 0.20 mm) at 900 rpm. A crude nuclear fraction and cell debris were removed by centrifugation at  $1000\times g$  for 10 min. Collected supernatants were further centrifuged at  $10,000\times g$  for 20 min to obtain crude membrane pellet, and after re-suspension in isolation medium, layered on a discontinuous sucrose-Percoll gradient (consisting 3, 10 and 23% (v/v) of Percoll in a medium containing 0.32 M sucrose and 1 mM EDTA, pH 7.4). The mixture was centrifuged at  $33,500\times g$  for 5 min (Dunkley et al., 2008). The synaptosomes were collected from the interfaces between 10% and 23% Percoll layers and washed in the isolation medium. All steps of preparation were carried out at 4 °C. The samples were prepared fresh-daily or kept at –80. The protein content was determined according to the modified Lowry method (Markwell et al., 1978), using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

### Analysis of gene expression by semi-quantitative RT-PCR

The expression analysis of eN-mRNA was performed by a semiquantitative RT-PCR assay as described previously (Grkovic et al., 2014). In brief, the total RNA extraction from hippocampi of vehicle- and E2-treated OVX females ( $n = 3/\text{group}$ ) were performed using TRIzol reagent (Invitrogen, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. The complementary DNA (cDNA) species were synthesized using First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania), according to the manufacturer's instructions. The cDNAs were amplified using primers designed for the amplification of eN (F: 5'-CCC GGGGGCCACTAGCACCTCA-3'; R: 5'-GCCTGGAC CACGGGAACCTT-3'), together with a housekeeping gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH, F: 5'-AAGGTGAAGGTCCGGAGTCAACG-3'; R: 5'-GGCAGAGATGATGACCCCTTTTGGC-3'). For polymerase chain reaction (PCR), appropriate dilutions of cDNA samples representing 2.5 µg of total RNA were mixed with PCR buffer containing 10 mM deoxyribonucleoside triphosphate, 2.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 µM primers for eN, 0.125 µM primers for GAPDH, and 1-U Taq polymerase (Kapa Biosystems), in a total volume of 25 µl. The cDNAs were amplified for 28 cycles (Thermal Cycler, Eppendorf), using the following conditions: denaturation 94 °C/45 s, annealing 58 °C/1 min, extension 72 °C/1 min, and final extension 72 °C/7 min. The PCR products were analyzed on a 2% agarose gel and visualized under UV light using ethidium bromide. The intensity of PCR products was quantified using *ImageJ* software package. The relative units related to eN were normalized against to respective GAPDH products obtained in the same PCR reaction.

### Ecto-5'-nucleotidase assay

eN assay was carried out in the reaction medium containing 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4 and 10 µg of proteins in a final volume of 200 µl. The reaction was initiated by the addition of 150 µM AMP. Following 30 min of incubation at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 22 µl of 3 M perchloric acid (PCA), chilled on ice and assayed for released inorganic phosphate (Pi) (Baykov et al., 1988). Controls with the addition of prepared enzymes after PCA were used to correct non-enzymatic hydrolysis of the substrates. The optical density was estimated at 650 nm using 96-well plates in a microplate reader (Wallac 1420 VICTOR, Perkin Elmer Instruments, Waltham, MA, USA). Incubation times and protein amounts were chosen in order to ensure the linearity of the reaction. To discard the influence of alkaline phosphatase on AMP hydrolysis, the classical inhibitor of this enzyme, levamisole (1.0 mM), was tested and showed no impact on AMP hydrolysis. Kinetic properties of eN in the presence of increasing AMP concentrations (5–200 µM) were determined in the same reaction mixture.

To evaluate the effect of E2 on synaptic eN activity *in vitro*, we used freshly isolated synaptosomes obtained from hippocampus of individual OVX females ( $n = 4$ ). Synaptosomes were incubated for 10 min at 37 °C with the one of the following treatments: PPT or DPN in concentration of 0.1, 1, 2.5 or 5 µM; E2 or E2–BSA in concentration of free estradiol:  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ , 1 µM. PPT, DPN and E2 were dissolved in ethanol in final concentration of 0.5%, while E2–BSA in Tris–HCl, pH 7.4. Control tubes contained an equivalent amount of final concentration of ethanol alone (0.5% or less) which did not alter enzymatic activities. For E2–BSA probes, control tubes contained an equivalent amount of BSA alone as in the reaction mixtures.

All samples were run in triplicate in six independent determinations, with two independent synaptosome preparations or on freshly isolated synaptosomes gained from individually hippocampi of OVX females. Data are presented as mean activity (nmol Pi/mg/min) ± SEM.

**Table 1.** Estrogenic effects of applied treatments on uterine weight

Treatment	Mean weight (mg) ± SEM
OVX	143 ± 5
OVX + DMSO	148 ± 4
E2	356 ± 16*
ICI	131 ± 5
ICI + E2	130 ± 4
PPT	352 ± 15*
DPN	136 ± 11

\* indicates significant level  $p < 0.001$  compared to OVX group.

### SDS–PAGE and immunoblotting

Equivalent amounts of samples (40 µg of proteins), diluted with Laemmli sample buffer in non-reducing conditions, were resolved on 8% SDS–PAGE electrophoresis and transferred on polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes (0.45 µm, Millipore, Germany) as described previously (Grkovic et al., 2014). After blocking in 5% non-fat milk (NFM) in PBS-T overnight at 4 °C, the membranes were incubated at room temperature with primary rabbit anti-rat eN antibody ((rNu-9I<sub>5</sub>; ectonucleotidases-ab.com), 1:2000 dilution in 2.5% NFM in PBS-T), previously characterized and validated (Fausther et al., 2012). The support membranes were re-probed with goat anti-rat β-actin antibody (1:3000; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), used as a loading control. For immunodetection of the estrogen receptors, rabbit anti-rat ERα (1:1000 in TBS-T) and rabbit anti-rat ERβ (1:500, in TBS-T) were used (both purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Visualization of the bands was performed on X-ray films (AGFA HealthCare NV, Septestraat, Mortsel, Belgium) with the use of chemiluminescence (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore, Darmstadt, Germany), after incubating support membranes in goat anti-rabbit or donkey anti-goat horseradish peroxidase conjugated IgG antibody (1:10,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Bands were scanned by a computer-based laser scanner, while quantification was performed by integrating band areas using *ImageJ* software package. The optical density of eN band was normalized to optical density of β-actin band from the same lane. For each sample, the average of six separate determinations performed on two different synaptosomal preparations was taken as final density (± SEM) of the sample. Quantified data were then expressed relative to mean density obtained for control, arbitrarily defined as 1.0.

### Co-immunoprecipitation

For co-immunoprecipitation, the synaptosomes were resuspended in the immunoprecipitation buffer (IPB; containing in mM: 20 Tris–HCl, pH 7.0, 50 NaCl, 1 EDTA, 1 EGTA, 50 NaF, 1 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.1 PMSF, and 10 µg/ml leupeptin, 4 µg/ml pepstatin and 0.1 Unit/ml aprotinin) with 1% Triton X-100. The samples were sonicated on ice for 30 s, and insoluble material was removed by centrifugation at 4 °C. A sample was collected for determining protein concentration, another was stored at –20 °C as input (positive control) and the rest was processed for IP at a dilution of 1 mg/ml. Protein A Sepharose beads were incubated with the sample for 1 h at 4 °C under rotation to preabsorb any protein that nonspecifically binds to the protein A Sepharose beads. The supernatant was recovered by centrifugation to discard non-solubilized as well as protein A absorbed proteins and 2 µg of anti-ERα antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), anti-ERβ antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) or irrelevant rabbit IgGs (as a negative control) were added and incubated for 3 h at 4 °C under rotation.

To pull-down the immune complexes, samples were then incubated with protein A Sepharose beads for 2 h at 4 °C and centrifuged. The pellets were washed several times in IPB and the input, the supernatant of pulldowns, as well as immunoprecipitates were separated by SDS–PAGE, transferred to PVDF and probed with rabbit anti-rat eN antibody ((rNu-9I<sub>5</sub>), 1:2000 dilution in 2.5% NFM in PBS-T).

### Data analysis

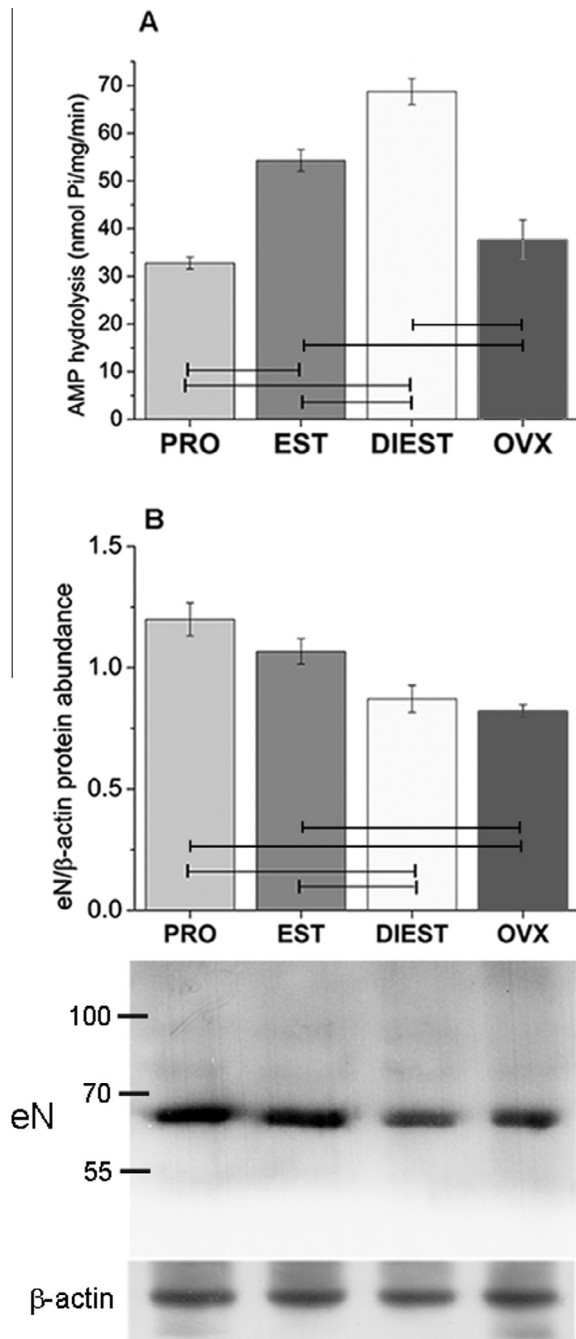
Results are presented as mean ± SEM. Kinetic analysis of eN activity was performed by computer-assisted least square fitting of the data to the Michaelis–Menten equation, while kinetic parameters  $V_{max}$  (apparent maximum activity) and  $K_m$  (apparent Michaelis constant) values were calculated from Eadie-Hofstee semi-reciprocal plot of  $V$  versus  $V/[S]$ , using Origin 8.0 software package. Data from more than one condition were analyzed with a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison *post hoc* test or by Dunnett's *post hoc* test (for comparison with specific controls). The values of  $p < 0.05$  or less were considered statistically significant.

## RESULTS

### Fluctuations of gonadal steroids across the estrus cycle affect activity and expression of eN in hippocampal synaptosomes

The rate of eN activity was assessed in hippocampal synaptosomes isolated from female rats in distinct phases of the estrus cycle. The enzyme activity showed cyclic fluctuations across the estrus cycle ( $[F(2,69) = 69.13, p < 0.001]$ , Fig. 1A). The lowest eN activity was measured at proestrus ( $32.79 \pm 1.25$  nmol Pi/mg/min), whereas twofold higher eN activity was detected at diestrus ( $68.72 \pm 2.72$  nmol Pi/mg/min). The eN protein abundance, on the other hand, showed the opposite pattern of variation (Fig. 1B). The abundance of eN protein in the hippocampal synaptosomes was the highest at proestrus and lowest at diestrus ( $[F(2,27) = 7.789, p < 0.01]$ ). To further assess the role of ovarian steroids, the same measurements were performed in OVX rats (Fig. 1). The overall ANOVA revealed a significant main effect of group (activity  $[F(3,80) = 53.50, p < 0.001]$ , Fig. 1A; protein level  $[F(3,35) = 12.515, p < 0.001]$ , Fig. 1B). It appeared that eN activity in OVX rats ( $37.66 \pm 4.15$  nmol Pi/mg/min,  $p < 0.001$ ) was considerably lower than at diestrus and similar to the activity at proestrus, whereas the protein abundance in OVX and diestrus animals were equivalent. These findings together indicated that the activity and expression of eN in the hippocampal synaptosomes were differentially regulated by the ovarian steroid(s) across the estrus cycle.

Variations in eN activity were further analyzed in respect to the enzyme kinetic properties. The enzyme activity was assayed in the hippocampal synaptosomes, in the presence of raising AMP concentration (5–200 µmol/l). Kinetic parameters,  $V_{max}$  and  $K_m$  were



**Fig. 1.** Activity and expression of eN in the hippocampal synaptosomes across the estrous cycle and after ovariectomy. AMP hydrolysis (A) and eN protein level with a representative immunoblot (B) were determined as described in Material and Methods with 40  $\mu$ g proteins per lane. The data are the mean  $\pm$  SEM. (—)  $p < 0.05$  (or less) indicates differences between estrous cycle groups analyzed with a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison test. Proestrus – PRO; estrous – EST; diestrus – DIEST; ovariectomy – OVX.

calculated from the Eadie-Hofstee transformation of the data from the Michaelis–Menten plots (Table 2). Comparison of the kinetic data obtained for OVX and diestrus animals, revealed that notably lower eN activity in OVX animals was accompanied by twofold higher enzyme substrate affinity, which resulted in comparable

**Table 2.** Kinetic parameters  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $V_{max}/K_m$  for eN activity after OVX

	$K_m$ ( $\mu$ mol/l)	$V_{max}$ (nmol Pi/mg/min)	$V_{max}/K_m$
DIEST	47.44 $\pm$ 4.01	129.85 $\pm$ 5.83	2.73
OVX	26.88 $\pm$ 2.79*	76.41 $\pm$ 2.79*	2.88

\* indicates significance level of  $p < 0.001$  compared to diestrus phase.

catalytic efficiency of enzyme between OVX and diestrus rats.

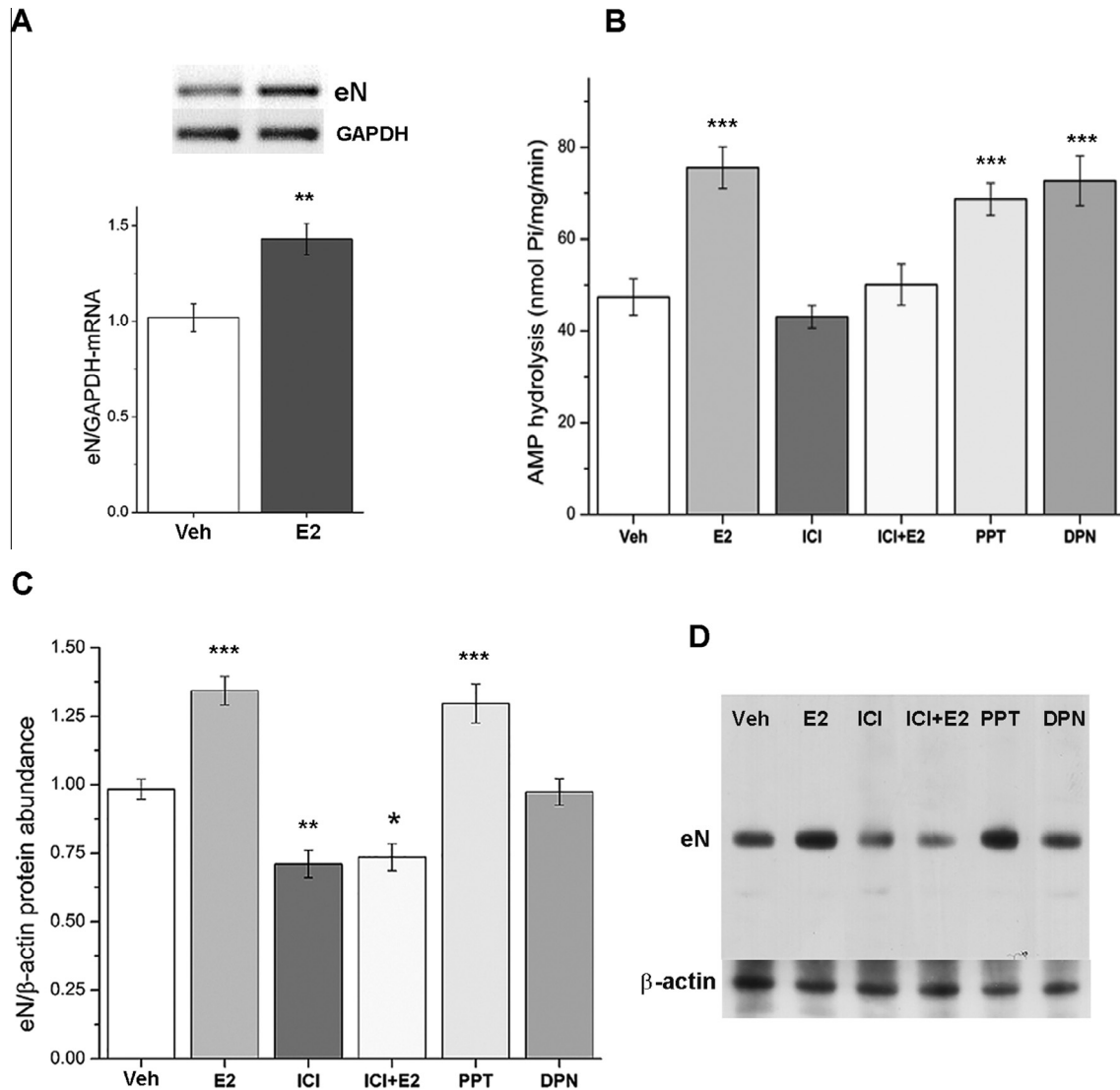
### The role of E2, ER $\alpha$ and ER $\beta$ on the expression of eN in hippocampal synaptosome *in vivo*

To dissect the role of E2 in observed fluctuations of eN across the estrus cycle, the expression analysis was performed in OVX animals treated with a single dose of E2 (33.3  $\mu$ g/kg) (Fig. 2). Fig. 2A shows moderate increase of total eN-mRNA level in the hippocampal region of OVX rats ( $p < 0.01$ ) compared to vehicle-treated OVX controls. In the purified hippocampal synaptosomes, significant increase in the eN activity (75.56  $\pm$  4.53 nmol Pi/mg/min,  $p < 0.001$ , Fig. 2B) and eN protein abundance (136.6  $\pm$  5.2%,  $p < 0.001$ , Fig. 2C) were obtained in rats 24 h after the treatment, compared to vehicle-treated OVX controls.

To assess the role of estradiol receptors in E2-induced upregulation of synaptic eN, the animals were treated systemically with the nonspecific ER antagonist, ICI 182,780, before E2 injection (ICI + E2) (Fig. 2). As shown in Fig. 2B, ICI prevented E2-induced increase of the eN activity, by returning the AMP hydrolysis to the level determined in vehicle-treated control (47.38  $\pm$  3.99 nmol Pi/mg/min), while the modest downregulation of eN expression was observed in both groups (by 25%,  $p < 0.01$  and 28%,  $p < 0.05$ , respectively, Fig. 2C) relative to vehicle-treated control. These data suggest the involvement of ER(s) in observed effects of E2. To further elucidate the involvement of ER(s), animals were treated with the specific ER agonists PPT, which specifically acts upon ER $\alpha$  and DPN, which agonizes the actions of ER $\beta$ . As shown in Fig. 2B, both ER agonists replicated the effect of E2 on the level of eN activity, whereas only PPT induced upregulation of eN protein expression (132.6  $\pm$  7.8%, Fig. 2C). These data suggest that E2, by acting at ER $\alpha$ , upregulates synaptic eN protein abundance, exhibiting the genomic action.

### Role of ER $\alpha$ and ER $\beta$ on the E2-induced eN upregulation *in vitro*

To explain differential effects of ER $\beta$  agonist, DPN, on the activity and expression of eN *in vivo* (Fig. 2), the outcome of same ER agonist treatment was explored *in vitro* (Fig. 3). Hippocampal synaptosomes isolated from OVX animals were incubated with indicated concentration of the agonist for 10 min at 37  $^{\circ}$ C and eN activity was assayed in the same manner as described before. The rate of eN activity was not altered in the synaptosomes incubated with PPT (0.1–5  $\mu$ M) (Fig. 3A), confirming that



**Fig. 2.** *In vivo* effect of estradiol and estradiol receptors on synaptic eN activity and protein level. eN-mRNA level (A) in the hippocampal region from ovariectomized (OVX) female rats after systemic administration of single dose of E2. The AMP hydrolysis (B) and eN protein abundance with representative immunoblot (C, D) were determined in hippocampal synaptosomes obtained from ovariectomized (OVX) female rats after systemic administration of single dose of E2, ICI, ICI + E2, PPT and DPN, as described in Material and Methods. The data are the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate differences to vehicle-treated control (Veh), analyzed with a one-way ANOVA followed by a Dunnett's multiple-comparison test.

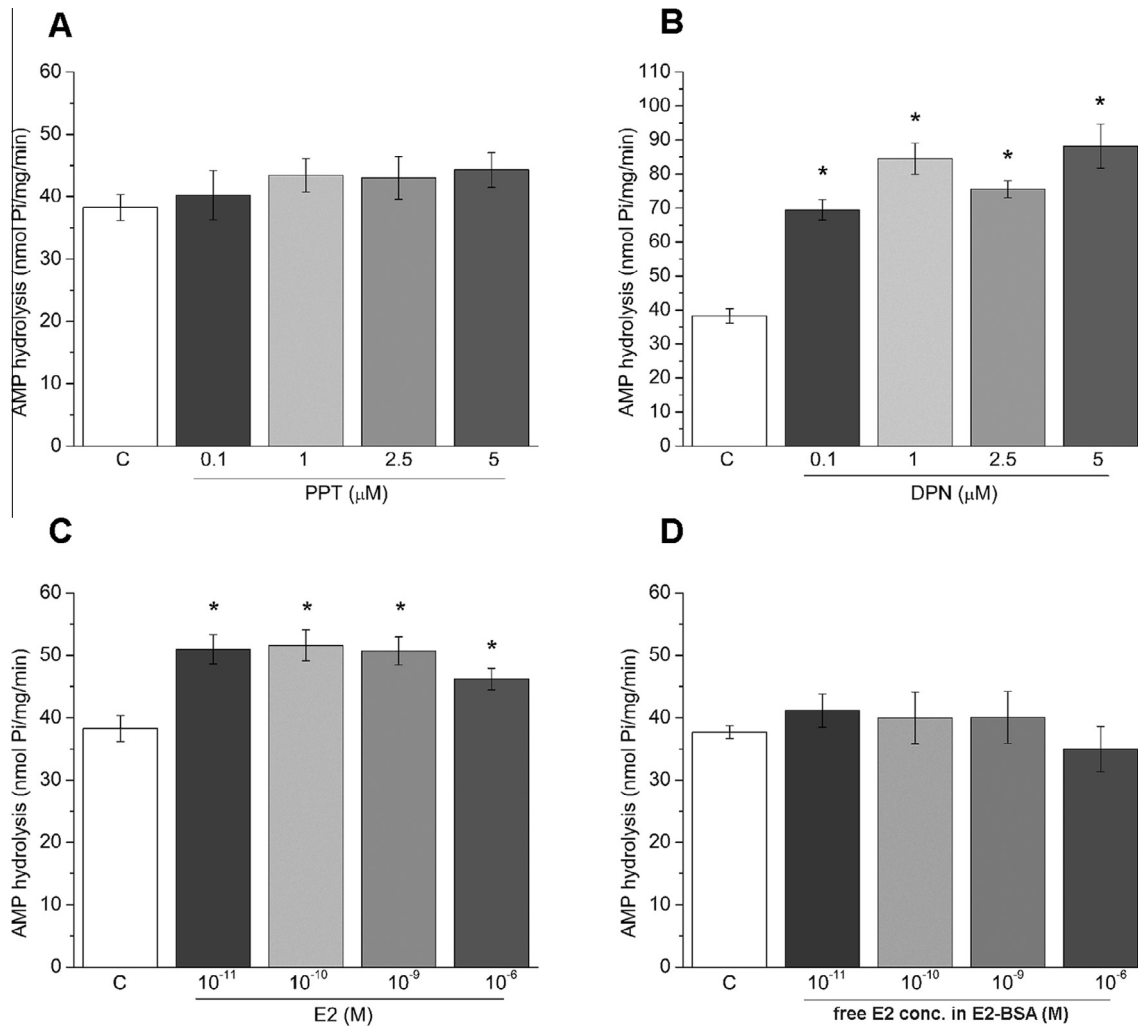
ER $\alpha$ -mediated action of E2 are essentially due to RNA synthesis/transcription. On the other hand, in synaptosomes incubated with DPN, twofold higher eN activity was detected in comparison to vehicle-treated control samples (Fig. 3B). Since synaptosomes are subcellular structures divided of nucleus and *de novo* protein synthesis, these results suggest that ER $\beta$ -mediated E2 action on eN activity was non-genomic in nature and probably induced by a direct allosteric action of E2/ER $\beta$  on eN enzyme protein.

Purified hippocampal synaptosomes were further incubated with E2 *in vitro*. Noticeable increase in eN activity was demonstrated in full range of E2 concentrations tested. The synaptosomes were also incubated with E2-BSA, which is membrane impermeable E2 conjugate. The results shown in Fig. 3D demonstrate that E2-BSA did not exhibit the

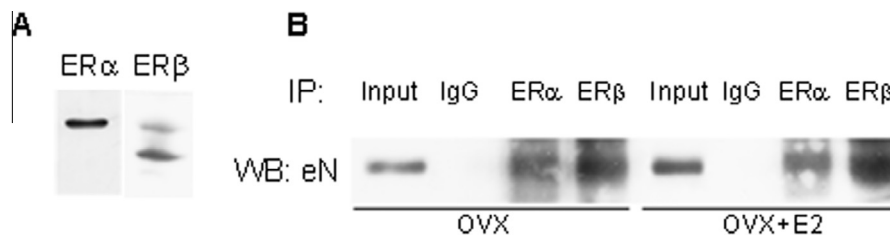
potential to increase eN activity, indicating that E2 must cross the cell membrane to induce both genomic, as well as non-genomic effect on eN.

#### Physical association of eN and ERs in the hippocampal synaptosomes

To test the hypothesis that E2 affects eN activity by direct interaction with the eN membrane protein, we further explored whether ER receptors have ability to establish physical interactions with membrane-bound eN protein. The specificity of the anti-ER $\alpha$  and -ER $\beta$  antibodies in the hippocampal synaptosomes was examined by Western blot analysis. Immunoblotting using primary antibodies against ER $\alpha$ , revealed the presence of one major band at approximately 65 kDa (Fig. 4A), while primary antibodies against ER $\beta$  detected a band at



**Fig. 3.** *In vitro* effects of estradiol and estradiol receptors on synaptic eN activity. The AMP hydrolysis was assessed after incubation of hippocampal synaptosomes obtained from OVX females with various concentrations of (A) PPT, (B) DPN, (C) E2 and (D) E2-BSA. Bars represent mean activity (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM. Data were analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple-comparison *post hoc* test. \* $p < 0.01$  or less, indicates significant difference compared to corresponding control (C).



**Fig. 4.** Physical association of eN and ERs in the hippocampal synaptosomes. (A) ER $\alpha$  and ER $\beta$  protein expression were assessed in hippocampal synaptosomes obtained from OVX females (B) Representative immunoblot of the co-immunoprecipitation of eN with either ER $\alpha$  or ER $\beta$ . Hippocampal synaptosomal lysates were subjected to immunoprecipitation with ER $\alpha$ , ER $\beta$ , or control antibodies (rabbit IgGs), with subsequent immunoblotting of the precipitated fraction with an eN antibody. Input refers to the hippocampal synaptosomal lysate alone before solubilization and immunoprecipitation. Synaptosomes were obtained from either OVX females without or with systemic administration of E2 (OVX + E2), as indicated.

about 50 kDa that corresponded to the ER $\beta$ . Additionally, this antibody sometimes detected one more band at about 65 kDa (Fig. 4A). However, results showed that ER $\beta$ -like protein was present in the synaptosomal fraction as well as ER $\alpha$  (Fig. 4A). Available antibodies

were further used for co-immunoprecipitation analysis, which demonstrated that both ERs establish interaction with eN in the vehicle-treated as well as E2-treated synaptosomes, where the pull-down of ER $\alpha/\beta$  co-immunoprecipitated with eN (Fig. 4B).



## DISCUSSION

A membrane-bound eN is the major enzyme dephosphorylating AMP to adenosine in the central nervous system, and therefore responsible for the last enzymatic step in the formation of extracellular ATP-derived adenosine, which selectively activates  $A_{2A}$  receptors (Augusto et al., 2013). Here, we have shown that the activity and protein abundance of eN, fluctuates across the estrus cycle in the hippocampal synaptosomes of female rats. Thus, together with decreasing levels of estradiol and increasing levels of progesterone in the female hippocampus throughout estrous cycle (Kato et al., 2013), observed increase in the activity of eN indicates efficient production of adenosine. But, only when extracellular levels of ATP and ADP decrease below the threshold of eN inhibition, adenosine is formed in a considerable amount (Cunha, 2001). Since the production of AMP is possibly altered across the estrous cycle, it is difficult to conclude whether the modulated eN activity, which was measured *in vitro*, will or will not result in changed extracellular adenosine *in vivo*. However, reciprocal trends between eN activity and protein level were demonstrated, such that the highest specific activity of the enzyme was detected at diestrus, when the abundance of the enzyme protein was low. It is already demonstrated in several physiological contexts that the rate of eN activity does not necessarily correlate with the enzyme protein abundance (Stanojevic et al., 2011; Brisevac et al., 2012; Da Silva et al., 2012) and that the activity of eN may increase or decrease due to changes in kinetic properties rather than variations in the enzyme abundance. Interestingly, besides hydrolysis of AMP, eN was also reported to function as cell adhesion molecule, involved in recognition, migration, synaptic plasticity and remodeling (Zimmermann, 1992; Zimmermann et al., 2012). Therefore, fluctuations of eN activity across the estrous cycle suggest that subtle alterations of eN may be part of the complex molecular network that effectuates synaptic rearrangements which normally occur during the estrous cycle in rats (Kato et al., 2013). In accordance with the data that level of estradiol in the female hippocampus showed a peak at proestrus and decrease in estrus and diestrus (Kato et al., 2013), our result that synaptic eN protein was the most abundant at proestrus and slightly decreased in estrus and diestrus, indicates that estradiol regulates its synaptic level.

The role of ovarian steroids in the regulation of eN activity and expression was further demonstrated in OVX rats. Although the circulating hormones are depleted, the synthesis of intrahippocampal estradiol (Fester et al., 2012) in OVX females is significant, with level identical to the level at diestrus (Kato et al., 2013). Thus, it is not unexpected that eN protein abundance in the hippocampal synaptosomes of OVX females was comparable with the abundance at diestrus, but with two-fold lower activity due to the changed kinetic parameters. However, catalytic efficiency of enzyme remained unchanged between diestrus and OVX females indicating that adenosine is generated in sufficient amount. In support of this assumption, our preliminary study indicates that  $A_{2A}$  receptors remain unaffected after OVX (unpub-

lished results) while previous report of Augusto and coworkers (2013) showed tight functional association between eN and  $A_{2A}$  receptors.

As our data showed that E2 *per se* increased total eN-mRNA in hippocampal region, we further investigated regulation of eN in the hippocampal synaptosomes after E2 application. E2 upregulated both the activity and protein abundance of eN in the hippocampal synaptosomes. Since both estradiol receptors,  $ER\alpha$  and  $ER\beta$  are present in the synaptosomal fraction (Nishio et al., 2004; Tabatadze et al., 2013; Sellers et al., 2015a,b), we further tested the hypothesis that the E2-induced effects on synaptic eN were mediated through the activation of ER(s). Application of nonspecific ER antagonist ICI 182,780 and selective ERs agonists confirmed the involvement of ERs in the observed actions of E2. It was evidenced that  $ER\alpha$  agonist, PPT, upregulated both the protein abundance and activity of eN. On the other hand,  $ER\beta$  agonist, DPN, affected only the activity, with no effect on eN protein abundance. This suggests that E2 regulates synaptic eN, activating both  $ER\alpha$  and  $ER\beta$ , but through different mechanisms. In both cases, E2 crosses synaptosomal membrane, enters the intracellular compartment and activates ER(s), which was demonstrated with the use of membrane impermeable E2-BSA conjugate (Steviss et al., 1999).

The classic paradigm of ERs function involves binding to specific proximal estrogen responsive elements (EREs) and subsequent gene expression. Ultrastructural localization suggests that  $ER\alpha$  serves as both a genomic and non-genomic transducer of estrogen actions in hippocampal region (Milner et al., 2001, 2005). Although promoter region of eN gene (NT5E) does not contain the specific EREs (Hansen et al., 1995; Spychala et al., 2004), a number of reports documented that  $ER\alpha$  may regulate the activity of AP-1 and Sp1 transcription factors (Jones et al., 2002; Zelinski et al., 2002; Vivar et al., 2010), which are active at NT5E gene promoter (Spychala et al., 1999; Carroll et al., 2006). Therefore, the effects induced by E2 through  $ER\alpha$  most likely involve transcription of NT5E gene, *de novo* synthesis of eN protein and consequent increase in the enzyme activity. The other possible mechanisms of E2 action in this respect include direct activation of multiple kinase pathways, like protein kinase C (Sellers et al., 2015a), which has been shown to increase the expression of eN (Spychala et al., 1997, 1999) as well as specific signal transduction pathways which induces *de novo* local protein synthesis (reviewed in Sellers et al., 2015a).

In contrast to  $ER\alpha$ , activation of  $ER\beta$  resulted in enhanced eN activity, without affecting the synaptic eN protein level. It is believed that  $ER\beta$  largely mediates fast, non-genomic signaling of E2 (Milner et al., 2005).  $ER\beta$  (as well as  $ER\alpha$ ) may be anchored to the plasma membrane and functionally or physically coupled to caveolins, glutamate receptors, receptor tyrosine kinases and non-receptor kinases to activate  $Ca^{2+}$  and NO signaling and initiate different cellular effects (Sellers et al., 2015a). More importantly, since eN is co-expressed with caveolins (Sadej et al., 2006) and localized in lipid rafts,  $ER\beta$  may interact directly with the eN protein to induce

allosteric modification of the enzyme activity (Misumi et al., 1990; Schicker et al., 2009). The intrinsic interaction between eN and ER $\alpha$ / $\beta$  is supported by their exact spatial distribution, as well as by their enrichment and physical proximity in the hippocampal synaptosomes, which were partly documented by co-immunoprecipitation analysis. Since available antibodies against ER $\beta$  also recognize some protein(s) other than known ER $\beta$  variants (Snyder et al., 2010), the results of experiments utilizing these antisera should be taken with appropriate caution and co-immunoprecipitation data might not be completely specific for ER $\beta$ .

It was recently reported that estradiol, via ER $\beta$  (but not ER $\alpha$ ), increases the number of dendritic spines, capable of establish functional synaptic connections (Sellers et al., 2015b). Moreover, signaling through ER $\beta$  induces rapid effects on glutamatergic transmission (Liu et al., 2008; Kramar et al., 2009). Since stimulation of A<sub>2A</sub> receptors by eN-derived adenosine are selectively engaged to assist the implementation of synaptic plastic changes in excitatory synapses (Cunha, 2008) by increasing glutamate release, facilitating NMDA receptor-mediated responses, desensitizing presynaptic inhibitory modulation of systems like A<sub>1</sub> receptors or cannabinoid receptors (Cunha, 2008; Gomes et al., 2011; Sperlagh and Vizi, 2011; Sebastiao and Ribeiro, 2015), observed increased eN activity through ER $\beta$  suggests rapid regulation of synaptic transmission in addition to estrogen-regulation of the number of physical connections between neurons. Activation of A<sub>2A</sub> receptors upon burst-like high-frequency stimulation by increased eN-derived adenosine after estradiol application might facilitate brain-derived neurotrophic factor-induced signaling (Sebastiao et al., 2011) as well as long-term potentiation, contributing to an intracellular cascade that affects synaptic plasticity (Rebola et al., 2008; Costenla et al., 2010), processes that are also mediated by E2 and its receptors (Frankfurt and Luine, 2015; Frick et al., 2015; Arevalo et al., 2015; Sellers et al., 2015a).

In summary, we found that: (a) E2 upregulated eN activity and protein abundance in the hippocampal synaptosomes of female rats; (b) application of nonspecific ER antagonist, ICI 182,780 and selective ER $\alpha$  and ER $\beta$  agonists, PPT and DPN, respectively, demonstrated the involvement of both receptor subtypes in the observed actions; (c) E2 through ER $\alpha$  induced upregulation of both the protein level and activity of eN, while acting through ER $\beta$ , E2 increased only the activity of eN; (d) in both cases, E2 had to enter into the intracellular compartment, to activate ER(s), demonstrated by membrane impermeable E2–BSA conjugate. While the relative contributions of ER $\alpha$  and ER $\beta$  on gene transcription or protein translation awaits further study, reports on the differential effects of ER $\alpha$  and  $\beta$  activation on signaling molecules suggest that each receptor has differential contributions to neuronal physiology, synaptic plasticity and hippocampal-dependent behavior (Frankfurt and Luine, 2015; Frick et al., 2015; Sellers et al., 2015a). Our initial evaluation supports that regulatory estradiol action at the activity and protein abundance of eN is mediated by estrogen

ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the hippocampal synaptosomes. The results further imply that the known effects of E2 on connectivity and functional properties of the hippocampal synapses may be in part mediated through the observed effect on eN, which is the main source of extracellular adenosine.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

*Acknowledgments*—This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia projects Nos 41014 and 173044.

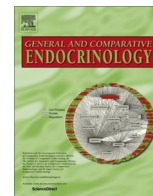
## REFERENCES

- Aenlle KK, Kumar A, Cui L, Jackson TC, Foster TC (2009) Estrogen effects on cognition and hippocampal transcription in middle-aged mice. *Neurobiol Aging* 30:932–945.
- Alfinito PD, Chen X, Atherton J, Cosmi S, Deecher DC (2008) ICI 182,780 penetrates brain and hypothalamic tissue and has functional effects in the brain after systemic dosing. *Endocrinology* 149:5219–5226.
- Arevalo MA, Azcoitia I, Gonzalez-Burgos I, Garcia-Segura LM (2015) Signaling mechanisms mediating the regulation of synaptic plasticity and memory by estradiol. *Horm Behav* 74:19–27.
- Augusto E, Matos M, Sevigny J, El-Tayeb A, Bynoe MS, Muller CE, Cunha RA, Chen JF (2013) Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated formation of adenosine is critical for the striatal adenosine A<sub>2A</sub> receptor functions. *J Neurosci* 33:11390–11399.
- Baykov AA, Evtushenko OA, Avavaeva SM (1988) A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem* 171:266–270.
- Bjelobaba I, Stojiljkovic M, Pekovic S, Dacic S, Lavrnja I, Stojkov D, Rakic L, Nedeljkovic N (2007) Immunohistological determination of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (NTPDase1) and 5'-nucleotidase in rat hippocampus reveals overlapping distribution. *Cell Mol Neurobiol* 27:731–743.
- Bjelobaba I, Parabucki A, Lavrnja I, Stojkov D, Dacic S, Pekovic S, Rakic L, Stojiljkovic M, Nedeljkovic N (2011) Dynamic changes in the expression pattern of ecto-5'-nucleotidase in the rat model of cortical stab injury. *J Neurosci Res* 89:862–873.
- Brisevac D, Bjelobaba I, Bajic A, Clamer T, Stojiljkovic M, Beyer C, Andjus P, Kipp M, Nedeljkovic N (2012) Regulation of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in cultured cortical astrocytes by different inflammatory factors. *Neurochem Int* 61:681–688.
- Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659–797.
- Cammer W, Sacchi R, Kahn S (1985) Immunocytochemical localization of 5'-nucleotidase in oligodendroglia and myelinated fibers in the central nervous system of adult and young rats. *Brain Res* 352:89–96.
- Cardoso AM, Schetinger MR, Correia-de-Sa P, Sevigny J (2015) Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. *Auton Neurosci* 191:25–38.
- Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistfingher TR, Eeckhoutte J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC, Hall GF, Wang Q, Bekiranov S, Sementchenko V, Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, Liu XS, Brown M (2006) Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* 38:1289–1297.
- Costenla AR, Cunha RA, de Mendonca A (2010) Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. *J Alzheimers Dis* 20(Suppl. 1): S25–34.
- Cunha RA (2001) Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem Res* 26:979–991.

- Cunha RA (2008) Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochem Int* 52:65–72.
- Cunha RA, Sebastiao AM, Ribeiro JA (1992) Ecto-5'-nucleotidase is associated with cholinergic nerve terminals in the hippocampus but not in the cerebral cortex of the rat. *J Neurochem* 59:657–666.
- Cunha RA, Brendel P, Zimmermann H, Ribeiro JA (2000) Immunologically distinct isoforms of ecto-5'-nucleotidase in nerve terminals of different areas of the rat hippocampus. *J Neurochem* 74:334–338.
- Da Silva RS, Richetti SK, Tonial EM, Bogo MR, Bonan CD (2012) Profile of nucleotide catabolism and ectonucleotidase expression from the hippocampi of neonatal rats after caffeine exposure. *Neurochem Res* 37:23–30.
- Dominguez R, Hu E, Zhou M, Baudry M (2009) 17Beta-estradiol-mediated neuroprotection and ERK activation require a pertussis toxin-sensitive mechanism involving GRK2 and beta-arrestin-1. *J Neurosci* 29:4228–4238.
- Dunkley PR, Jarvie PE, Robinson PJ (2008) A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat Protoc* 3:1718–1728.
- Fausther M, Lecka J, Soliman E, Kauffenstein G, Pelletier J, Sheung N, Dranoff JA, Sevigny J (2012) Coexpression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 with specific NTPDases differentially regulates adenosine formation in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302:G447–459.
- Fester L, Prange-Kiel J, Zhou L, Blittersdorf BV, Bohm J, Jarry H, Schumacher M, Rune GM (2012) Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: sexual dimorphism *in vivo* but not *in vitro*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 131:24–29.
- Frankfurt M, Luine V (2015) The evolving role of dendritic spines and memory: interaction(s) with estradiol. *Horm Behav* 74:28–36.
- Frick KM, Kim J, Tuscher JJ, Fortress AM (2015) Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learn Mem* 22:472–493.
- Gillies GE, McArthur S (2010) Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev* 62:155–198.
- Gomes CV, Kaster MP, Tome AR, Agostinho PM, Cunha RA (2011) Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1808:1380–1399.
- Gonzales KL, Tetel MJ, Wagner CK (2008) Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha responses to estrogens in the developing rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* 149:4615–4621.
- Grkovic I, Bjelobaba I, Nedeljkovic N, Mitrovic N, Drakulic D, Stanojlovic M, Horvat A (2014) Developmental increase in ecto-5'-nucleotidase activity overlaps with appearance of two immunologically distinct enzyme isoforms in rat hippocampal synaptic plasma membranes. *J Mol Neurosci* 54:109–118.
- Hansen KR, Resta R, Webb CF, Thompson LF (1995) Isolation and characterization of the promoter of the human 5'-nucleotidase (CD73)-encoding gene. *Gene* 167:307–312.
- Jones DR, Schmidt RJ, Pickard RT, Foxworthy PS, Eacho PI (2002) Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *J Lipid Res* 43:383–391.
- Kato A, Hojo Y, Higo S, Komatsuzaki Y, Murakami G, Yoshino H, Uebayashi M, Kawato S (2013) Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Front Neural Circuits* 7:149.
- Kiss DS, Zsarnovszky A, Horvath K, Gyorffy A, Bartha T, Hazai D, Sotonyi P, Somogyi V, Frenyo LV, Diano S (2009) Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in the ventral and lateral hypothalamic area of female rats: morphological characterization and functional implications. *Reprod Biol Endocrinol* 7:31.
- Kramar EA, Chen LY, Brandon NJ, Rex CS, Liu F, Gall CM, Lynch G (2009) Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci* 29:12982–12993.
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* 334:199–217.
- Lavrnja I, Laketa D, Savic D, Bozic I, Bjelobaba I, Pekovic S, Nedeljkovic N (2015) Expression of a second ecto-5'-nucleotidase variant besides the usual protein in symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Mol Neurosci* 55:898–911.
- Liu F, Day M, Muniz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ (2008) Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci* 11:334–343.
- Markwell MA, Haas SM, 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.
- Mazzucco CA, Lieblich SE, Bingham BI, Williamson MA, Viau V, Galea LA (2006) Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Neuroscience* 141:1793–1800.
- Milner TA, McEwen BS, Hayashi S, Li CJ, Reagan LP, Alves SE (2001) Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol* 429:355–371.
- Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warrier S, Alves SE (2005) Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 491:81–95.
- Misumi Y, Ogata S, Hirose S, Ikehara Y (1990) Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycopospholipid. *J Biol Chem* 265:2178–2183.
- Nedeljkovic N, Djordjevic V, Horvat A, Nikezic G, Kanazir DT (2000) Effect of steroid hormone deprivation on the expression of ecto-ATPase in distinct brain regions of female rats. *Physiol Res* 49:419–426.
- Nishio M, Kuroki Y, Watanabe Y (2004) Subcellular localization of estrogen receptor beta in mouse hippocampus. *Neurosci Lett* 355:109–112.
- Rebola N, Lujan R, Cunha RA, Mülle C (2008) Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 57:121–134.
- Rucker B, Pochmann D, Furstenau CR, Carneiro-Ramos MS, Battastini AM, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ (2005) Effects of steroid hormones on synaptosomal ectonucleotidase activities from hippocampus and cortex of adult female rats. *Gen Comp Endocrinol* 140:94–100.
- Sadej R, Spychala J, Skladanowski AC (2006) Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Res* 16:213–222.
- Scharfman HE, MacLusky NJ (2014) Differential regulation of BDNF, synaptic plasticity and sprouting in the hippocampal mossy fiber pathway of male and female rats. *Neuropharmacology* 76:696–708.
- Schicker K, Hussl S, Chandaka GK, Kosenburger K, Yang JW, Waldhoer M, Sitte HH, Boehm S (2009) A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. *Biochim Biophys Acta* 1793:325–334.
- Sebastiao AM, Ribeiro JA (2015) Neuromodulation and metamodulation by adenosine: Impact and subtleties upon synaptic plasticity regulation. *Brain Res* 1621:102–113.
- Sebastiao AM, Assaife-Lopes N, Diogenes MJ, Vaz SH, Ribeiro JA (2011) Modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) actions in the nervous system by adenosine A(2A) receptors and the role of lipid rafts. *Biochim Biophys Acta* 1808:1340–1349.
- Sellers K, Raval P, Srivastava DP (2015a) Molecular signature of rapid estrogen regulation of synaptic connectivity and cognition. *Front Neuroendocrinol* 36:72–89.

- Sellers KJ, Eri F, Raval P, Watson IA, Chen D, Srivastava DP (2015b) Rapid modulation of synaptogenesis and spinogenesis by 17beta-estradiol in primary cortical neurons. *Front Cell Neurosci* 9:137.
- Snyder MA, Smejkalova T, Forlano PM, Woolley CS (2010) Multiple ERbeta antisera label in ERbeta knockout and null mouse tissues. *J Neurosci Methods* 188:226–234.
- Spencer JL, Waters EM, Romeo RD, Wood GE, Milner TA, McEwen BS (2008) Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol* 29:219–237.
- Sperlagh B, Vizi ES (2011) The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and Basal Ganglia: pharmacological and clinical aspects. *Curr Top Med Chem* 11:1034–1046.
- Spychala J, Mitchell BS, Barankiewicz J (1997) Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase, and 5'-nucleotidase. *J Immunol* 158:4947–4952.
- Spychala J, Zimmermann AG, Mitchell BS (1999) Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter. Role of the camp response element site in mediating repression by the upstream regulatory region. *J Biol Chem* 274:22705–22712.
- Spychala J, Lazarowski E, Ostapowicz A, Ayscue LH, Jin A, Mitchell BS (2004) Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:708–717.
- Stanojevic I, Bjelobaba I, Nedeljkovic N, Drakulic D, Petrovic S, Stojiljkovic M, Horvat A (2011) Ontogenetic profile of ecto-5'-nucleotidase in rat brain synaptic plasma membranes. *Int J Dev Neurosci* 29:397–403.
- Stevis PE, Deecher DC, Suhadolnik L, Mallis LM, Frail DE (1999) Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. *Endocrinology* 140:5455–5458.
- Tabatadze N, Smejkalova T, Woolley CS (2013) Distribution and posttranslational modification of synaptic ERalpha in the adult female rat hippocampus. *Endocrinology* 154:819–830.
- Vivar OI, Zhao X, Saunier EF, Griffin C, Mayba OS, Tagliaferri M, Cohen I, Speed TP, Leitman DC (2010) Estrogen receptor beta binds to and regulates three distinct classes of target genes. *J Biol Chem* 285:22059–22066.
- Vogel M, Kowalewski HJ, Zimmermann H, Janetzko A, Margolis RU, Wollny HE (1991) Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata* (electric ray) electric organ. *Biochem J* 278(Pt 1):199–202.
- Witty CF, Foster TC, Semple-Rowland SL, Daniel JM (2012) Increasing hippocampal estrogen receptor alpha levels via viral vectors increases MAP kinase activation and enhances memory in aging rats in the absence of ovarian estrogens. *PLoS One* 7:e51385.
- Woolley CS, McEwen BS (1993) Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol* 336:293–306.
- Zelinski DP, Zantek ND, Walker-Daniels J, Peters MA, Taparowsky EJ, Kinch MS (2002) Estrogen and Myc negatively regulate expression of the EphA2 tyrosine kinase. *J Cell Biochem* 85:714–720.
- Zimmermann H (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285(Pt 2):345–365.
- Zimmermann H, Zebisch M, Strater N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinerg Signal* 8:437–502.

(Accepted 8 March 2016)  
(Available online 14 March 2016)



## Regional and sex-related differences in modulating effects of female sex steroids on ecto-5'-nucleotidase expression in the rat cerebral cortex and hippocampus



Nataša Mitrović<sup>a</sup>, Ivana Guševac<sup>a</sup>, Dunja Drakulić<sup>a</sup>, Miloš Stanojlović<sup>a</sup>, Jelena Zlatković<sup>a</sup>, Jean Sévigny<sup>b,c</sup>, Anica Horvat<sup>a</sup>, Nadežda Nedeljković<sup>d</sup>, Ivana Grković<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Biology and Endocrinology, VINČA Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike Petrovića Alasa 12-14, 11001 Belgrade, Serbia

<sup>b</sup> Département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec G1V 0A6, QC, Canada

<sup>c</sup> Centre de recherche du CHU de Québec, G1V 4G2 QC, Canada

<sup>d</sup> Institute for Physiology and Biochemistry, Faculty of Biology, University of Belgrade, Studentski trg 3, 11000 Belgrade, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 April 2015

Revised 3 November 2015

Accepted 9 June 2016

Available online 11 June 2016

#### Keywords:

Ecto-5'-nucleotidase (eN)

Adenosine

Female gonadal steroid hormones

Sex-related differences

Brain regional response

### ABSTRACT

Ecto-5'-nucleotidase (eN), a membrane rate-limiting enzyme of the purine catabolic pathway, catalyzes the conversion of AMP to adenosine involved in the regulation of many brain physiological and pathological processes. Since gender fundamentally determines hormonal milieu in the body and brain, it is reasonable to assume that sex differences in the activity of various signaling systems, including adenosine, may be generated by gonadal steroids. Thus, we examined expression of eN as a component of adenosine signaling system in the basal state in cerebral cortex and hippocampus of male and female rats at gene, protein and functional level, as well as in the state of gonadal hormone deprivation, induced by ovariectomy (OVX), whereas impact of steroid hormones was explored after repeated administration of 17 $\alpha$ -estradiol, 17 $\beta$ -estradiol and progesterone for seven consecutive days. Results showed regional and sex-related differences in basal eN activity level, with the highest AMP hydrolysis observed in the hippocampus of male rats. Furthermore, ovarian steroids do not contribute to basal gene eN expression or the activity in cortical and hippocampal region of female rats. However, protein eN expression was increased in OVX rats in both investigated region. Investigated exogenous steroids had no influence on eN expression in male brain, while in OVX females alterations in eN activity were induced. The observed effects in female rats were different between examined regions e.g. in cortex, applied treatments predominantly decreased whereas in hippocampus increased eN activity. Based on the presented results, eN exerts regional and sex-related response in basal state as well as after treatment with female gonadal hormones, however the exact mechanisms of sex steroids actions on eN remain unclear and should be fully explored.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Purine nucleoside adenosine acts as potent signaling molecule with critical role in controlling numerous functions in the central nervous system (CNS). It is ubiquitous homeostatic molecule, the key link between brain bioenergetics and neuronal and astrocytic network homeostasis (Diogenes et al., 2014). In the CNS, adenosine also acts as a neuromodulator, controlling the flow of information between neurons mainly acting through its presynaptic inhibitory A<sub>1</sub> receptors (Cunha, 2005; Dunwiddie and Masino, 2001). In conditions of metabolic injury induced by hypoxia, inflammation

or ischemia, adenosine exerts anti-inflammatory and immunosuppressive actions and brings on tissue adaptation, by acting at its A<sub>2</sub>A and A<sub>2</sub>B receptor subtypes (Eltzschig et al., 2013). Adenosine is thus involved in the regulation of many physiological and pathological processes, from regulation of arousal and sleep, learning and memory and neuroprotection to immunomodulation, susceptibility to seizures, psychiatric disorders and neurodegenerative diseases (Boison et al., 2012; Cunha, 2005; Dunwiddie and Masino, 2001; Gomes et al., 2011).

Adenosine in the extracellular space originates either from the intracellular compartment, from which is transported via bi-directional facilitative nucleoside transporters (ENTs) or arises in the extracellular compartment as a final product of extracellular ATP hydrolysis, catalyzed by ectonucleotidases. In the rat brain, the

\* Corresponding author.

E-mail address: [istanojevic@vinca.rs](mailto:istanojevic@vinca.rs) (I. Grković).

ectonucleotidase family comprises ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1-3 (E-NTPDase1-3) and ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase1-3 (E-NPP1-3) which hydrolyze ATP or ADP to AMP, as well as ecto-5'-nucleotidase (eN), that catalyzes the final step of dephosphorylation of AMP to adenosine. eN is the key enzyme in this pathway, since its feed-forward inhibition by ATP and ADP controls the timing and rates of extracellular adenosine formation (Zimmermann, 1992; Zimmermann et al., 2012). Also, it is the predominant enzyme able to dephosphorylate extracellular AMP into adenosine in the brain (Lovatt et al., 2012).

In the adult brain, eN is located at the surface of neurons, astrocyte, microglial and endothelial cells (Bjelobaba et al., 2007, 2011; Cammer et al., 1985; Grkovic et al., 2014; Langer et al., 2008; Stanojevic et al., 2011; Zimmermann, 1992). The enzyme belongs to the cluster of differentiation family (CD73) and functions as cell adhesion molecule implicated in a variety of processes, including cell growth, adhesion, recognition and migration (Vogel et al., 1991; Zimmermann et al., 2012). The enzyme protein is heavily glycosylated at five potential N-glycosylation sites (Misumi et al., 1990), whereas type and the number of glycan molecules attached to the protein core determine the molecular size and kinetics of eN variants in different physiological and pathological conditions (Cunha et al., 2000; Grkovic et al., 2014; Lavrnja et al., 2015; Misumi et al., 1990; Vogel et al., 1991; Zimmermann, 1992).

Previous findings collected on purine metabolism in the brain suggest that components of adenosine signaling system, *i.e.* adenosine levels, transporters, receptors and metabolic enzymes are not evenly distributed in CNS and are modulated by sex and age (Kovacs et al., 2011). The same applies for eN activity in the CNS, which notably increases with age in all brain areas tested so far (Fuchs, 1991; Grkovic et al., 2014; Mackiewicz et al., 2006; Stanojevic et al., 2011) and differs between males and females (de Paula Cognato et al., 2005; Rucker et al., 2004). Moreover, eN is part of complex molecular network which is shown to be under the control of ovarian steroids (Kiss et al., 2009; Nedeljkovic et al., 2000; Rucker et al., 2005). Taken together these data suggest that the effects of adenosine in the CNS vary with age and sex, but it is uncertain whether the differences rely on genetic program or depend on sex differences in physiological parameters, such as circulating gonadal and non-gonadal steroids, or both.

Accumulating experimental and epidemiological data indicate that female gonadal steroids, besides their usual effects in reproductive tissues, modulate a wide variety of functions in the CNS, including development, neurotransmission, synaptic plasticity, learning, memory, mental state and mood as well as neuroprotection in pathological states (Gillies and McArthur, 2010). The ovarian steroids and their metabolic derivatives have been shown to attenuate oxidative injury, inhibit neuroinflammation and excitotoxicity in the brain and protect neurons from cell death in numerous experimental animal models that mimic neuropathological aspects of human dysfunction (Dykens et al., 2005; Habib and Beyer, 2015; Moos et al., 2009). Cellular responses induced by the most potent female gonadal steroids, 17 $\beta$ -estradiol (E2 $\beta$ ) and progesterone (PG), are mediated through their nuclear estrogen (ERs) and progesterone receptors (PRs), which function as transcription factors that selectively modulate gene expression in target cells. Besides these "classical" intracellular receptors, membrane-bound receptors were described to mediate fast, non-genomic cellular responses to E2 $\beta$  and PG (Sellers et al., 2015; Singh et al., 2013). Thus, steroid hormones could alter brain function through a combination of non-genomic and genomic effects on different brain regions, sub-regions and cell types. This raises the possibility that estrogen effects might be pharmacologically separable through the use of selective estrogen response modulators and 17 $\alpha$ -estradiol may be one such compound. The 17 $\alpha$ -estradiol (E2 $\alpha$ ), natural non-gonadal epimer of E2 $\beta$ , operates

via mechanisms independent of classical ERs and elicits a rapid activation of multiple signaling proteins (Dykens et al., 2005; Moos et al., 2009). It is also steroid with potent anti-oxidative and neuroprotective actions in models of neurodegenerative disease and brain damage with less feminizing effects in males (Moos et al., 2009; Toran-Allerand et al., 2005).

All listed steroids are recognized as neurotrophic factors, neuroprotective and psychoprotective agents and estrogen- and progesterone-based therapies are promising for brain disorders that affect both genders (Gillies and McArthur, 2010; Moos et al., 2009; Roof and Hall, 2000). However, less is known about their effects at components of purinergic signaling in the rat brain. Although most data about steroid effects are derived from studies in females, there is rising recognition about their effects in the male CNS. Since biological sex determines the presence and levels of circulating sex hormones, in the view of the roles of adenosine in a regulation of normal and pathological functions in the CNS, the present study is aimed to explore expression of eN with respect to sex aspects and interactions with female steroid hormones in cerebral cortex and hippocampus. Basal expression of eN in investigated brain regions of both sexes was determined at gene, protein and biochemical activity level, whereas effects of female sex steroids were explored after repeated administration of E2 $\alpha$ , E2 $\beta$  and PG for seven consecutive days.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), and were of analytical grade.

### 2.2. Animals

All experiments were conducted using adult male (300–350 g) and female (250–280 g) rats of Wistar strain obtained from local colony. Animal procedures were approved by Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals of VINČA Institute of Nuclear Sciences, Belgrade, Serbia, (02/11) as being in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 80-23). Animals were housed (3–4/cage) under standard conditions: 12 h light/dark regime, constant ambient temperature (22  $\pm$  2  $^{\circ}$ C) and had free access to food and water.

### 2.3. Experimental groups and treatments

In the first part of the experiment, male (n = 9) and female rats (n = 27) were used to assess differences in eN expression associated with its mRNA, protein and functional level related to gender and basal hormonal state. Female rats were subdivided into 3 groups (n = 9/group): one group of females was subjected to bilateral ovariectomy (OVX) through a dorsal incision under ether anesthesia (OVX), second group was sham-operated under the anesthesia, without removal of ovaries (sham) and nine age-matched intact animals in a diestrus were used as a control since circulation levels of both estradiol and progesterone are low in this state of estrus cycle (Smith et al., 1975). OVX and sham animals were left to recover and sacrificed 3 weeks after the surgery.

In the second part of the experiment, another set of males and OVX females was randomly divided into 4 groups (n = 9–12/group) receiving subcutaneous injection of 17 $\beta$ -estradiol (E2 $\beta$ , 33.3  $\mu$ g/kg), 17 $\alpha$ -estradiol (E2 $\alpha$ , 33.3  $\mu$ g/kg), progesterone (PG, 1.7 mg/kg) or equal amount of vehicle (commercial flaxseed oil) for 7 consecutive days. It has been shown that these doses results in physiological serum levels of about  $\sim$ 50 pg/ml for estradiol (physiological is

5–50 pg/ml) and about ~10 ng/ml for progesterone (normal is 7–18 ng/ml) (Barker and Galea, 2009; Gibbs, 1998, 1999). The dose chosen for E2 $\beta$  was also used for E2 $\alpha$  allowing for direct comparison of effects between estrogens. 17 $\alpha$ -estradiol is undetectable in serum, but is found in the brain of adult rodents (Toran-Allerand et al., 2005).

#### 2.4. Analysis of gene expression by semi-quantitative RT-PCR

The gene expression analysis of eN was performed by a semi-quantitative RT-PCR assay as previously described (Grkovic et al., 2014). Briefly, rats were decapitated with a small animal guillotine (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), the brains were removed and cerebral cortices and hippocampi were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen. The total RNA extraction was performed using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions while complementary DNA (cDNA) species were synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). cDNAs were amplified using primers designed for the amplification of eN (F: 5'-CCCGGGGGCCACTAGCACCTCA-3'; R: 5'-GCCTGGACCACGGGAACCTT-3') together with reference gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, F: 5'-AAGGTGAAGTCCGGAGTCAACG-3'; R: 5'-GGCAGAGATGATGACCTTTTGCC-3').

For RT-PCR analysis, appropriate dilutions of cDNA samples representing 2.5  $\mu$ g of total RNA were mixed with PCR buffer containing 10 mM deoxyribonucleoside triphosphate, 2.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 0.25  $\mu$ M primers for eN or 0.125  $\mu$ M primers for GAPDH in total volume of 25  $\mu$ l. Preliminary optimization experiments were carried out to determine amounts of cDNA for non-saturating conditions and number of amplification cycles to achieve linear amplification (30 cycles), under the following conditions: denaturation 94 °C/45 s; annealing 58 °C/1 min; extension 72 °C/1 min; final extension 72 °C/7 min.

PCR products were analyzed on 2% agarose gels together with O'GeneRuler (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) and visualized under UV light using ethidium bromide. The intensity of PCR products was quantified using *ImageJ* software package. The relative units related to the eN were normalized based on respective GAPDH products obtained in same PCR reaction. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM, from at least six separate measurements performed on three different mRNA isolations from three animals per group.

#### 2.5. Preparation of membrane fraction

After decapitation, cerebral cortices and hippocampi from the same experimental group (3 brains/group) were pooled for preparations of crude membrane fraction that contains a bulk of synaptosomes and other membrane fragments, such as glial cells and neuronal membranes (Cotman and Matthews, 1971). Dissected brain tissues, were placed in 10 vol of ice cold isolation buffer (0.32 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) and homogenized in a Teflon/glass homogenizer (clearance 0.20 mm) by 20 gentle up and down strokes at 900 rpm. A crude nuclear fraction and cell debris were removed by centrifugation at 1000g for 10 min. Supernatants were decanted while pellets were additionally re-suspended in the same volume of isolation buffer and centrifuged for a second time under same conditions. Collected supernatants were further centrifuged at 10,000g for 20 min to obtain crude membrane pellet that was finally re-suspended in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4. All steps of preparation were carried out at 4 °C. The protein content was determined using bovine serum albumin as a standard (Markwell et al., 1978).

#### 2.6. Immunoblotting

Rabbit anti-rat ecto-5'-nucleotidase antibody (rNu-9,I<sub>5</sub>) used in this study has been previously characterized and validated (Fausther et al., 2012). Aliquots of the membrane fractions were prepared with Laemmli sample buffer in non-reducing conditions (without  $\beta$ -mercaptoethanol), boiled for 30 min at 37 °C and equivalent amounts (40  $\mu$ g of proteins) were resolved on 8% SDS-PAGE electrophoresis and transferred on polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes (0.45  $\mu$ m, Millipore, Germany). After blocking in 5% non-fat milk (NFM) in PBS-T overnight at 4 °C, the membranes were incubated at room temperature with primary rabbit anti-rat eN antibody (1:1000 dilution in 2.5% NFM in PBS-T, [www.ectonucleotidases-ab.com](http://www.ectonucleotidases-ab.com)). Negative control was performed by the omission of the primary antibody as well as incubation with pre-immune serum (Pre-rNu-9,I<sub>5</sub>) which confirming the specificity of primary antibody. All membranes were re-probed with goat anti-rat  $\beta$ -actin antibody (1:3000; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA,) as a loading control. Visualization of bands was performed on X-ray films (AGFA HealthCare NV, Septestraat, Mortsel, Belgium) with the use of chemiluminescence (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore, Darmstadt, Germany), after incubating the membranes in goat anti-rabbit or donkey anti-goat horseradish peroxidase conjugated IgG antibody (1:10,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Densitometric analysis was performed using *ImageJ* software package while optical density of each eN band was normalized to appropriate optical density obtained for  $\beta$ -actin. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, from at least six separate measurements performed on two or three different membrane fraction isolations.

#### 2.7. eN assay

eN assay was performed in the reaction medium containing 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 and 10  $\mu$ g of proteins in a final volume of 200  $\mu$ l. The reaction was initiated by the addition of 150  $\mu$ M AMP. Following 30 min of incubation at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 22  $\mu$ l of 3 M perchloric acid (PCA), reaction mixtures were than chilled on ice and assayed for released inorganic phosphate (Pi) (Baykov et al., 1988). The supernatant was withdrawn and an aliquot (80  $\mu$ l) was mixed with the 20  $\mu$ l of malachite green reagent (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Controls with the addition of prepared enzymes after PCA were used to correct non-enzymatic hydrolysis of the substrates. The optical densities were estimated at wavelength of 650 nm using 96 well plates positioned in a microplate reader (Wallac 1420 VICTOR, Perkin Elmer Instruments, Waltham, MA, USA). From these optical density values, specific eN activities were calculated using appropriate calibration curve obtained with dilutions of a phosphate standard solution. To discard the influence of alkaline phosphatase on AMP hydrolysis, the classical inhibitor of this enzyme, levamisole (1.0 mM), was tested and had no effect upon AMP hydrolysis. Incubation times and protein concentrations were chosen in order to ensure the linearity of the reaction. All samples were run in triplicate in at least six independent determinations, performed on two or three different membrane preparations. Data are presented as mean activity (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM.

#### 2.8. Data analysis

Results are presented as the mean  $\pm$  SEM. Data with one condition and one variable were analyzed with Student's *t* test. A one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's post hoc test was used to determine the significant changes in investigated expression parameters (mRNA, protein

and functional level): the comparison were performed between vehicle-treated controls and corresponding hormone treated animals, in all experimental groups, using Origin 8.0 software package while  $p < 0.05$  was considered as statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Basal expression of eN in the cerebral cortex and hippocampus

Sex-related differences in basal expression of eN were assessed at mRNA, protein and AMPase activity levels in cortical and hippocampal tissues of intact male and female rats as well as sham and OVX females. Since sham operation did not induce any significant effect on expression of eN, data were not discussed and included in the graphs.

In the cortex, eN expression at mRNA (Fig. 1A), the protein (Fig. 1C) and the biochemical activity levels (Fig. 1E) were comparable between the sexes. In the hippocampal area, a difference was observed at AMPase activity level (Fig. 1F), as males exhibited almost twofold higher basal eN activity ( $82.7 \pm 2.0$  nmol Pi/mg/min,  $p < 0.001$ ) than diestrus female rats ( $43.3 \pm 1.4$  nmol Pi/mg/min).

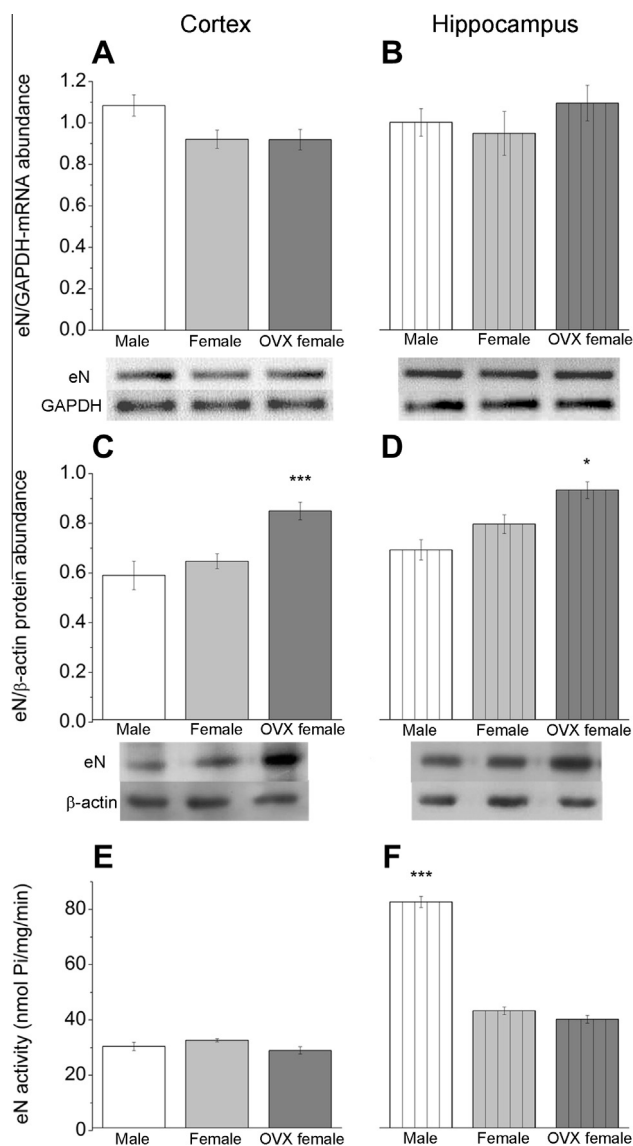
To assess the role of gonadal status in basal expression of eN, the parameters were compared between intact and OVX female rats. As shown in Fig. 1, in both brain areas ovariectomy altered neither mRNA abundance (Fig. 1A, B) neither activity (Fig. 1E, F), while it led to modest up-regulation of eN at the protein level in both cortex ( $31.2 \pm 4.1\%$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 1C) and hippocampus ( $17.6 \pm 3.6\%$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 1D).

#### 3.2. Effect of repeated hormone administration on eN expression in the cerebral cortex

In male rats, administrated sex steroids did not affect cortical expression of eN at any analyzed level (one-way ANOVA: mRNA [ $F(3,20) = 3.089$ ;  $p = 0.050$ ], protein [ $F(3,20) = 2.143$ ;  $p = 0.127$ ], activity [ $F(3,47) = 0.973$ ;  $p = 0.413$ ], Fig. 2A, C, E respectively). In the cerebral cortex of OVX females, the overall ANOVA of eN-mRNA level revealed a significant main effect of group [ $F(3,27) = 8.089$ ;  $p = 0.0004$ , Fig. 2B], but not of eN protein level [ $F(3,27) = 1.131$ ;  $p = 0.354$ , Fig. 2D]. The only exception was PG, which slightly down-regulated mRNA in OVX animals ( $28.9 \pm 5.6\%$ , Tukey's post hoc test  $p < 0.05$ ) in respect to vehicle-treated control (Fig. 2B). In the membranes isolated from OVX females, E2 $\alpha$  and PG produced significant effects at eN activity (one-way ANOVA: [ $F(3,72) = 5.279$ ;  $p = 0.0025$ ], Tukey's post hoc test  $p < 0.05$ ; Fig. 2F), inducing 15–25% decrease in AMP hydrolysis ( $29.5 \pm 1.4$  nmol Pi/mg/min,  $27.5 \pm 1.9$  nmol Pi/mg/min, respectively) compared to vehicle-treated OVX animals ( $36.6 \pm 1.6$  nmol Pi/mg/min), while E2 $\beta$  had no impact on investigated parameter.

#### 3.3. Effect of repeated hormone administration on eN expression in the hippocampus

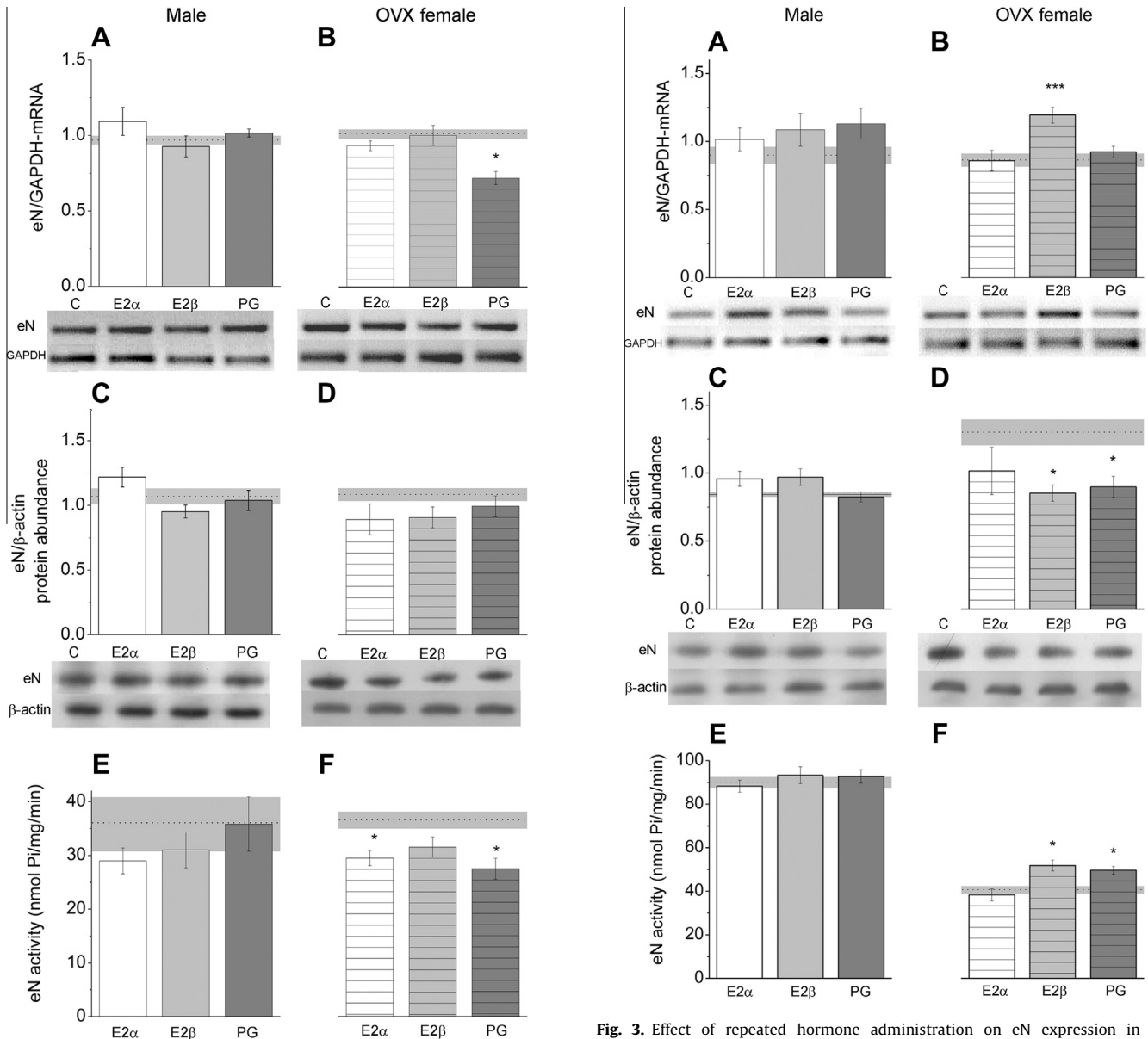
Similar to observed results for male cortex, applied treatments did not affect eN expression in hippocampal tissue of male rats (one-way ANOVA: mRNA [ $F(3,27) = 1.059$ ;  $p = 0.383$ ], protein [ $F(3,28) = 2.929$ ;  $p = 0.051$ ], activity [ $F(3,53) = 0.596$ ;  $p = 0.621$ ], Fig. 3A, C, E). However, the effects induced by the steroids in female rats were different between cortical and hippocampal area. In OVX rats, E2 $\alpha$  was ineffective, whereas ovarian steroids, E2 $\beta$  and PG, induced complex effects at the mRNA, protein and function level. Namely, E2 $\beta$  up-regulated mRNA (one-way ANOVA [ $F(3,31) = 6.635$ ;  $p = 0.0014$ ], Tukey's post hoc test  $p < 0.001$ , Fig. 3B) and



**Fig. 1.** Basal eN expression in the cerebral cortex and hippocampus. Expression of eN assessed at mRNA (A, B), protein (C, D) and biochemical activity (E, F) level in the cortex and hippocampus of male (white bars), intact female (light gray bars) or OVX female (gray bars) rats. The abundance of eN-transcript was determined in the cortical (A) and hippocampal (B) tissue by RT-PCR. Bars represent mean  $\pm$  SEM of eN mRNA (relative to GAPDH). Samples are from three animals per each group (1 brain/group/isolation). eN protein expression in the membrane preparations isolated from cortex (C) and hippocampus (D) was assessed by Western blot analysis. Bars represent mean relative eN abundance  $\pm$  SEM from at least 6 separate determinations, from three independent plasma membrane preparations (3 brains/group/isolation). The activity of eN was assessed by determining the level of liberated inorganic phosphate (Pi) in the membrane preparations isolated from cortex (E) or hippocampus (F). Bars represent mean specific activity (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM from at least 6 separate determinations performed in triplicate, from three independent plasma membrane preparations (3 brains/group/isolation). Significance levels: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Student's *t* test) indicate statistical difference from intact females.

increased AMP hydrolysis (one-way ANOVA [ $F(3,59) = 8.761$ ;  $p = 0.00007$ ], Tukey's post hoc test  $p < 0.05$ ,  $51.8 \pm 2.5$  nmol Pi/mg/min) in respect to vehicle-treated control ( $40.70 \pm 1.7$  nmol Pi/mg/min, Fig. 3F) while significantly decreased eN protein abundance for about 35% (one-way ANOVA [ $F(3,26) = 4.092$ ;  $p = 0.0166$ ], Tukey's post hoc test  $p < 0.05$ , Fig. 3D). Although similar trends were detected following PG treatment, decreased at protein level for about 30% (Tukey's post hoc test  $p < 0.05$ , Fig. 3D) and increased





**Fig. 2.** Effect of repeated hormone administration on eN expression in the cerebral cortex. Expression of eN assessed at mRNA, protein and biochemical level in cerebral cortex of male (A, C, E) and OVX female (B, D, F) rats. (A, B) The abundance of eN transcript was determined by RT-PCR. Bars represent mean relative eN abundance  $\pm$  SEM. Samples are from three animals per each group (1 brain/group/isolation). (C, D) Levels of eN protein in membrane preparation were assessed by Western blot. Bars represent mean relative eN abundance  $\pm$  SEM from at least 6 separate determinations, from two or three independent plasma membrane preparations (3 brains/group/isolation). (E, F) The AMP hydrolysis was assessed by determining the level of liberated inorganic phosphate (Pi). Bars represent mean specific activity (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM from at least 6 separate determinations performed in triplicate, from two or three independent plasma membrane preparations (3 brains/group/isolation). (E, F) The AMP hydrolysis was assessed by determining the level of liberated inorganic phosphate (Pi). Bars represent mean specific activity (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM from at least 6 separate determinations performed in triplicate, from two or three independent plasma membrane preparations (3 brains/group/isolation). Dot lines represent mean  $\pm$  SEM (gray area) in appropriate control animals (C, vehicle-treated animals). Significance levels: \*  $p < 0.05$  (ANOVA followed by Tukey's post hoc test), indicate statistical difference from appropriate control group (C).

AMP hydrolysis (49.8  $\pm$  1.7 nmol Pi/mg/min, Tukey's post hoc test  $p < 0.05$ , Fig. 3F), the changes were not observed at mRNA level.

#### 4. Discussion

Results presented herein demonstrate (a) regional and sex-related differences in eN function, with the highest AMPase

**Fig. 3.** Effect of repeated hormone administration on eN expression in the hippocampus. Expression of eN assessed at mRNA, protein and biochemical level in hippocampus of male (A, C, E) and OVX female (B, D, F) rats. (A, B) The abundance of eN transcript was determined by RT-PCR. Bars represent mean relative eN abundance  $\pm$  SEM. Samples are from three animals per each group (1 brain/group/isolation). (C, D) Levels of eN protein in membrane preparation were assessed by Western blot. Bars represent mean relative eN abundance  $\pm$  SEM from at least 6 separate determinations, from two or three independent plasma membrane preparations (3 brains/group/isolation). (E, F) The AMP hydrolysis was assessed by determining the level of liberated inorganic phosphate (Pi). Bars represent mean specific activity (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM from at least 6 separate determinations performed in triplicate, from two or three independent plasma membrane preparations (3 brains/group/isolation). (E, F) The AMP hydrolysis was assessed by determining the level of liberated inorganic phosphate (Pi). Bars represent mean specific activity (nmol Pi/mg/min)  $\pm$  SEM from at least 6 separate determinations performed in triplicate, from two or three independent plasma membrane preparations (3 brains/group/isolation). Dot lines represent mean  $\pm$  SEM (gray area) in appropriate control animals (C, vehicle-treated animals). Significance levels: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (ANOVA followed by Tukey's post hoc test), indicate statistical difference from appropriate control group (C).

activity observed in the hippocampus of male rats; (b) treatments with the sex steroids do not alter eN expression in the male cerebral cortex and hippocampus; (c) the ovariectomy was unable to alter basal gene eN expression or the activity in cortex and hippocampus of female rats, while induced slight increase in eN protein level in cortical and hippocampal membranes; (d) the main effects of treatments with the sex steroids were alterations in eN activity in the OVX females: in the cortex, the predominant effect of the applied treatments

was decrease in eN activity, while in the hippocampus the predominant effect was increase in eN activity.

In line with what was previously known, our study confirmed the presence of regional and sex-related differences in eN activity. In male rats, more than 2.5-fold higher AMP hydrolysis was observed in the hippocampus compared to the cortex, whereas this difference was not observed in the intact females. On the other hand, no apparent sex differences were observed in the expression levels and eN activity in the cortical area. Comparative analysis of available data regarding regional distribution of purinergic system components suggests that hippocampus exhibits the highest eN activity (Bjelobaba et al., 2009; Nagata et al., 1984; Nedeljkovic et al., 2006), together with the lowest adenosine deaminase activity (Geiger and Nagy, 1986; Yamamoto et al., 1987) and ENT1 abundance (Anderson et al., 1999) among brain areas tested, which together indicate high extracellular adenosine levels in this brain area (Pani et al., 2014). Distribution of adenosine receptors also correlates with high extracellular adenosine levels, as the hippocampus is one of the A<sub>1</sub>R-richest regions in the brain (Rudolph et al., 1992). Taken together these comparative data point to high activity and functional importance of adenosine signaling in male hippocampus, although how it is related to hippocampal function or sex differences on performance, remains unknown. As support of listed above, treatments with the sex steroids did not alter eN expression in the male cerebral cortex and hippocampus, at any of investigated levels. A possible explanation may be also found in the complex endogenous hormonal milieu and their interactions in the investigated brain regions (Barker and Galea, 2009; Kato et al., 2013).

To unveil the role of circulating female sex steroids in basal expression of eN in female cerebral cortex and hippocampus, the expression levels were compared between intact and OVX female rats. Although ovariectomy induced modest up-regulation of eN protein level at membrane fractions of both investigated brain area, the rate of eN activity and gene expression remained equivalent in intact and OVX rats. Like many GPI-anchored proteins, eN may have functions other than its catalytic activity, such as cell adhesion. There is considerable evidence that the eN is associated with the neuronal surface during synaptic plasticity and remodeling (Zimmermann, 1992; Zimmermann et al., 2012). Thus, the increased abundance of eN after ovariectomy possibly participate in the cellular contacts and substrate selection during dendritic spine densities alterations and synaptic rearrangement caused by ovariectomy (Frankfurt and Luine, 2015). However, Rucker and co-workers (2005) demonstrated that eN activity was increased in cortical, but not in the purified hippocampal synaptosomes following ovariectomy. This discrepancy may imply that the effects of circulating sex steroids on eN expression are cell type-specific, since crude membrane preparations used in this study contains synaptosomes, neuronal and astroglial membranes, whereas the latest abundantly express eN (Brisevac et al., 2012; Zimmermann, 1992). Taken together, we did not find the evidence that ovariectomy affect eN expression and the activity in the female cortex and hippocampus, at least not at the transcriptional level in relation to diestrus females.

In general, results demonstrated steady levels of eN gene expression after repeated administration of steroid hormones in the OVX females. However, E2 $\beta$  treatment induced up-regulation of eN-mRNA and reversed the increase of eN protein abundance promoted by ovariectomy in the hippocampus. Increased eN protein abundance promoted by ovariectomy was not reverted in the cerebral cortex of OVX females after steroid hormone treatment. In the context of endogenous hormonal milieu in the investigated structures, it has been found that ovariectomy reduced estradiol concentration in the female hippocampus but not in the cortex, and repeated exogenous treatment with estradiol

increased its content to level above intact animals in the cerebral cortex but not in hippocampus (Barker and Galea, 2009). The cerebral cortex and hippocampus differs in the uptake, storage or metabolism of steroids arriving from the periphery (Barker and Galea, 2009) which may underlines different effects on eN expression. Furthermore, repeated treatment with PG induced slight decrease of eN-mRNA, without altering in protein abundance at the cortical membranes of OVX females, while decreased eN protein abundance in hippocampal membranes without altering mRNA. It is well-known that gonadal steroids can act either directly, by binding to nuclear receptors which act as ligand-activated transcriptional factors that selectively modulate target gene expression, or indirectly, by interacting with other classes of transcription factors and DNA modifying proteins through complex protein-protein interactions (Mani and Oyola, 2012; Sellers et al., 2015; Singh et al., 2013; Tetel et al., 2009), again regulating gene expression. In the support of the later, a number of reports document that steroids through its receptors, may regulate the activity of AP-1 and Sp1 transcription factors (Favre et al., 2008; Jones et al., 2002; Vivar et al., 2010), which are active at eN gene promoter (Spychala et al., 1999).

Furthermore, our results demonstrated that the treatments with sex steroids induced regional- and sex-different effects on eN activity in the rat cerebral cortex and hippocampus. Specifically, application of sex steroids did not affect eN properties at membranes of cerebral cortex and hippocampus of the males but they induced significant and opposite effects in the investigated regions of OVX females. Except slightly decreased of AMP hydrolysis in the cortical membranes of OVX females, probably through the non-genomic mechanisms activated at the membranes of cerebral cortex (Dykens et al., 2005; Moos et al., 2009), E2 $\alpha$  treatment did not affect the eN properties. In the cortex of OVX animals, PG also reduced the rate of AMP hydrolysis. On the other hand, in the hippocampus, the E2 $\beta$  and PG increased hydrolysis of AMP. However, with only two exceptions with modest transcriptional effects, the treatments used in this study did not affect eN gene transcription, but they rather interfered with the eN activity, pointing to other mechanisms which are independent of *de novo* transcription. Namely, functional eNs are a homodimers with highly diverse pattern of glycosylation (Misumi et al., 1990), that could influence the enzyme kinetic properties. Alterations in eN activity after hormone treatment may be regulated on a longer timescale, possibly by different pattern of glycosylation, suggests that this might also be the case in situations in which lack of correlation between eN gene/protein expression and enzyme activity was observed (Bavaresco et al., 2007; Brisevac et al., 2012; Da Silva et al., 2012; Grkovic et al., 2014; Stanojevic et al., 2011). Also, it is possible that exogenously administered sex steroids modulate eN activity by interfering with specific regulatory factor(s) or signaling cascade (s), as shown in several breast carcinoma cell lines (Spychala et al., 2004) and changes the enzyme protein conformation and topography (Zimmermann, 1992). In addition, eN dimers associate with each other and with other ectonucleotidases, P1 and P2 receptors and nucleoside transporters to form hetero-oligomeric complexes (Schicker et al., 2009) that contribute to eN fine-tuning. Thus, topology of purinergic components at the cell surface as well as other molecules, that could be a subject to changes after hormonal application, might be responsible for changes in the eN activity we observed after hormone treatments.

As adenosine in the extracellular space arises from the action of eN, modulation in eN expression and function could alter adenosine production and adenosine receptors activation as well as release and uptake of other neurotransmitters, such as acetylcholine and glutamate (Gomes et al., 2011). Disturbance in activity and expression of eN and other nucleoside metabolic enzymes might cause metabolic diseases that are accompanied by

neurological or psychological symptoms and mental retardation. Furthermore, a better understanding of brain sex dimorphism as well as sex-specific responses to steroid hormones is essential for full translational potential of promoting human health. The present study demonstrates that expression of eN assessed on mRNA, protein and functional level could be influenced by gender, administered hormones and brain region. This opens a question of steroid hormones regulation of complex purinergic signaling machinery and further study on the exact mechanism(s) responsible for the effects of investigated sex steroids on eN is currently ongoing in our laboratory.

## Acknowledgment

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia, projects Nos 41014 and 173044.

## References

- Anderson, C.M., Xiong, W., Geiger, J.D., Young, J.D., Cass, C.E., Baldwin, S.A., Parkinson, F.E., 1999. Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain. *J. Neurochem.* 73, 867–873.
- Barker, J.M., Galea, L.A., 2009. Sex and regional differences in estradiol content in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of adult male and female rats. *Gen. Comp. Endocrinol.* 164, 77–84.
- Bavaresco, L., Bernardi, A., Braganhol, E., Wink, M.R., Battastini, A.M., 2007. Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity in C6 rat glioma cell line. *J. Neurooncol.* 84, 1–8.
- Baykov, A.A., Evtushenko, O.A., Avaeva, S.M., 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* 171, 266–270.
- Bjelobaba, I., Stojiljkovic, M., Pekovic, S., Dacic, S., Lavrnja, I., Stojkov, D., Rakic, L., Nedeljkovic, N., 2007. Immunohistological determination of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (NTPDase1) and 5'-nucleotidase in rat hippocampus reveals overlapping distribution. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27, 731–743.
- Bjelobaba, I., Stojiljkovic, M., Lavrnja, I., Stojkov, D., Pekovic, S., Dacic, S., Laketa, D., Rakic, L., Nedeljkovic, N., 2009. Regional changes in ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rat. *Gen. Physiol. Biophys.* 28, 62–68, Spec No.
- Bjelobaba, I., Parabucki, A., Lavrnja, I., Stojkov, D., Dacic, S., Pekovic, S., Rakic, L., Stojiljkovic, M., Nedeljkovic, N., 2011. Dynamic changes in the expression pattern of ecto-5'-nucleotidase in the rat model of cortical stab injury. *J. Neurosci. Res.* 89, 862–873.
- Boison, D., Singer, P., Shen, H.Y., Feldon, J., Yee, B.K., 2012. Adenosine hypothesis of schizophrenia—opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology* 62, 1527–1543.
- Brisevac, D., Bjelobaba, I., Bajic, A., Clarner, T., Stojiljkovic, M., Beyer, C., Andjus, P., Kipp, M., Nedeljkovic, N., 2012. Regulation of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in cultured cortical astrocytes by different inflammatory factors. *Neurochem. Int.* 61, 681–688.
- Cammer, W., Sacchi, R., Kahn, S., 1985. Immunocytochemical localization of 5'-nucleotidase in oligodendroglia and myelinated fibers in the central nervous system of adult and young rats. *Brain Res.* 352, 89–96.
- Cotman, C.W., Matthews, D.A., 1971. Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes: isolation and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 249, 380–394.
- Cunha, R.A., Brendel, P., Zimmermann, H., Ribeiro, J.A., 2000. Immunologically distinct isoforms of ecto-5'-nucleotidase in nerve terminals of different areas of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 74, 334–338.
- Cunha, R.A., 2005. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A(1) receptor activation to A(2A) receptor blockade. *Purinergic Signal.* 1, 111–134.
- Da Silva, R.S., Richetti, S.K., Tonial, E.M., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2012. Profile of nucleotide catabolism and ectonucleotidase expression from the hippocampi of neonatal rats after caffeine exposure. *Neurochem. Res.* 37, 23–30.
- de Paula Cognato, G., Bruno, A.N., Vuaden, F.C., Sarkis, J.J., Bonan, C.D., 2005. Ontogenetic profile of ectonucleotidase activities from brain synaptosomes of pilocarpine-treated rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 703–709.
- Diogenes, M.J., Neves-Tome, R., Fucile, S., Martinello, K., Scianni, M., Theofilas, P., Lopatar, J., Ribeiro, J.A., Maggi, L., Frenguelli, B.G., Limatola, C., Boison, D., Sebastiao, A.M., 2014. Homeostatic control of synaptic activity by endogenous adenosine is mediated by adenosine kinase. *Cereb. Cortex* 24, 67–80.
- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 31–55.
- Dykens, J.A., Moos, W.H., Howell, N., 2005. Development of 17alpha-estradiol as a neuroprotective therapeutic agent: rationale and results from a phase I clinical study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1052, 116–135.
- Eltzschig, H.K., Sitkovsky, M.V., Robson, S.C., 2013. Purinergic signaling during inflammation. *N. Engl. J. Med.* 368, 1260.
- Faivre, E.J., Daniel, A.R., Hillard, C.J., Lange, C.A., 2008. Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol. Endocrinol.* 22, 823–837.
- Fausther, M., Lecka, J., Soliman, E., Kauffenstein, G., Pelletier, J., Sheung, N., Dranoff, J.A., Sevigny, J., 2012. Coexpression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 with specific NTPDases differentially regulates adenosine formation in the rat liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302, G447–459.
- Frankfurt, M., Luine, V., 2015. The evolving role of dendritic spines and memory: interaction(s) with estradiol. *Horm. Behav.* 74, 28–36.
- Fuchs, J.L., 1991. 5'-Nucleotidase activity increases in aging rat brain. *Neurobiol. Aging* 12, 523–530.
- Geiger, J.D., Nagy, J.L., 1986. Distribution of adenosine deaminase activity in rat brain and spinal cord. *J. Neurosci.* 6, 2707–2714.
- Gibbs, R.B., 1998. Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. *Brain Res.* 787, 259–268.
- Gibbs, R.B., 1999. Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. *Brain Res.* 844, 20–27.
- Gillies, G.E., McArthur, S., 2010. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol. Rev.* 62, 155–198.
- Gomes, C.V., Kaster, M.P., Tome, A.R., Agostinho, P.M., Cunha, R.A., 2011. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1380–1399.
- Grkovic, I., Bjelobaba, I., Nedeljkovic, N., Mitrovic, N., Drakulic, D., Stanojlovic, M., Horvat, A., 2014. Developmental increase in ecto-5'-nucleotidase activity overlaps with appearance of two immunologically distinct enzyme isoforms in rat hippocampal synaptic plasma membranes. *J. Mol. Neurosci.* 54, 109–118.
- Habib, P., Beyer, C., 2015. Regulation of brain microglia by female gonadal steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 146, 3–14.
- Jones, D.R., Schmidt, R.J., Pickard, R.T., Foxworthy, P.S., Eacho, P.I., 2002. Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *J. Lipid Res.* 43, 383–391.
- Kato, A., Hojo, Y., Higo, S., Komatsuzaki, Y., Murakami, G., Yoshino, H., Uebayashi, M., Kawato, S., 2013. Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Front. Neural Circuits* 7, 149.
- Kiss, D.S., Zsarnovszky, A., Horvath, K., Gyorffy, A., Bartha, T., Hazai, D., Sotonyi, P., Somogyi, V., Frenyo, L.V., Diano, S., 2009. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in the ventral and lateral hypothalamic area of female rats: morphological characterization and functional implications. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 31.
- Kovacs, Z., Juhasz, G., Palkovits, M., Dobolyi, A., Kekesi, K.A., 2011. Area, age and gender dependence of the nucleoside system in the brain: a review of current literature. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 1012–1033.
- Langer, D., Hammer, K., Koszalka, P., Schrader, J., Robson, S., Zimmermann, H., 2008. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res.* 334, 199–217.
- Lavrnja, I., Laketa, D., Savic, D., Bozic, I., Bjelobaba, I., Pekovic, S., Nedeljkovic, N., 2015. Expression of a second ecto-5'-nucleotidase variant besides the usual protein in symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Mol. Neurosci.* 55, 898–911.
- Lovatt, D., Xu, Q., Liu, W., Takano, T., Smith, N.A., Schnemann, J., Tieu, K., Nedergaard, M., 2012. Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 6265–6270.
- Mackiewicz, M., Nikonova, E.V., Zimmermann, J.E., Romer, M.A., Cater, J., Galante, R.J., Pack, A.L., 2006. Age-related changes in adenosine metabolic enzymes in sleep/wake regulatory areas of the brain. *Neurobiol. Aging* 27, 351–360.
- Mani, S.K., Oyola, M.G., 2012. Progesterone signaling mechanisms in brain and behavior. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 3, 7.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210.
- Misumi, Y., Ogata, S., Hirose, S., Ikehara, Y., 1990. Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycosylphospholipid. *J. Biol. Chem.* 265, 2178–2183.
- Moos, W.H., Dykens, J.A., Nohynek, D., Rubinchik, E., Howell, N., 2009. Review of the effects of 17 alpha-estradiol in humans: a less feminizing estrogen with neuroprotective potential. *Drug Dev. Res.* 70, 1–21.
- Nagata, H., Mimori, Y., Nakamura, S., Kameyama, M., 1984. Regional and subcellular distribution in mammalian brain of the enzymes producing adenosine. *J. Neurochem.* 42, 1001–1007.
- Nedeljkovic, N., Djordjevic, V., Horvat, A., Nikezic, G., Kanazir, D.T., 2000. Effect of steroid hormone deprivation on the expression of ecto-ATPase in distinct brain regions of female rats. *Physiol. Res.* 49, 419–426.
- Nedeljkovic, N., Bjelobaba, I., Subasic, S., Lavrnja, I., Pekovic, S., Stojkov, D., Vjestica, A., Rakic, L., Stojiljkovic, M., 2006. Up-regulation of ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rats. *Cell Biol. Int.* 30, 541–546.
- Pani, A.K., Jiao, Y., Sample, K.J., Smeyne, R.J., 2014. Neurochemical measurement of adenosine in discrete brain regions of five strains of inbred mice. *PLoS One* 9, e92422.
- Roof, R.L., Hall, E.D., 2000. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J. Neurotrauma* 17, 367–388.

- Rucker, B., Pereira, G.S., Furstenau, C.R., Izquierdo, I., Bonan, C.D., Sarkis, J.J., 2004. Inhibitory avoidance task reveals differences in ectonucleotidase activities between male and female rats. *Neurochem. Res.* 29, 2231–2237.
- Rucker, B., Pochmann, D., Furstenau, C.R., Carneiro-Ramos, M.S., Battastini, A.M., Barreto-Chaves, M.L., Sarkis, J.J., 2005. Effects of steroid hormones on synaptosomal ectonucleotidase activities from hippocampus and cortex of adult female rats. *Gen. Comp. Endocrinol.* 140, 94–100.
- Rudolph, K.A., Schubert, P., Parkinson, F.E., Fredholm, B.B., 1992. Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 4, 346–369.
- Schicker, K., Hussl, S., Chandaka, G.K., Kosenburger, K., Yang, J.W., Waldhoer, M., Sitte, H.H., Boehm, S., 2009. A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 325–334.
- Sellers, K., Raval, P., Srivastava, D.P., 2015. Molecular signature of rapid estrogen regulation of synaptic connectivity and cognition. *Front. Neuroendocrinol.* 36C, 72–89.
- Singh, M., Su, C., Ng, S., 2013. Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Front. Neurosci.* 7, 159.
- Smith, M.S., Freeman, M.E., Neill, J.D., 1975. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96, 219–226.
- Spychala, J., Zimmermann, A.G., Mitchell, B.S., 1999. Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter. Role of the camp response element site in mediating repression by the upstream regulatory region. *J. Biol. Chem.* 274, 22705–22712.
- Spychala, J., Lazarowski, E., Ostapkowicz, A., Ayscue, L.H., Jin, A., Mitchell, B.S., 2004. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 708–717.
- Stanojevic, I., Bjelobaba, I., Nedeljkovic, N., Drakulic, D., Petrovic, S., Stojiljkovic, M., Horvat, A., 2011. Ontogenetic profile of ecto-5'-nucleotidase in rat brain synaptic plasma membranes. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 397–403.
- Tetel, M.J., Auger, A.P., Charlier, T.D., 2009. Who's in charge? Nuclear receptor coactivator and corepressor function in brain and behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 328–342.
- Toran-Allerand, C.D., Tinnikov, A.A., Singh, R.J., Nethrapalli, I.S., 2005. 17 $\alpha$ -estradiol: a brain-active estrogen? *Endocrinology* 146, 3843–3850.
- Vivar, O.I., Zhao, X., Saunier, E.F., Griffin, C., Mayba, O.S., Tagliaferri, M., Cohen, I., Speed, T.P., Leitman, D.C., 2010. Estrogen receptor beta binds to and regulates three distinct classes of target genes. *J. Biol. Chem.* 285, 22059–22066.
- Vogel, M., Kowalewski, H.J., Zimmermann, H., Janetzko, A., Margolis, R.U., Wollny, H. E., 1991. Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from Torpedo marmorata (electric ray) electric organ. *Biochem. J.* 278 (Pt 1), 199–202.
- Yamamoto, T., Geiger, J.D., Daddona, P.E., Nagy, J.I., 1987. Subcellular, regional and immunohistochemical localization of adenosine deaminase in various species. *Brain Res. Bull.* 19, 473–484.
- Zimmermann, H., Zebisch, M., Strater, N., 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* 8, 437–502.
- Zimmermann, H., 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285 (Pt 2), 345–365.



## Expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase3 (NTPDase3) in the female rat brain during postnatal development



Ivana Grković<sup>a,\*</sup>, Ivana Bjelobaba<sup>b</sup>, Nataša Mitrović<sup>a</sup>, Irena Lavrnja<sup>b</sup>, Dunja Drakulić<sup>a</sup>, Jelena Martinović<sup>a</sup>, Miloš Stanojlović<sup>a</sup>, Anica Horvat<sup>a</sup>, Nadežda Nedeljković<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Biology and Endocrinology, VINČA Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>b</sup> Institute for Biological Research "Siniša Stanković," University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>c</sup> Institute for Physiology and Biochemistry, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 November 2015

Received in revised form 16 March 2016

Accepted 1 April 2016

Available online 2 April 2016

#### Keywords:

Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase3)  
Postnatal development  
Hypothalamus  
Varicose fibers  
Feeding/sleeping behavior

### ABSTRACT

Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase3 (NTPDase3) is membrane-bound ecto-enzyme which hydrolyzes extracellular ATP, thus modulating the function of purinergic receptors and the pattern of purinergic signaling. Here we analyzed the developmental expression of NTPDase3 in female hypothalamus, cerebral cortex and hippocampal formation at different postnatal ages (PD7–PD90) by qRT-PCR and immunohistochemistry. In hypothalamus and hippocampus, a similar developmental profile was seen: NTPDase3 gene expression was stable during postnatal development and increased in adults. In the cortex, upregulation of NTPDase3 mRNA expression was seen at PD15 and further increase was evidenced in adults. Immunohistochemical analysis at PD7 revealed faint neuronal NTPDase3 localization in a dorsal hypothalamus. The immunoreactivity (*ir*) gradually increased in PD15 and PD20, in clusters of cells in the lateral, ventral and dorsomedial hypothalamus. Furthermore, in PD20 animals, NTPDase3-*ir* was detected on short fibers in the posterior hypothalamic area, while in PD30 the fibers appeared progressively longer and markedly varicose. In adults, the strongest NTPDase3-*ir* was observed in collections of cells in dorsomedial hypothalamic nucleus, dorsal and lateral hypothalamus and in several thalamic areas, whereas the varicose fibers traversed entire diencephalon, particularly paraventricular thalamic nucleus, ventromedial and dorsomedial hypothalamic nuclei, the arcuate nucleus and the preformal part of the lateral hypothalamus. The presumably ascending NTPDase3-*ir* fibers were first observed in PD20; their density and the varicose appearance increased until the adulthood. Prominent enhancement of NTPDase3-*ir* in the hypothalamus coincides with age when animals acquire diurnal rhythms of sleeping and feeding, supporting the hypothesis that this enzyme may be involved in regulation of homeostatic functions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; Arch, arcuate nucleus; *chp*, choroid plexus; CM, central medial thalamic nucleus; D3V, third ventricle; DMC, compact part of dorsomedial hypothalamic nucleus; DMD, dorsomedial hypothalamic nucleus; DMV, ventral part of dorsomedial hypothalamic nucleus; Hip, hippocampus; IMD, intermediodorsal thalamic nucleus; LH, lateral hypothalamus; LSI, lateral septal nucleus; M2, secondary motor area; MHb, medial habenular nucleus; MoDG, molecular layer of dentate gyrus; PH, posterior hypothalamic nucleus; PHD, posterior hypothalamic area; Pir, piriform cortex; PVP, paraventricular thalamic nucleus; Rh, rhomboid thalamic nucleus; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; VPM, ventral posteromedial thalamic nucleus; S2, secondary somatosensory cortex; *slm*, stratum lacunosum moleculare.

\* Corresponding author at: Department of Molecular Biology and Endocrinology, VINČA Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike Petrovića Alasa 12-14, 11001 Belgrade, Serbia.

E-mail address: [istanojevic@vinca.rs](mailto:istanojevic@vinca.rs) (I. Grković).

## 1. Introduction

Extracellular adenosine triphosphate (ATP) acts as gliotransmitter, neurotransmitter, neuromodulator and trophic factor, controlling excitability, transmission and synaptic plasticity (Cunha and Ribeiro, 2000; Rodrigues et al., 2005) during both embryonic and postnatal development of the central nervous system (CNS) (Dias et al., 2013; Wieraszko, 1996; Zimmermann, 2006). By acting at two distinct classes of P2 receptors, ligand-gated P2X1-7 and G-protein coupled P2Y1-13 (Burnstock, 2007), extracellular ATP induces myriad of cellular actions in the CNS (for review, see Burnstock 2007; Zimmermann et al., 2012). The effects induced by ATP are under control of ectonucleotidase enzyme family, which catalyze sequential hydrolysis of extracellular ATP into ADP, AMP and adenosine (Zimmermann et al., 2012).

In the rat brain, the ectonucleotidase family includes ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1–3 (NTPDase 1–3), which hydrolyze ATP and ADP to AMP, and ecto-5'-nucleotidase (eN), which catalyzes the final step of the conversion of AMP to adenosine. Individual members of NTPDase family differ in several respects, including their substrate preferences. Specifically, NTPDase 1 uses ATP and ADP equally well to produce AMP, while NTPDase 2 preferentially dephosphorylates ATP to ADP. NTPDase 3 is the functional intermediate between the previous two, as it hydrolyzes both ATP and ADP with a molecular ratio of about 1:0.3 (Smith and Kirley, 1998), leading to transient accumulation of ADP (Kukulski et al., 2005). Therefore, NTPDase 2 and NTPDase 3 produce agonists which act at ADP-sensitive purinoceptors, such as P2Y1, P2Y12 and P2Y13 (Abbraccio et al., 2006).

Members of ectonucleotidase family have a wide distribution in the brain, although individual members exhibit marked regional and cell-type specific localization (Bjelobaba et al., 2007; Braun et al., 2000; Langer et al., 2008; Wang and Guidotti, 1998; Wink et al., 2006). Among NTPDases expressed in the brain, the most restricted and exclusively neuronal localization is observed for NTPDase 3. Somatic NTPDase 3 localization was observed only in the midline regions of the brain: in the thalamus and hypothalamus, the medulla oblongata (Belcher et al., 2006) and in the spinal cord (Vongtau et al., 2011). NTPDase 3-expressing neuronal fibers are abundantly present in the midline regions of the brain, while scattered NTPDase 3 positive axon-like processes with prominent varicosities were also observed in the cerebral cortex, hippocampus and basal ganglia (Belcher et al., 2006; Bjelobaba et al., 2010). It should be noted that nearly all of the NTPDase 3-immunoreactive (*ir*) hypothalamic neurons and the vast majority of NTPDase 3-*ir* fibers express hypocretin-1/orexin-A, suggesting its role in the autonomic and hormone-regulated behaviors, such as food intake, sleep-wake cycle, and reproduction (Belcher et al., 2006). The involvement of the enzyme in the reproductive behaviors is further substantiated with the finding that in females, the expression of NTPDase 3 in the sex-related regions of the medial and lateral hypothalamus can be modulated by exogenously administered 17 $\beta$ -estradiol (Kiss et al., 2009). Considering that the hypothalamus, cerebral cortex and hippocampus are highly estrogen responsive brain regions, the present study has been designed to investigate the developmental profile of NTPDase 3 expression in the female rat brain. We also wanted to test if ovariectomy influences the expression levels of NTPDase 3 in the selected brain regions of an adult female rats. Because regional and local distribution of individual NTPDases crucially affects the type and extent of P2 receptor signaling, essential for normal brain functioning, it is important to determine whether the NTPDase 3 contributes to the control of nucleotide-mediated signaling during postnatal development.

Results of our study show that, although NTPDase 3 mRNA is already present at PD7, NTPDase 3-*ir* that resembles the enzyme localization in the adult appears in the lateral hypothalamic areas only at the end of third postnatal week (PD20), at about the time when the animals acquire the adult-like diurnal rhythms of feeding and sleeping behavior. This implies that the developmentally regulated expression of NTPDase 3 and ATP signaling may be important in the regulation of the homeostatic mechanisms involved in sleeping and feeding.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Female rats of Wistar strain from a local colony of VINČA Institute of Nuclear Science breeding stock were used in all

experiments. All procedures were carried out in accordance with the principles from Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication no. 80-23), and the Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals of VINČA Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, (02/11) approved the protocols. Animals were housed under standard conditions: 12 h light/dark regime, constant ambient temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and free access to food and water.

Females were organized in the following groups: postnatal 7- (PD7), 15- (PD15), 20- (PD20), 30- (PD30) and 90- (adult) days old rats. Rats in PD7, PD15 and PD20 groups were kept in the litter, while the animals in PD30 and adults were weaned at the 21st postnatal day and kept 3/cage. At each postnatal group, rats ( $n = 9$ ) were selected from at least five separate litters (reducing litter size uniformly).

Adult rats were divided into 3 groups: OVX group ( $n = 9/\text{group}$ ) was subjected to bilateral ovariectomy through one dorsal incision under ketamine (50 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) anesthesia. The same procedure was conducted on the sham group ( $n = 6/\text{group}$ ), without removal of ovaries. Intact ( $n = 14$ ) animals taken in diestrus phase of the estrous cycle were used as a control. Vaginal lavage was performed between 9 and 10 am during two weeks and the stage was determined by evaluating relative proportion of epithelial nucleated cells, squamous cells and leucocytes in vaginal smears. The presence of leukocytes in the smear indicated diestrus. Only those animals with regular 4–5 days cycle were included. OVX and sham animals were sacrificed 3 weeks after the surgery. Since sham operation had not induced any significant effect on the expression of NTPDase 3, those data were not discussed or included in the graphs.

### 2.2. Preparation of subcellular fractions

Subcellular localization of NTPDase 3 and specificity of the antibodies used in the immunohistochemical study was tested by Western blot analysis, after resolving sample proteins by SDS-PAGE electrophoresis. Crude membrane fraction (P2), gliosomes, synaptosomes, purified synaptic plasma membranes, synaptic mitochondria and the cytosolic fractions were isolated from whole cerebral cortex and hippocampal formation of adult female rats by differential centrifugation on discontinuous Percoll gradient (Dunkley et al., 2008; Moutsatsou et al., 2001). Due to small sample size, the only fraction prepared from the dissected hypothalamic tissue was the P2 fraction.

Cortices, hippocampi and hypothalami were dissected and homogenized in 10 vols of ice cold isolation buffer (0.32 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) in a Teflon/glass homogenizer (clearance 0.20 mm) at 900 rpm. Crude nuclear fraction and cell debris were removed by centrifugation at 1000g for 10 min. Supernatants were collected and centrifuged at 17000g for 20 min in order to obtain crude membrane fraction (P2). The P2 pellet isolated from the hypothalamus was lysed in hypo-osmotic solution (5 mM Tris-HCl, pH 7.4), aliquoted and kept on  $-80^\circ\text{C}$  until use. P2 fractions isolated from the cortices and hippocampi were resuspended in the isolation buffer, placed on a discontinuous Percoll (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) gradient (2, 6, 15, and 23% v/v of Percoll in 0.32 M sucrose and 1 mM EDTA, pH 7.4) and centrifuged at 35,000g for 5 min. The bands containing gliosomal (Glio) and synaptosomal (Syn) fractions were removed from 2 to 6% and 15–23% Percoll interface, respectively, diluted in the isolation buffer and pelleted by centrifugation at 14,000g for 20 min at  $4^\circ\text{C}$  to remove myelin. The synaptosomal fraction was re-suspended in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, centrifuged at 15,000g for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant was collected as synaptic cytosol (Cit), while the pellet was placed on a discontinuous sucrose gradient (0.32, 0.8, 1.0, and 1.2 M in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) and centrifuged at 90,000g

for 2 h. Synaptic plasma membrane (SPM) fraction was collected from the 1.0/1.2 M sucrose interface, while the pellet containing synaptic mitochondria (Mit) and both fractions were resuspended in 5 mM Tris–HCl, pH 7.4, centrifuged and resuspended in sample loading buffer for immunoblotting. All steps were carried out at 4 °C.

In order to validate the effective separation of sub-cellular fractions, Western blot analysis was used to determine the abundance of well-known astrocyte (glial fibrillary acid protein) and synapse marker proteins (synaptophysin, syntaxin, PSD-95) between gliosome and synaptosome samples as well as synaptic plasma membrane, mitochondrial and cytoplasmic marker proteins (Na,K-ATPase, synaptic membrane protein; heat shock protein-60, a mitochondrial matrix protein;  $\alpha$ -tubulin, cytoplasmic protein).

The protein content was determined using bovine serum albumin (BSA) as a standard (Markwell et al., 1978).

### 2.3. Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described (Grković et al., 2014). Briefly, equivalent amounts (40  $\mu$ g of proteins) were resolved by SDS-PAGE electrophoresis (4–8%) and transferred onto PVDF support membranes (0.45  $\mu$ m, Millipore, Germany). After washing in TBST (50 mM Tris–HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20), the membranes were blocked in 5% BSA in TBST for 1 h. The membranes were then incubated with rabbit anti-rat NTPDase3 (KLH14 antisera; a kind gift from Dr. T.L. Kirley, University of Cincinnati, OH, USA) or goat anti- $\beta$ -actin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA), both 1:2000 in TBST, overnight at 4 °C. After washing with TBST, membranes were incubated with appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1:10000 in TBST, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, USA). Visualization of the bands was performed on X-ray films (AGFA HealthCare NV, Septestraat, Mortsel, Belgium) with the use of chemiluminescence (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore, Darmstadt, Germany). Densitometric analysis was performed using *ImageJ* software package while optical density of each NTPDase3 band was normalized to appropriate optical density obtained for  $\beta$ -actin. The results acquired from six separate measurements isolated from three animals are expressed as mean  $\pm$  SEM.

### 2.4. Analysis of gene expression by semi-quantitative RT-PCR and qRT-PCR

The gene expression analysis of NTPDase3 was performed by a semi-quantitative RT-PCR assay as previously described (Grković et al., 2014). The total RNA extractions from whole hypothalamus, cerebral cortex and hippocampal formation were performed using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions while complementary DNA (cDNA) species were synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). cDNAs were amplified using primers designed for the amplification of NTPDase3 (f: 5'-CGGGATCCTTGCTGTGCGTGG-CATTTCTT-3'; r: 5'-TCTAGAGGTGCTCTGGCAGGAATCAGT-3'), together with reference gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, f: 5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'; r: 5'-GGCAGAGATGATGACCCTTTTGGC-3').

For polymerase chain reaction (PCR), appropriate dilutions of cDNA samples representing 2.5  $\mu$ g total RNA were mixed with PCR buffer containing 10 mM deoxyribonucleoside triphosphate, 2.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25  $\mu$ M primers for NTPDase3, 0.125  $\mu$ M primers for GAPDH and 1-U Taq polymerase (Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA), in a total volume of 25  $\mu$ l. The cDNAs

were amplified for 28 cycles (Thermal Cycler, Eppendorf), using the following conditions: denaturation 94 °C/45 s, annealing 58 °C/1 min, extension 72 °C/1 min, and final extension 72 °C/7 min. The PCR products were analyzed on a 2% agarose gel and visualized under UV light using ethidium bromide. Densitometry of PCR products was performed with *ImageJ* software package and relative NTPDase3 band intensity was normalized to GAPDH.

Quantitative real-time PCR was performed using SYBR Green (Applied Biosystems) and QuantStudio™ 3 System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using the following thermal profile parameters for both examined genes: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C (last two steps repeated in 40 cycles). NTPDase3 gene expression levels were determined by the comparative 2<sup>- $\Delta$</sup>  (- $\Delta$  Ct) quantification method, using GAPDH as a reference gene. Samples obtained from 5 animals for each experimental group were ran in duplicate. Across the investigated groups, GAPDH gene expression remained stable, justifying its use as a reference gene. The following primers were used: NTPDase3: (f) 5'-ACGGTTACAGCACCCCTTC, (r) 5'-ACAGCTGTGGTACCAGT-3'; GAPDH: (f) 5'-GTGGACCTCATGGCCTACAT-3' (r) 5'-GGATGGAATTGTGAGGGAGA-3'. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

### 2.5. Tissue processing and immunohistochemistry

Brains from examined postnatal groups (n = 3–4/group) were carefully removed from the skulls and fixed overnight in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). After cryoprotection in graded sucrose, brains were frozen in 2-methyl butane and kept at –70 °C until sectioning on cryotome. Sections, 25- $\mu$ m thick, were mounted on gelatin-coated slides, dried for 2 h at room temperature and stored at –20 °C until use.

NTPDase3 immunolabeling was performed according to the procedure previously described (Bjelobaba et al., 2010). Briefly, non-specific binding was reduced with 5% normal donkey serum in 0.01 M phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS). NTPDase3 antiserum in 5% normal donkey serum in PBS (1:500) was applied for 1 h, at room temperature. Horseradish peroxidase conjugated secondary donkey anti-rabbit antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) was used and the reaction product was visualized with 3',3'-diaminobenzidine (DAB, Dako, Glostrup, Denmark) according to manufacturer instructions. Negative control was performed by omitting the NTPDase3 antisera. Additional negative control was done using the pre-immune serum (supplied also by Dr. T.L. Kirley). In both cases, staining did not result in specific labeling. After dehydration and clearing, sections were mounted with DPX Mounting medium (Fluka, Buchs, Switzerland) and examined under Zeiss Axiovert microscope (Zeiss, Jena, Germany). Neuroanatomical regions were identified and labeled according to the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2005).

Double labeling procedures were performed as follows: after incubation in NTPDase3 antibody, secondary donkey anti-rabbit Alexa Fluor 555 antibody (1:200 dilution; Invitrogen, Carlsbad, CA) was applied for 2 h. The sections were washed in PBS and incubated in the primary antibodies: mouse anti-syntaxin1 (1:200 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, USA) or mouse anti-postsynaptic density protein 95 (PSD-95; 1:200 dilution; Millipore, Billerica, MA, USA). Secondary donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:200 dilution; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was applied for 2 h. Bovine serum albumin (BSA, Serva, Heidelberg, Germany) was used to block the unspecific labeling as 1% solution in PBS. All primary and secondary antibodies were diluted in 1% BSA in PBS and separately applied. Antigen retrieval step in the heated citrate buffer (pH 6) and tissue permeabilization with 0.3% Triton X-100 in PBS were performed in order to enhance the staining. The sections

were mounted in mowiol (Calbiochem, Darmstadt, Germany) and examined under the Zeiss Axiovert fluorescent microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a camera and EC Plan-Apochromat 100× objective, using the Apotome system to obtain optical sections. Images were sized, cropped and their brightness and contrast were adjusted in Photoshop CS.

## 2.6. Data analyses

The results from PCR and Western blot analyses were presented as mean ± SEM. Significance of difference between the data obtained from intact and OVX female groups was determined using Student's *t* test. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test (considering  $p < 0.05$  as significant) was used to determine the significant changes in messenger RNA (mRNA) abundance between different age groups.

## 3. Results

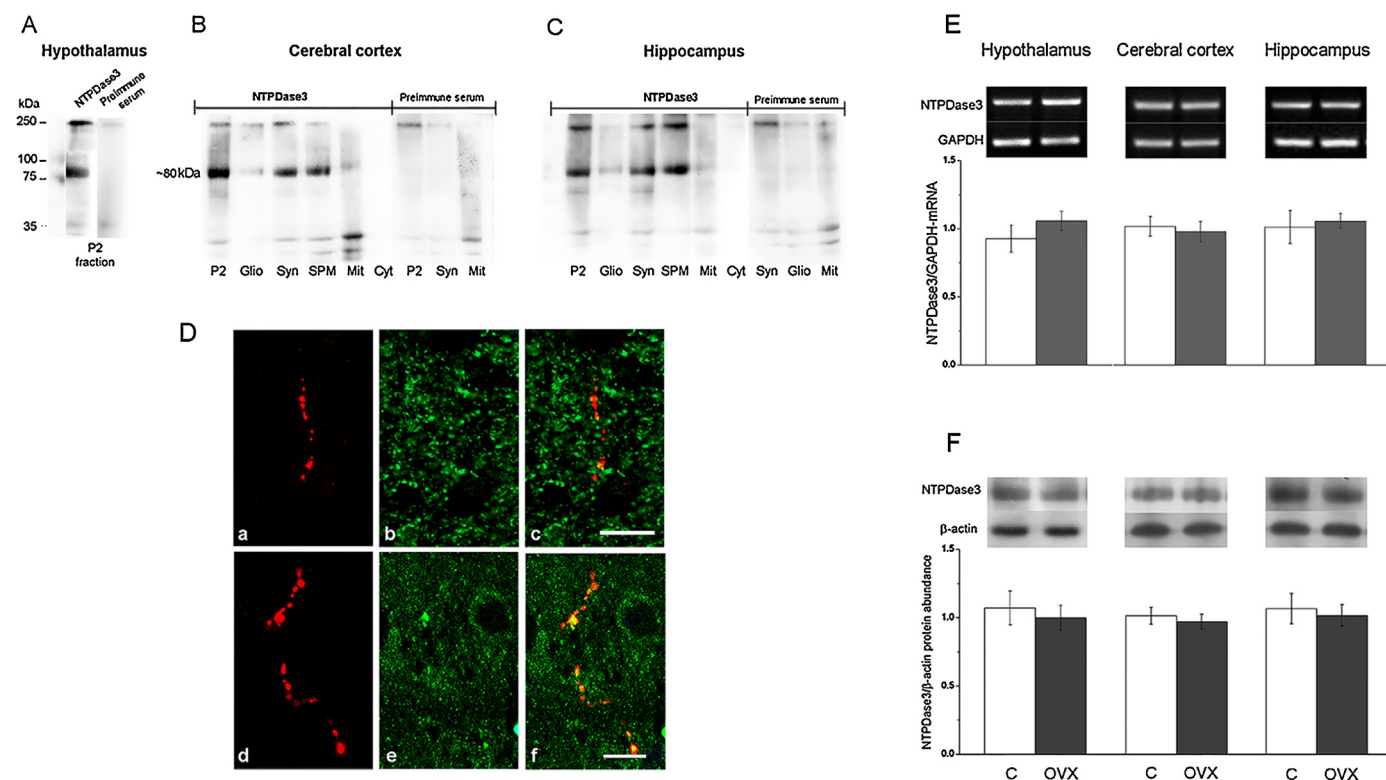
### 3.1. Antisera specificity

The validity of the NTPDase3 antisera in the rat brain fractions was confirmed by Western blot analysis after resolving particulate subcellular fractions isolated from hypothalamus (Fig. 1A), cortex (Fig. 1B) and hippocampus (Fig. 1C) by SDS-PAGE gel electrophoresis. One major band at approximately 80 kDa was detected in the crude membrane fraction (P2), together with two faint bands at

~25 and 250 kDa. In accordance with the previously described localization of NTPDase3 in astrocytes and neurons (Belcher et al., 2006; Wink et al., 2006; Kiss et al., 2009; Bjelobaba et al., 2010), we found that NTPDase3 was more abundant in synaptosomal (Syn) and synaptic plasma membrane (SPM) fractions than in gliosomal (Glio) and synaptic mitochondrial (Mit) fractions, whereas the band was absent from the cytosolic fractions (Cyt). When the pre-immune serum was used, 80 kDa band could not be detected, further confirming that this band corresponds to fully glycosylated NTPDase3 membrane protein.

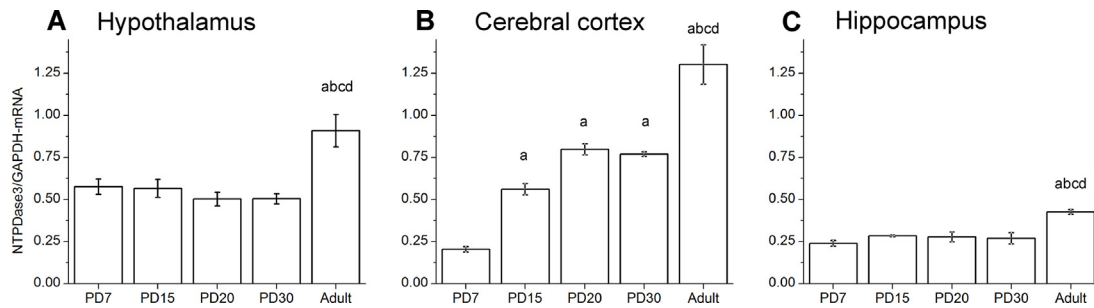
### 3.2. Syntaxin-1 and PSD-95 double immunofluorescence

Since NTPDase3 protein was detected in the Syn and SPM fractions, which both contain presynaptic and postsynaptic membrane compartments, fine synaptic localization of NTPDase3 was next determined by means of double immunofluorescence histochemistry, using the antibodies against syntaxin, as a marker of a presynaptic compartment and PSD-95, as a marker of a postsynaptic compartment. NTPDase3-immunofluorescence was only sporadically observed in association with the fluorescence corresponding to syntaxin (Fig. 1D a-c), whereas much more frequently with the fluorescence corresponding to PSD-95 (Fig. 1D d-f), indicating that NTPDase3-expressing varicosities more often represent postsynaptic elements of the synapses. However, the vast majority of NTPDase3-ir did not co-localize with neither of the two synaptic markers.



**Fig. 1.** (A–C) Specificity of polyclonal NTPDase3 antisera. The subcellular fractions were obtained from hypothalamus (A), cortex (B) and hippocampus (C). One major NTPDase3 band at ~80 kDa was detected in the P2, Syn and SPM and faint band in Glio and Mit fractions, together with two faint bands at ~25 and 250 kDa. When the pre-immune serum was applied, 80 kDa-band could not be detected. (D) Double immunofluorescent staining of NTPDase3 and synaptic markers. (a–c) Representative set of high magnification optical sections of cortex showing NTPDase3 (red fluorescence, a, d) and syntaxin or PSD-95 (green fluorescence, b, e) expression. Overlaid images (c, f) reveal sporadic expression of NTPDase3 in the presynaptic compartment and more frequent expression of NTPDase3 on postsynaptic elements of the synapses. Scale bar applies to all images: 10  $\mu$ m. (E and F) Expression of NTPDase3 assessed at mRNA (E) and protein (F) level in the hypothalamus, cortex and hippocampus of control (C, white bars) or OVX (gray bars) female rats. Bars represent mean ± SEM. No significant changes in NTPDase3 mRNA and protein content could be detected in any investigated region. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)





**Fig. 2.** NTPDase3 gene expression in the hypothalamus (A), cerebral cortex (B), and hippocampus (C) at different ages, relative to GAPDH. Bars represent mean  $\pm$  SEM. Letters a b c and d indicate significance level of  $p < 0.05$  or less compared with PD7, PD15, PD20 and PD30, respectively.

### 3.3. NTPDase3 expression in hypothalamus, cerebral cortex and hippocampus of intact and OVX females

To evaluate the influence of ovarian steroids on NTPDase3 gene and protein expression we used OVX and control females. As shown in Fig. 1, OVX affected neither mRNA (Fig. 1E), nor the protein abundance of NTPDase3 (Fig. 1F) in adult female hypothalamus, cortex or hippocampus. Therefore, subsequent immunohistochemical study was performed in intact female rats at different postnatal ages.

### 3.4. NTPDase3-mRNA expression in developing hypothalamus, cerebral cortex and hippocampus

Developmental profile of NTPDase3 gene expression was investigated in samples obtained from the hypothalamus, cerebral cortex and hippocampus at different postnatal ages (Fig. 2). The one-way ANOVA detected a significant effect of age on NTPDase3-mRNA expression [hypothalamus:  $F = 8.554$ ;  $p < 0.001$ ; cerebral cortex:  $F = 51.411$ ,  $p < 0.001$ ; hippocampus:  $F = 14.088$ ;  $p < 0.001$ ]. In the hypothalamus, NTPDase3-mRNA levels were stable during postnatal development and significantly increased in the adults ( $p < 0.001$ , Fig. 2A). In the cerebral cortex, more than twofold increase in NTPDase3-mRNA abundance between PD7 and PD15 ( $p < 0.01$ ) was evidenced, with further increase seen in adults (Fig. 2B). Although lower than in hypothalamus and cortex, the expression of NTPDase3-mRNA in the hippocampal formation was stable during development and significantly increased only in adult rats ( $p < 0.001$ ; Fig. 2C).

### 3.5. Developmental pattern of NTPDase3 expression in the brain

Immunohistochemical analysis using the NTPDase3 antisera revealed restricted distribution of this enzyme in the rat brain. The distribution of NTPDase3-ir in the rat regions of interest through postnatal development and adults is shown in Table 1.

In coronal brain sections at PD7, faint NTPDase3-ir was observed in neurons in a dorsal hypothalamus, while ir fibers were not observed. Weak NTPDase3-ir was observed sporadically at neuronal cell bodies in the restricted diencephalic and limbic structures, such as sub-regions of the hypothalamus and the septohippocampal nucleus (data not shown).

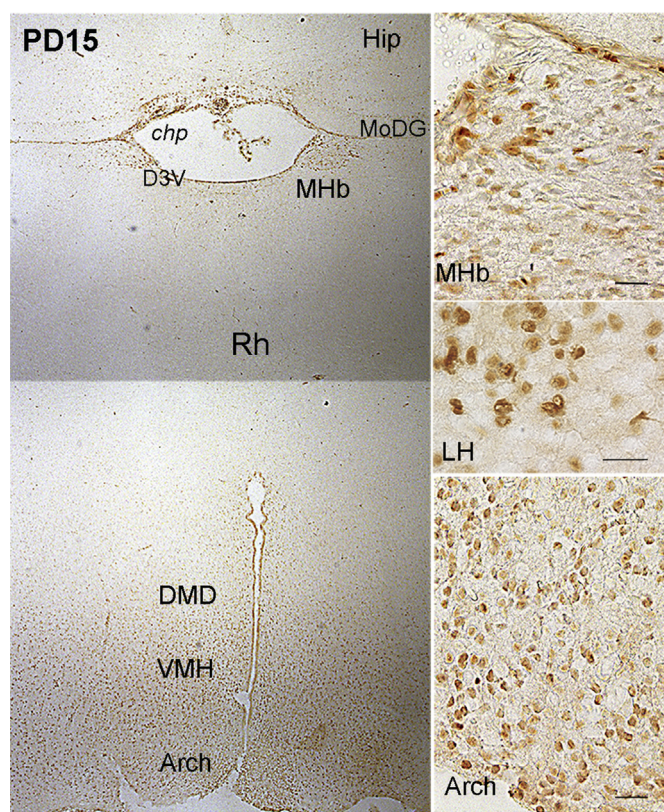
In PD15 sections, slightly more NTPDase3-ir cell bodies were detected in midline diencephalic regions (Fig. 3). Similar to what was detected at PD7, ependymal lining of the dorsal part of third ventricle (D3V) was strongly positive for NTPDase3, including the cells of the choroid plexus (chp). Prominent ir was also observed in the cluster of cells located in the medial habenular nucleus (MHb) and molecular layer of dentate gyrus (MoDG), while scattered ir cells were observed in the pyramidal layer of the hippocampus. In the hypothalamus, the highest density of NTPDase3-ir neuronal cell bodies were observed in the ventromedial (VMH) and dorsomedial hypothalamic nucleus (DMD), arcuate nucleus (Arch) and lateral hypothalamus (LH), whereas only faint and scattered ir profiles were observed in the rhomboid thalamic nucleus (Rh, Fig. 3). In cortical structures, specific ir profiles were not observed.

In sections obtained at PD20, stronger ir was observed when compared to PD15. Highly scattered thin NTPDase3-ir fibers were also seen mostly in the superficial layers of the cortex (Fig. 4).

**Table 1**  
Distribution of NTPDase3-ir in the rat brain at different postnatal ages.

Brain region	cell bodies					varicose fibers				
	PD7	PD15	PD20	PD30	Adult	PD7	PD15	PD20	PD30	Adult
Cerebral cortex	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++
Piriform cortex	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
Hippocampal formation										
Dentate girus	-	+	-	-	-	-	-	+	+	++
Hippocampus	-	+	-	-	-	-	-	+	++	++
Septohippocampal nucleus	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
Choroid plexus	+	++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
D3V	++	++	+++	-	-	-	-	+	+	+
Medial habenular nucleus	-	++	+++	-	-	-	-	-	++	+++
Paraventricular thalamic nucleus	-	-	+	-	-	-	-	+	++	+++
Hypothalamus										
Medial zone	+	+++	+++	++	+	-	-	++	++	+++
Arcuate nucleus	-	++	++	++	++	-	+	+	++	++
Lateral hypothalamic area	-	++	+++	+++	++	-	-	+	++	+++
Posterior hypothalamic nucleus	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++

Symbols designate no detectable (-), faint (+), moderate (++), and high (+++) levels of immunoreactivity. PD, postnatal day



**Fig. 3.** NTPDase3 staining in the coronal brain section obtained from PD15 animals. Ependymal lining of the dorsal part of third ventricle (D3V) and choroid plexus (*chp*) exhibit strong NTPDase3-*ir*. Cluster of NTPDase3-*ir* cells in the medial habenular nucleus (MHb) and molecular layer of dentate gyrus (MoDG). Faint *ir* profiles were observed in the rhomboid thalamic nucleus (Rh). Strongly labeled NTPDase3 cell bodies observed in the dorsomedial (DMD) and ventromedial hypothalamic nucleus (VMH), lateral hypothalamus (LH), arcuate nucleus (Arch). Scale bar: 20  $\mu$ m.

Strong labeling of pial surface and the choroid plexus of the third ventricle were seen. Highly *ir* cell clusters were detected in the medial habenular nucleus (MHb), ventral (DMV) and compact part (DMC) of dorsomedial hypothalamic nucleus and arcuate nucleus of the hypothalamus (Arch, Fig. 4). Rare *ir* fibers with small varicosities were observed in the hypothalamus, along the wall of the third ventricle, in the posterior hypothalamic area (PHD) and paraventricular thalamic nucleus (PVP, Fig. 4).

In PD30 sections, similar to what was observed at previous age point, clusters of *ir* cell bodies were seen in the hypothalamic nuclei around the third ventricle, including arcuate nucleus (Arch), posterior hypothalamic nucleus (PH) and dorsal part of the posterior hypothalamic area (PHD) as well as in lateral hypothalamus (LH, Fig. 5). Interestingly, *ir* cell bodies were not observed in the medial habenular region, although markedly labeled cell in the region were detected at the previous age point. Strong NTPDase3-*ir* labeled *chp* of the third ventricle (Fig. 5). Starting from PD30, increasing number of progressively longer NTPDase3-*ir* fibers with prominent varicosities were observed in the cortical areas, including the secondary motor area (M2), secondary somatosensory cortex (S2) and piriform cortex (Pir) as well as in the hippocampus (Hip, Fig. 5). Immunopositive fibers with varicosities were also seen in hypothalamic, thalamic and epithalamic regions, particularly along the midline of the brain.

At the adult stage, markedly stronger *ir* was detected in all regions of the forebrain. Scattered immunoreactive profiles were observed in the cortical structures including S2 and Pir as well as in the Hip, as previously described by Belcher et al. (2006). Besides

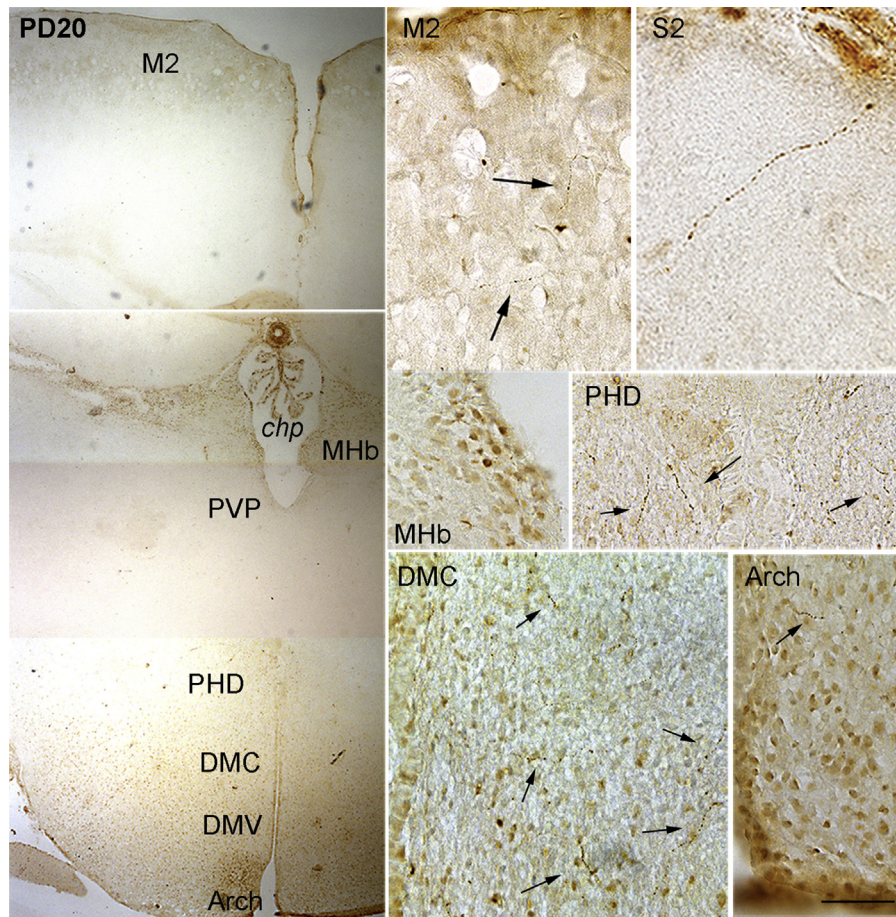
the diencephalic regions with strong *ir* localized at the cell bodies, immunopositive cell bodies were observed in the lateral hypothalamus (LH, Fig. 6). High density of long NTPDase3-*ir* varicose fibers was detected in all areas of the hypothalamus, including the perifornical part of the lateral hypothalamus. Particularly long NTPDase3-positive fibers were seen in the dorsal posterior hypothalamic area (PHD), paraventricular thalamic nucleus (PVP) and along midline of the diencephalon, such as intermediodorsal thalamic nucleus (IMD), central medial thalamic nucleus (CM) and ventral posteromedial thalamic nucleus (VPM), as well as in the lateral septal nucleus (LSI, Fig. 6) and nucleus of the vertical limb of the diagonal band.

#### 4. Discussion

The aim of present study was to describe developmental pattern of NTPDase3 expression in the female rat brain. Expression and localization of NTPDase3 in the brain were analyzed by qRT-PCR and immunohistochemistry. The validity of KLH14 antisera to NTPDase3 was previously established (Belcher et al., 2006) and here confirmed by Western blot analysis. The antisera marked one major *ir* band at about 80 kDa, which was absent after probing the blots with the pre-immune serum. The same approach verified that NTPDase3 had almost exclusive membrane localization, including localization in specialized postsynaptic membrane subdomain.

It was shown previously that 17 $\beta$ -estradiol treatment induces the protein expression of NTPDase3 in both medial and lateral hypothalamus of OVX adult females (Kiss et al., 2009). Our results however, revealed that OVX in adult rats does not influence gene or protein NTPDase3 expression. Together, these results imply that the basal expression of NTPDase3 is not affected by the lack of circulating estradiol, although the protein gets promptly upregulated in its presence. We therefore hypothesize that circulating 17 $\beta$ -estradiol does not drive the developmental changes in NTPDase3 expression, but rather serves as its modulator. However, the increase of NTPDase3 gene expression that we observe in adult rats most probably occurs at the time of puberty. Further studies should elucidate whether there are changes in hypothalamic NTPDase3 gene and protein expression across the estrous cycle and compares it with the expression in males.

Analysis of developmental pattern of NTPDase3-mRNA expression showed that the enzyme was expressed at PD7, when NTPDase3-*ir* was observed sporadically at neuronal cell bodies in the restricted diencephalic and limbic structures, such as sub-regions of the hypothalamus and the septohippocampal nucleus, while fibers expressing NTPDase3 were not observed. Although the expression of the NTPDase3-mRNA was stable from PD7 to PD30, significant NTPDase3-*ir* was detected after PD20. The somatic NTPDase3 labeling gradually increased until the end of the third postnatal week, particularly in the collections of cells in the lateral, ventral and dorsomedial hypothalamus. At PD20, short, marginally varicose NTPDase3 containing fibers appeared in the posterior hypothalamic area, while at PD30 the fibers became longer with prominent varicosities and extended along the midline of the whole diencephalon. In the adult animals, prominent NTPDase3-*ir* appeared at neuronal cell bodies in the restricted thalamic nuclei. The strongest somatic NTPDase3-*ir* was observed in the lateral hypothalamus of adult animals, whereas the complete area was traversed with NTPDase3-*ir* varicose fibers. Specifically, clusters of neurons in the dorsomedial hypothalamic nucleus, dorsal and lateral hypothalamic areas and at the thalamus/hypothalamus junction strongly expressed NTPDase3, whereas NTPDase3-*ir* fibers were spread throughout the entire diencephalon, particularly in the paraventricular thalamic nucleus, ventromedial and dorsomedial hypothalamic nuclei, the arcuate nucleus and the



**Fig. 4.** NTPDase3 staining in the coronal brain section obtained from PD20 animals. Scattered *ir* profiles were observed in superficial layers of secondary motor area (M2) and secondary somatosensory cortex (S2). Strong *ir* labels pial surface and the choroid plexus of the third ventricle (*chp*). NTPDase3-*ir* cells in the medial habenular nucleus (MHb) and at cells lining the third ventricle. Highly *ir* cells clusters in the ventral (DMV) and compact part (DMC) of dorsomedial hypothalamic nucleus, arcuate nucleus (Arch) and *ir* fibers with small varicosities (arrows) in the posterior hypothalamic area (PHD). Scale bar: 50  $\mu$ m; S2 = 10  $\mu$ m.

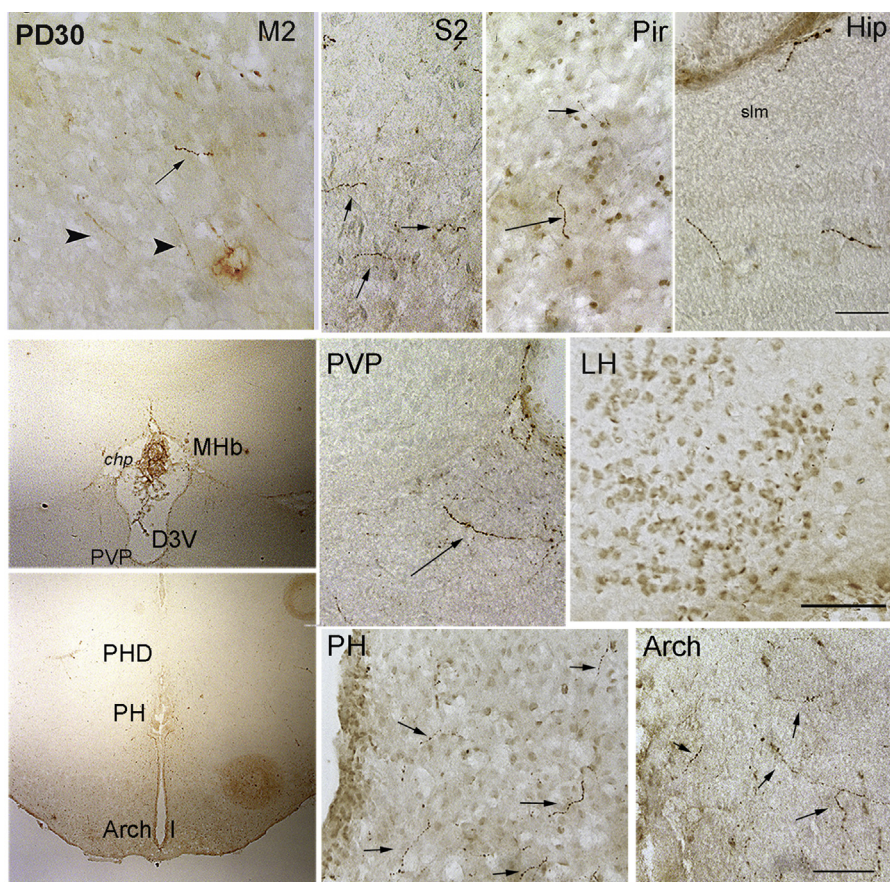
perifornical part of the lateral hypothalamus. Available *in situ* hybridization data suggests that in mouse, NTPDase3 is expressed in collections of cells in the pons (Website: © 2015 Allen Institute for Brain Science. Allen Brain Atlas [Internet]. Available from: <http://www.brain-map.org>). The localization of NTPDase3-mRNA positive neurons supports previous suggestions that this enzyme is involved in regulation of ATP signaling in auditory neurotransmission (Vlajkovic et al., 2006). Therefore, at least some of the NTPDase3-*ir* fibers that are observed in the thalamus may originate from more posterior structures.

In the cortex, NTPDase3-*ir* gradually increased over time in accordance with the trend of an increase in gene expression. The labeling of cell bodies was seen only in the hypothalamus, although NTPDase3-mRNA was also present in the hippocampus, while the highest NTPDase3-mRNA expression was observed in the cortex. This suggests that in these structures the NTPDase3 protein expression is below the limit of detection by immunohistochemistry, or that NTPDase3 mRNA gets actively transported from hypothalamus through axonal projections to hippocampus and cortex.

Beginning with PD7 and during maturation, prominent NTPDase3-*ir* was observed at cells of the choroid plexus as well as strong enzyme histochemical staining of this area (our unpublished observation), also shown by others in the adults (Gampe et al., 2012; Langer et al., 2008). The choroid plexus is innervated by adrenergic and cholinergic neurons (Lindvall and Owman, 1981) which use ATP as co-transmitter (e.g. Burnstock,

2007). ATP can also be released from other types of cells and through P2X receptors, it may regulate the function of choroid plexus and cerebrospinal fluid composition (Xiang and Burnstock, 2005). Therefore, NTPDase3 may be an important regulator of ATP availability for P2X receptors in the choroid plexus.

Overall distribution of NTPDase3 containing cells and fibers in the adult rat brain overlaps with the expression pattern of hypocretin-1/orexin-A (H/O) (Belcher et al., 2006; Nambu et al., 1999; Peyron et al., 1998). Specifically, H/O neurons have been located in discrete regions of lateral hypothalamic areas, from which they project varicose fibers throughout the neuraxis, innervating the cortex, thalamus, hypothalamus, brainstem, and spinal cord (Bittencourt and Elias, 1998; Peyron et al., 1998). Of particular interest is H/O innervation of the regions controlling behavioral states, including feeding behavior and sleep regulation (Tsujino and Sakurai, 2009) which are established gradually in the early postnatal period (Redman and Sweney, 1976). The hypothalamic pattern of NTPDase3 expression obtained in the present study was also consistent with the pattern of H/O expression in the hypothalamus during postnatal development of male rats (Stoyanova et al., 2010; Yamamoto et al., 2000). Similarly to what we find for NTPDase3, H/O containing cells can be observed in two-week old rats (Sawai et al., 2010; Steininger et al., 2004; Stoyanova et al., 2010) and their number gradually increase towards the ninth postnatal week (Sawai et al., 2010). However, the density of varicose H/O fibers peaks between second and third postnatal week and then remains at constant level throughout the adulthood



**Fig. 5.** NTPDase3 staining in the coronal brain section obtained from PD30 animals. Immunopositive fibers with prominent varicosities were observed in secondary motor area (M2), secondary somatosensory cortex (S2), piriform cortex (Pir) as well as in the hippocampus (Hip). Long NTPDase3-ir fibers with prominent varicosities (arrows) were observed in the thalamic and hypothalamic regions. Strong NTPDase3-ir labels choroid plexus (chp) of the third ventricle (D3V). Highly ir cell clusters in the dorsal part of posterior hypothalamic area (PHD), posterior hypothalamic nucleus (PH), lateral hypothalamus (LH) and arcuate nucleus (Arch). Scale bar: 50  $\mu$ m; Hip, LH = 10  $\mu$ m.

(Steininger et al., 2004). Therefore, detectable protein expression of NTPDase3 starts at the time when the H/O projection system seems to be fully mature and coincides with the developmental shift in two important autonomic functions, feeding and sleep-wake behavior. Specifically, by the end of the third postnatal week

pups establish adult-like diurnal rhythms of feeding and sleeping behavior, shifting their feeding from light to dark (Redman and Sweney, 1976) and establishing sleeping during the light period (Frank and Heller, 1997a,b). Appearance of NTPDase3 at H/O containing hypothalamic structures at that particular developmental stage, suggests that NTPDase3 might be involved in this developmental shift.

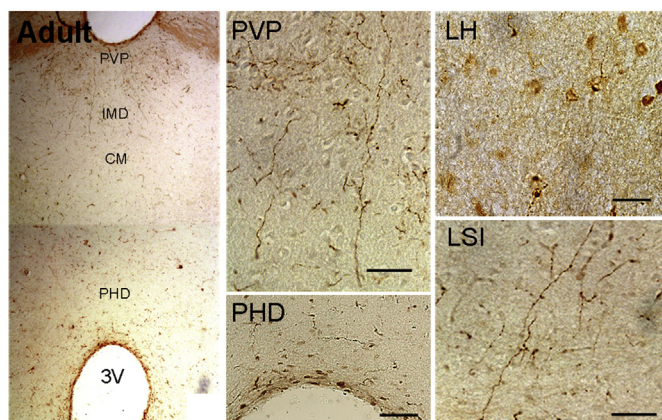
In summary, our study shows that NTPDase3 is expressed in the cells of lateral hypothalamic areas and at varicose axonal projections extending from the hypothalamus during third postnatal week, at about time when the animals acquire the adult-like diurnal rhythms of feeding and sleeping behavior. Further studies aimed to examine the modulatory role of NTPDase3 system during development may increase understanding of the role of ATP in regulation of autonomic functions.

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

#### Author's contributions

Conceived and designed the experiments: IG, IB, NN. Performed the experiments: IG, IB, NM, IL, DD. Analyzed the data: IG, IB, NN. Contributed to critically revised the manuscript: MS, JM, AH. Wrote the paper: IG, IB, NN.



**Fig. 6.** NTPDase3 staining in the coronal brain section obtained from adult animals. Long NTPDase3-ir varicose fibers were seen in posterior hypothalamic area (PHD), paraventricular thalamic nucleus (PVP) and along midline of the diencephalon: in intermediodorsal thalamic nucleus (IMD), central medial thalamic nucleus (CM), lateral septal nucleus (LSI). Prominent NTPDase3-ir cells could be observed in the lateral hypothalamus (LH). Scale bar: 20  $\mu$ m.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Terence L. Kirley for the generous gift of KLH14 antisera used in the study. This work was supported by Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia, Project Nos. 41014 and 173044.

## References

- Abbraccio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A., 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 281–341.
- Belcher, S.M., Zsarnovszky, A., Crawford, P.A., Hemani, H., Spurling, L., 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.
- Bittencourt, J.C., Elias, C.F., 1998. Melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI projections from the lateral hypothalamic area and zona incerta to the medial septal nucleus and spinal cord: a study using multiple neuronal tracers. *Brain Res.* 805, 1–19.
- Bjelobaba, I., Stojilkovic, M., Pekovic, S., Dacic, S., Lavrnja, I., Stojkov, D., Rakic, L., Nedeljkovic, N., 2007. Immunohistological determination of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and 5'-nucleotidase in rat hippocampus reveals overlapping distribution. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27, 731–743.
- Bjelobaba, I., Lavrnja, I., Parabucki, A., Stojkov, D., Stojilkovic, M., Pekovic, S., Nedeljkovic, N., 2010. The cortical stab injury induces beading of fibers expressing ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3. *Neuroscience* 170, 107–116.
- Braun, N., Sevigny, J., Robson, S.C., Enyoji, K., Guckelberger, O., Hammer, K., Di Virgilio, F., Zimmermann, H., 2000. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4357–4366.
- Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659–797.
- Cunha, R.A., Ribeiro, J.A., 2000. ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci.* 68, 119–137.
- Dias, R.B., Rombo, D.M., Ribeiro, J.A., Henley, J.M., Sebastiao, A.M., 2013. Adenosine: setting the stage for plasticity. *Trends Neurosci.* 36, 248–257.
- Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Robinson, P.J., 2008. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat. Protoc.* 3, 1718–1728.
- Frank, M.G., Heller, H.C., 1997a. Development of diurnal organization of EEG slow-wave activity and slow-wave sleep in the rat. *Am. J. Physiol.* 273, R472–478.
- Frank, M.G., Heller, H.C., 1997b. Development of REM and slow wave sleep in the rat. *Am. J. Physiol.* 272, R1792–1799.
- Gampe, K., Hammer, K., Kittel, A., Zimmermann, H., 2012. The medial habenula contains a specific nonstellate subtype of astrocyte expressing the ectonucleotidase NTPDase2. *Glia* 60, 1860–1870.
- Grkovic, I., Bjelobaba, I., Nedeljkovic, N., Mitrovic, N., Drakulic, D., Stanojlovic, M., Horvat, A., 2014. Developmental increase in ecto-5'-nucleotidase activity overlaps with appearance of two immunologically distinct enzyme isoforms in rat hippocampal synaptic plasma membranes. *J. Mol. Neurosci.* 54, 109–118.
- Kiss, D.S., Zsarnovszky, A., Horvath, K., Gyorfy, A., Bartha, T., Hazai, D., Sotonyi, P., Somogyi, V., Frenyo, L.V., Diano, S., 2009. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in the ventral and lateral hypothalamic area of female rats: morphological characterization and functional implications. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 31.
- Kukulski, F., Levesque, S.A., Lavoie, E.G., Lecka, J., Bigonnesse, F., Knowles, A.F., Robson, S.C., Kirley, T.L., Sevigny, J., 2005. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling* 1, 193–204.
- Langer, D., Hammer, K., Koszalka, P., Schrader, J., Robson, S., Zimmermann, H., 2008. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res.* 334, 199–217.
- Lindvall, M., Owman, C., 1981. Autonomic nerves in the mammalian choroid plexus and their influence on the formation of cerebrospinal fluid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1, 245–266.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210.
- Moutsatsou, P., Psarra, A.M., Tsiapara, A., Paraskevaki, H., Davaris, P., Sekeris, C.E., 2001. Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 386, 69–78.
- Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., Goto, K., 1999. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.* 827, 243–260.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*, 5th ed. Elsevier Academic Press.
- Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., Kilduff, T.S., 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996–10015.
- Redman, R.S., Sweney, L.R., 1976. Changes in diet and patterns of feeding activity of developing rats. *The Journal of nutrition* 106, 615–626.
- Rodrigues, R.J., Almeida, T., Richardson, P.J., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., 2005. Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2 × 1, P2 × 2/3, and P2 × 3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 25, 6286–6295.
- Sawai, N., Ueta, Y., Nakazato, M., Ozawa, H., 2010. Developmental and aging change of orexin-a and -B immunoreactive neurons in the male rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 468, 51–55.
- Smith, T.M., Kirley, T.L., 1998. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-ATPase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-ATPases1. *Biochim. Biophys. Acta* 1386, 65–78.
- Steininger, T.L., Kilduff, T.S., Behan, M., Benca, R.M., Landry, C.F., 2004. Comparison of hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* 27, 165–181.
- Stoyanova, I.I., Rutten, W.L., le Feber, J., 2010. Orexin-a and orexin-b during the postnatal development of the rat brain. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 81–89.
- Tsujino, N., Sakurai, T., 2009. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol. Rev.* 61, 162–176.
- Vlajkovic, S.M., Vinayagamoorthy, A., Thorne, P.R., Robson, S.C., Wang, C.J., Housley, G.D., 2006. Noise-induced up-regulation of NTPDase3 expression in the rat cochlea: implications for auditory transmission and cochlear protection. *Brain Res.* 1104, 55–63.
- Vongtau, H.O., Lavoie, E.G., Sevigny, J., Molliver, D.C., 2011. Distribution of ecto-nucleotidases in mouse sensory circuits suggests roles for nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3 in nociception and mechanoreception. *Neuroscience* 193, 387–398.
- Wang, T.F., Guidotti, G., 1998. Widespread expression of ecto-ATPase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res.* 790, 318–322.
- Website, 2015. Allen Institute for Brain Science. Allen Brain Atlas [Internet]. <http://www.brain-map.org>.
- Wieraszko, A., 1996. Extracellular ATP as a neurotransmitter: its role in synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 56, 637–648.
- Wink, M.R., Braganhol, E., Tamajusuku, A.S., Lenz, G., Zerbini, L.F., Libermann, T.A., Sevigny, J., Battastini, A.M., Robson, S.C., 2006. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience* 138, 421–432.
- Xiang, Z., Burnstock, G., 2005. Expression of P2X receptors in rat choroid plexus. *Neuroreport* 16, 903–907.
- Yamamoto, Y., Ueta, Y., Hara, Y., Serino, R., Nomura, M., Shibuya, I., Shirahata, A., Yamashita, H., 2000. Postnatal development of orexin/hypocretin in rats: brain research. *Mol. Brain Res.* 78, 108–119.
- Zimmermann, H., Zebisch, M., Strater, N., 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling* 8, 437–502.
- Zimmermann, H., 2006. Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch.* 452, 573–588.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Nataša (Ljubiša) Mitrović, rođ. Jovanović, rođena je 09.01.1986. godine u Knjaževcu, gde je završila osnovnu školu „Dimitrije Todorović- Kaplar”. Gimnaziju, opšteg smera „Laza Kostić” završila je 2005. u Novom Sadu. Iste godine upisuje se na Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju, na smer diplomirani biolog-molekularni biolog. U toku studija, nosilac je tri univerzitetske nagrade za postignut uspeh tokom studija. Diplomirala je 29.07.2009. godine sa opštim uspehom 9.03/10.0 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Diplomski rad: „Upotreba ćelijskih linija za pravljenje adenovirusnog antigena u cilju primene u serološkim reakcijama” uradila je pod rukovodstvom dr Vere Jerant-Patić i dr Zorice Svirčev u Institutu za javno zdravlje Vojvodine, Centar za virusologiju u Novom Sadu. Školske 2009/10 upisala je prvu godinu doktorskih studija na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, studijski program Neuronauke (Eksperimentalna neurobiologija-od gena do ponašanja). Od 01.01.2010. zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju INN „Vinča”.

Naučno-istraživački rad Nataše Mitrović realizovan je kroz projekte: „Signalni putevi delovanja steroidnih hormona i uticaj endogenih i egzogenih faktora na modulaciju procesa u ćelijama sisara“ (143044B, 2006-2010.) i „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama CNS-a i perifernog tkiva kod sisara“ (173044, 2011- ) finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U okviru tekućeg projekta je i istraživački zadatak koji se odnosi na izradu njene doktorske disertacije pod mentorstvom dr Ivane Grković i prof. dr Nadežde Nedeljković. Dobitnik je FENS stipendije za mlade istraživače - Studijski boravak, u trajanju od mesec dana, na odeljenju za eksperimentalnu Neurologiju, hirurgiju i translacionu medicinu, Univerzitet u Milanu-Bikoka, Monca pod rukovodstvom prof. Guido Cavaletti.

Autor je 2 i koautor 11 radova u međunarodnim časopisima, kao i brojnih međunarodnih i domaćih saopštenja.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Наташа Митровић

Број индекса Б3203/2009

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ванћелијски метаболизам аденинских нуклеотида у синаптозомима хипокампуса  
пацова – полне специфичности и улога женских полних хормона

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Наташа Митровић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3203/2009 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Ванћелијски метаболизам аденинских уклеотида у синаптозомима хипокампуса-полне специфичности и улога женских полних хормона \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ др Ивана Грковић и проф. др Надежда Недељковић \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**



У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Ванћелијски метаболизам аденинских нуклеотида у синаптозомима хипокампуса - полне специфичности и улога женских полних хормона

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**



У Београду, \_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.