

ОГЛЯДИ

УДК 577.152.3

ЕКТО-НУКЛЕОТИДАЗИ РОДИНИ ЕКТО-НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТДИФОСФОГІДРОЛАЗ: СТРУКТУРА, ЛОКАЛІЗАЦІЯ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНЕ ЗНАЧЕННЯ

С. В. ЯБЛОНСЬКА, В. К. РИБАЛЬЧЕНКО

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна
e-mail: svitlana.yablonska@yahoo.com

Екто-нуклеотидази — ензими класу гідролаз, які розщеплюють позаклітинні нуклеозидтри- та нуклеозиддифосфати. В огляді представлена коротка історія дослідження, класифікація, будова і функціональне значення екто-нуклеозидтрифосфатдифосфогідролаз (Е-НТФД-аз). Ці ензими є глікопротеїнами, що закорені в мембрані. Вони не утворюють фосфорильованої форми під час каталітичного циклу і (за аналогією з мембранними АТР-азами) формують гомоолігомерні ансамблі. Активність цих ферментів залежить від двовалентних іонів, зокрема Ca^{2+} та Mg^{2+} . Функція Е-НТФД-аз у складі екто-нуклеотидазного каскаду, до якого належать й інші нуклеотидгідролізуючі ензими, полягає в регулюванні Р2-рецепторів завдяки гідролізу їхнього ліганду, зокрема АТР. Наведено сучасні дані, в тому числі і результати власних досліджень, про вплив на активність цих ензимів різноманітних ендо- та екзогенних факторів.

Ключові слова: екто-нуклеотидази, екто-нуклеозидтрифосфатдифосфогідролази, пуринергічні/піримідинергічні рецептори, позаклітинні нуклеотиди.

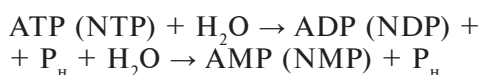
У середині минулого століття багатьма дослідниками були описані ензими, які гідролізують АТР (англ. adenosine triphosphate) та АДР (англ. adenosine diphosphate) і які локалізовані на поверхні клітин дріжджів [1], нервових клітин ссавців [2], асцитних клітин Ерліха [3], еритроцитів [4], слизової оболонки кишечника та інтактних м'язових волокон [5]. А у 1954 році В.А. Енгельгардтом був вперше запропонований термін «екто-ензим» для АТР-ази, яка локалізована на поверхні еритроцита і не впливає на рівень внутрішньоклітинного АТР [4]. Але ще у 70-ті роки минулого століття ідея про існування АТР-аз, які містять гідролізуючий сайт на зовнішньому боці плазматичної мембрани, зустрічалася скептично, оскільки вважалося, що АТР є виключно внутрішньоклітинною сполукою. На сьогодні локалізація ензимів, які розщеплюють АТР, на зовнішньому боці плазматичної мембрани клітини продемонстрована на багатьох об'єктах: клітинах печінки [6], скелетних м'язів [7, 8], яйцеводу птахів [9], клітинах плаценти людини [10], еритроцитах [11] та багатьох інших. Інформацію про ензими, які гідролізують позаклітинні нуклеозид-

три- і/чи нуклеозиддифосфати (NTP, NDP) на клітинній поверхні можна знайти в літературі під багатьма різними назвами. Це такі як екто- (Ca^{2+} - чи Mg^{2+} -залежна)-нуклеозидтрифосфатаза, нуклеозиддифосфатфосфогідролаза, аденілпірофосфатаза, АТР-пірофосфогідролаза, АТР-дифосфогідролаза, апіраза, аденозиндифосфатаза, АТР-дифосфатаза, АДР-аза, нуклеозиддифосфатаза або нуклеотидаза [12]. Часто також екто-АТР-ази в різних тканинах відносили до базальних, основних чи неспецифічних Mg^{2+} -АТР-аз. Використовувались також і різні класифікації ензимів. Але найрозповсюдженішим був термін «екто-АТР-аза», що використовується і сьогодні та описує ензими Е-типу, які гідролізують позаклітинні NTP і/чи NDP. Нуклеозидмонофосфати (NMP) і ненуклеозидні фосфати не є субстратами цих ензимів. Екто-АТР-ази характеризуються тим, що активуються іонами Ca^{2+} або Mg^{2+} , нечутливі до інгібіторів АТР-аз Р-, F- і V-типу. Було показано, що переважна частина АТР-азної активності багатьох плазматичних мембран ссавців не є АТР-азною активністю іонних pomp і виявляє характерні риси екто-АТР-аз Е-типу [13]. На відміну від АТР-аз Е-типу,

що є у рослин, мікроорганізмів і у слині кровососних комах і можуть бути легко очищені та виявляють високу специфічну активність, процедура очищення мембранозв'язаних екто-АТР-аз є проблематичною, тому в процесі дослідження вчені часто одержували протилежні результати [13].

Зважаючи на тривалу історію вивчення, на сьогодні у вітчизняній літературі бракує узагальнення сучасних відомостей про ці ензими, їхню структуру, функції та локалізацію у клітинах. Тому метою огляду стало висвітлення новітніх даних про ензими цієї групи і їхню роль у життєдіяльності клітини.

Класифікація. Нову класифікацію для ензимів екто-АТР-аз було запропоновано у 1992 році Комітетом з номенклатури Міжнародної спілки біохіміків та молекулярних біологів (Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology) (табл. 1). А у 1999 році на другому міжнародному семінарі «Екто-АТР-ази та споріднені екто-нуклеотидази», що проходив у Бельгії, було запропоновано уніфіковану номенклатуру для членів двох нових родин ензимів екто-нуклеозидтрифосфатдифосфогідролаз (Е-НТФД-аз) та екто-нуклеотидпірофосфатаз/фосфодіестераз (Е-НПФ-аз) [14, 15]. Запроваджено аббревіатури родин ензимів Е-НТФД-аз, Е-НПФ-аз та аббревіатури індивідуальних назв їхніх членів НТФД-аза1 – НТФД-азаХ та НПФ-аза1 – НПФ-азаХ відповідно (табл. 2, 3). Порядкові номери ензимів забезпечують кращу систематизацію їх у міру того як будуть відкриватися і характеризуватися нові члени їхніх родин. Реакцію, яку каталізують Е-НТФД-ази можна записати рівнянням:



В огляді зосереджено увагу на екто-нуклеозидтрифосфатдифосфогідролазах, які першими запускають каскад розщеплення позаклітинних NTP.

Особливості будови та локалізація. Хоча АТР- і/чи ADP-гідролізуюча активність на поверхні багатьох типів клітин була виявлена декілька десятиріч тому [2, 4, 5, 16], молекулярну організацію першого члена родини Е-НТФД-аз (НТФД-ази1) встановлено лише в середині 90-х років минулого століття. Цей протеїн був вперше клонований та секвенований як антиген CD39, що активує лімфоцити [17]. Пізніше було очищено та клоновано розчинну АТР-дифосфогідролазу (апіразу) з бульб картоплі і встановлено, що цей протеїн спорід-

нений не лише зі схожими ензимами деяких протозоїв, рослин та дріжджів, а також з CD39 клітин людини [18]. Після функціональної експресії CD39 клітин людини було виявлено, що цей протеїн є фактично екто-апіразою [19]. Також були очищені АТР-дифосфогідролази з підшлункової залози свині та аорти бика, амінокислотні послідовності яких були ідентичними послідовності кДНК CD39 [20]. Амінокислотна послідовність АТР-дифосфогідролази ендотеліальних клітин людини також ідентична раніше описаному і клонованому CD39 [20].

Спочатку вважалось, що існує єдина Е-НТФД-аза, що зазнає різних посттрансляційних модифікацій [21], проте незабаром були клоновані її близькі молекулярні родичі [22, 23]. Геномний аналіз людини дозволив ідентифікувати гени цих протеїнів [24], які було названо *CD39L1 – CD39L4* (like – з англ. подібний). Пізніше було ідентифіковано та охарактеризовано нові ензими родини Е-НТФД-аз [25]. На сьогодні відомо, що молекули ензимів родини Е-НТФД-аз людини кодуються вісьмома генами (*ЕНТФД*) [26]. Чотири НТФД-ази є типовими ензимами клітинної поверхні із локалізованими назовні клітини каталітичними сайтами (НТФД-ази1, 2, 3, 8). Інші чотири (НТФД-ази 4, 5, 6 і 7) локалізовані всередині клітини, але їхні каталітичні сайти обернуті в порожнини органодів мембранної природи, що є еквівалентними позаклітинному простору. А саме: апарат Гольджі, ендоплазматичний ретикулум, лізосоми та фагосоми [26].

Молекули ензимів родини Е-НТФД-аз хребетних організмів складаються з корового протеїну з M 50–60 кДа. Функціонують ці ензими як гомоолігомери, що складаються з 2–4 мономерів [13]. Наприклад, екто-АТР-аза плазматичної мембрани гепатоцитів (НТФД-аза8) містить у середньому 500 амінокислотних залишків ($M \sim 56$ кДа) [27, 28]. Молекула ензиму має від 6 до 16 потенційних сайтів аспарагін-N-глікозилювання та дві гідрофобні послідовності, одна з яких локалізована на N-кінці, інша – поблизу C-кінця поліпептиду. Обидві послідовності є якорем, що утримує ензим у мембрані [27, 28]. Структура молекули глікопротеїну НТФД-ази8 обумовлює те, що більша її частина знаходиться на зовнішньому боці плазматичної мембрани [8, 27]. Каталітична ділянка цього ензиму також локалізована на зовнішньому боці плазматичної мембрани. Активність НТФД-ази8 каналікулярної ділянки плазматичної мембрани гепатоцитів щурів у 20 разів вища за активність

Таблиця 1. Приклад номенклатури ензимів екто-АТР-аз відповідно до рекомендацій Комітету з номенклатури Міжнародної спілки біохіміків та молекулярних біологів, 1992 р. [14]

ЕС 3.6.1.3	Аденозинтрифосфатаза
Реакція:	$ATP + H_2O = ADP + P_n$
Інші назви:	Аденілпірофосфатаза, АТР-монофосфатаза, трифосфатаза, АТР-аза, Mg-залежна аденозинтрифосфатаза
Систематична назва:	АТР-фосфогідролаза
Коментарі:	Багато ензимів, що раніше перераховувались під цим номером тепер відокремлені і мають ЕС 3.6.1.32-39
ЕС 3.6.1.5	Апіраза
Реакція:	$ATP + 2H_2O = AMP + 2 \text{ ортофосфат}$
Інші назви:	АТР-дифосфатаза, аденозиндифосфатаза, ADP-аза
Систематична назва:	АТР-дифосфогідролаза
Коментарі:	Активується Ca^{2+} . Діє також на нуклеозидтрифосфати, ADP та інші дифосфати
ЕС 3.6.1.6	Нуклеозид-дифосфатаза
Реакція:	$\text{Нуклеозиддифосфат} + H_2O = \text{нуклеозидмонофосфат} + P_n$
Систематична назва:	Нуклеозид-дифосфат-фосфогідролаза
Коментарі:	Діє на IDP, GDP, UDP та D-рибозо-5-дифосфат
ЕС 3.6.1.15	Нуклеозид-трифосфатаза
Реакція:	$\text{Нуклеозидтрифосфат} + H_2O = \text{нуклеозиддифосфат} + P_n$
Систематична назва:	Неспецифічна дифосфат-фосфогідролаза
Коментарі:	Гідролізує також інші нуклеозидтрифосфати, дифосфати, тіаміндифосфат та FAD

Таблиця 2. Сучасна номенклатура та назви членів родини екто-нуклеозидтрифосфатдифосфогідролаз (Е-НТФД-ази)

Абревіатура назви ензиму (абревіатура англ. назви)	ЕС	Попередні назви
НТФД-аза1 (NTPDase1)	3.6.1.5	CD39, екто-АТР дифосфогідролаза, екто-апіраза
НТФД-аза2 (NTPDase2)	3.6.1.3	CD39L1, екто-АТР-аза
НТФД-аза3 (NTPDase3)	3.6.1.5	CD39L3, NB6
НТФД-аза4 (NTPDase4)	3.6.1.6	UDPase (hLaLP70v), hLaLP70
НТФД-аза5 (NTPDase5)	3.6.1.6	CD39L4, ER-UDPase
НТФД-аза6 (NTPDase6)	3.6.1.6	CD39L2
НТФД-аза7 (NTPDase7)	3.6.1	LALP1
НТФД-аза8 (NTPDase8)	3.6.1.5	Екто-АТР-аза жовчних каналців печінки, hATPDase

Е-НТФД-аз синусоїдальної ділянки цих мембран [29], купферових та ендотеліальних клітин судин (НТФД-аза1 і 2) [30]. Джерелом АТР для Е-НТФД-аз, локалізованих у синусоїдальній ділянці плазматичної мембрани гепатоциту, площа якої становить приблизно 70% від

загальної площі мембрани, є кров [29]. А для НТФД-ази8 каналікулярної ділянки, площа якої сягає 10–15% від загальної площі плазматичної мембрани, джерелом АТР є її секреція з гепатоцита. У плазматичних мембранах клітин печінки щура загальна Е-НТФД-азна актив-

Таблиця 3. Назви членів родини екто-нуклеотидпірофосфатаз/фосфодіестераз (Е-НПФ-аз) (ЕС 3.1.4.1+3.6.1.9)

Абревіатура назви ензиму (аббревіатура англ. назви)	Попередні назви
НПФ-аза1 (NPP1)	РС-1
НПФ-аза2 (NPP2)	Аутотаксин, PD-Ia
НПФ-аза3 (NPP3)	gp130 ^{RB13-6} , PD-IR, B10
Ймовірна НПФ4 (NPP4)	—

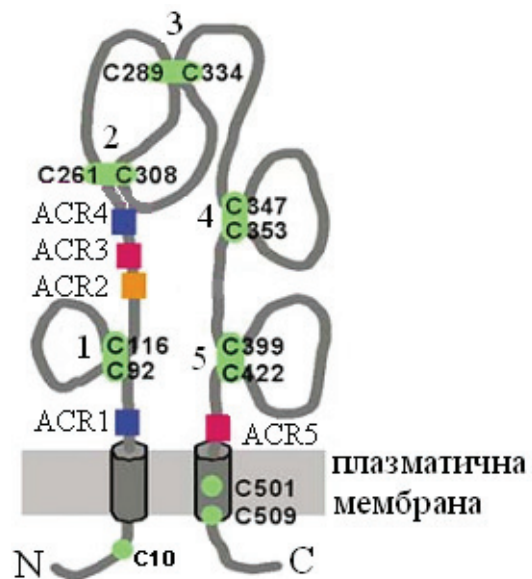
ність приблизно у 10 разів вища, ніж АТР-азна активність Ca²⁺-насоса [6].

АТР-ази як ензими гідролізу у своєму поліпептидному ланцюзі містять «консенсусну» послідовність, яка являє собою АТР-зв'язувальний домен [31]. Дві амінокислотні послідовності (8 і 13 амінокислотних залишків) у поліпептидному ланцюзі НТФД-ази8 є схожими на «консенсусну» послідовність, але цей ймовірний нуклеотидзв'язувальний домен не повністю гомологічний «консенсусній» послідовності іон-транспортувальних АТР-аз [27, 31]. Можливо, що така «неповна» гомологічність нуклеотидзв'язувального домену і є причиною широкої субстратної специфічності Е-НТФД-аз порівняно з високою специфічністю до АТР іон-транспортувальних АТР-аз. Спільною ознакою усіх Е-НТФД-аз є п'ять висококонсервативних ділянок в їхній поліпептидній послідовності, які зветься «апіразні консервативні регіони» (apyrase conserved regions: ACR1 – ACR5, рис.) [18, 32, 33], що залучені в каталітичний процес.

Е-НТФД-ази легко формують гомоолігомерні ансамблі. Зокрема, НТФД-ази1,2,3 формують димерні, тримерні та тетрамерні структури [33–35], які виявляють підвищену (порівняно до мономерних форм) каталітичну активність [36, 37], яка істотно знижується за порушення олігомеризації [34, 35]. НТФД-ази1,2,3 і 8 міцно за'якорені в мембрані за допомогою двох трансмембранних доменів. На прикладі НТФД-ази1 показано, що ці домени є важливими для підтримання каталітичної активності і субстратної специфічності [33, 38, 39]. Обидва домени взаємодіють як у межах мономера, так і між мономерами у складі гомоолігомерних ансамблів. Вони можуть скоординовано рухатись під час процесу зв'язування нуклеотидів і гідролізу їх [38, 40], що індукує

конформаційні зміни молекул ензимів [41]. Зміни конформацій молекул спричинюють рух двох основних позаклітинних доменів один відносно одного (рисунок) [42]. Зміни в четвертинній структурі і взаємодії субодиниць можуть, таким чином, заважати взаємодії АСР-ділянок, які залучені у зв'язування та гідроліз субстратів.

Міжклітинна передача сигналів та функціональне значення Е-НТФД-аз. Міжклітинна передача сигналів за участю позаклітинних нуклеотидів є однією з найрозповсюдженіших у тканинах. Адже кожна клітина в організмі ссавців вивільняє ці нуклеотидні медіатори та містить рецептори до них. Позаклітинні нуклеозидтрифосфати, такі як АТР, АДР, УТР та UDP, відіграють важливу роль у різних біологічних процесах в активації cysLT1R і cysLT2R (цистеїніл-лейкотриєнові рецептори типу 1 і 2), GPCR17 (рецептор 17, спряжений з G-протеїном) [43] та пуринергічних/піримідинергічних P2-рецепторів [44]. Останні відіграють особливо важливу роль у міжклітинній передачі сигналів за участю NTP.



Схематичне зображення структури НТФД-ази3, що демонструє п'ять позаклітинних дисульфідних зв'язків (позначені зеленим кольором), які ймовірно є консервативними у НТФД-ази1-3,8, так само як і АСР-ділянки та вільні сульфгідрильні групи внутрішньомембранних ділянок і N-кінцевої цитоплазматичної ділянки. С – цистеїн, АСР (apyrase conserved region) – «апіразний консервативний регіон» (наведено з дозволу авторів [113]).

Є дві головні родини пуринергічних/піримідинергічних рецепторів. Перша складається із семи іонотропних підтипів рецепторів (P2X₁₋₇), що є лігандзалежними іонними каналами, проникними для Na⁺, K⁺ та Ca²⁺. Друга родина складається із восьми метаболічних підтипів рецепторів (P2Y_{1,2,4,6,11-14}), що є рецепторами, спряженими з G-протеїном, які ініціюють активацію фосфоліпази C, протеїнкінази C та аденілатциклази [45, 46]. Деякі P2Y-рецептори індукують передачу сигналу через інозитолтрифосфатний шлях, опосередкований внутрішньоклітинним Ca²⁺ [47]. P2X-рецептори взаємодіють лише з АТР, P2Y-рецептори можуть активуватися АТР, АДФ, УТР, UDP, ІТР та пентозами нуклеозидів, хоча специфічність до агоністів варіює між підтипами рецепторів та видами тварин [48].

P2-рецептори запускають та опосередковують короткотривалі (гострі) відповіді, що впливає на клітинний метаболізм, адгезію, активацію чи міграцію клітин. Крім того, передача сигналу за участю пуринергічних/піримідинергічних рецепторів впливає на інші триваліші відповіді, включаючи проліферацію клітин, диференціацію, апоптоз, деякі запальні стани та розвиток дегенеративних неврологічних хвороб [45, 49].

Таким чином, через P2-рецептори позаклітинні нуклеотиди регулюють численні процеси у тканинах, включаючи онтогенез, кровотік, секрецію, запалення, регуляцію об'єму клітини та імунні відповіді [45, 50].

У багатьох тканинах і клітинах екто-нуклеотидази складають переважну частину локалізованого на поверхні клітини нуклеотидгідролізуючого каскаду. Цей багатокомпонентний каскад ініціюється Е-НТФД-азами і може закінчуватись екто-5'-нуклеотидазою (CD73; 3.1.3.5), яка гідролізує нуклеозидмонофосфати [15, 51]. Остання разом із аденозіндезаміназою (3.5.4.4; екто-ензим, що перетворює аденозин до інозину), регулюють концентрацію аденозину локально, біля клітини та у плазмі [52]. Отже, нуклеотиди можуть швидко розщеплюватися до нуклеозидів [53], які, у свою чергу, впливають на інші рецептори. Наприклад, аденозин діє як сигнальна молекула – молекула активатор чотирьох аденозинових рецепторів A₁, A_{2a}, A_{2b} і A₃, що стимулюють аденілатциклазну активність [54]. Таким чином, завдяки екто-нуклеотидазам в ефект дії може залучатись і ефект дії продукту його гідролізу – аденозину, наприклад АТР.

Зниження активності Е-НТФД-аз призводить до зменшення швидкості розпаду нуклео-

зидтрифосфатів, наприклад АТР, і, відповідно, збільшення сили і тривалості дії АТР на P2-рецептори. І навпаки, підвищення активності Е-НТФД-аз зменшить вплив АТР на рецептори. Тому сполуки, що пригнічують активність Е-НТФД-аз будуть підсилювати, а сполуки, які активують ензим, послаблювати P2-рецепторопосередковані ефекти [55]. Крім того, колокалізація на поверхні клітини екто-5'-нуклеотидази, P2-рецепторів і Е-НТФД-аз забезпечує регуляцію передачі сигналу як через АТР, так і через аденозин [56]. Наприклад, каналікулярна НТФД-аза8 гепатоцитів разом із екто-5'-нуклеотидазою та нуклеозидними транспортерами в жовчних каналцях відіграють важливу роль у передачі сигналів позаклітинними нуклеотидами, що забезпечує регуляцію секреції жовчі в печінці [30]. А фібробласти воротної вени регулюють P2Y-рецепторопосередковану проліферацію епітеліальних клітин жовчного протоку через регуляцію експресії НТФД-ази2 [57]. Е-НТФД-ази, що функціонально взаємодіють з P2Y-рецепторами [58] можуть також колокалізуватись із рецепторами, спряженими з G-протеїнами в ліпідних рафтах і, можливо, кавеолах [59, 60].

Е-НТФД-ази відіграють важливу роль у регуляції агрегації тромбоцитів, відторгнення трансплантатів та виживанні паразитів. Вплив на ці ензими відповідних активаторів та блокаторів може використовуватись під час лікування атеросклерозу, шистосомозу та малярії. Є дані, які свідчать про можливу роль Е-НТФД-аз у функціонуванні лімфоцитів, слухових реакціях, хворобах нирок, епілепсії і пухлиноутворенні [13].

Ефекти позаклітинних нуклеотидів можуть перекриватись, принаймні частково, з ефектами факторів росту судин, запальних цитокінів, молекул адгезії та оксиду азоту. Нуклеотидопосередкована активація може бути синергічною з дією поліпептидних факторів росту, наприклад фактором росту тромбоцитів (PDGF – Platelet-derived growth factor), основним фактором росту фібробластів (bFGF – Basic fibroblast growth factor) та інсуліном. Передача сигналу позаклітинними нуклеотидами всередину клітини опосередковується фосфоліпазою C та D, діацилгліцеролом, протеїнкіназою C, позаклітинними сигналрегулюючими кіназами, фосфатидилінозитол-3-кіназою, мітогенактивуючими кіназами Rho та ін. [26, 61].

Передача сигналів позаклітинними нуклеотидами контрастує з унікальною специфічністю дії пептидних гормонів та інших біоло-

гічно активних сполук до своїх конкретних рецепторів [52]. Для пуринергічної/піримідинергічної сигналізації результат дії нуклеотидів визначається трьома основними складовими: 1) джерелом позаклітинних нуклеотидів [62]; 2) експресією специфічних рецепторів до цих нуклеотидних трансмітерів та їхніх похідних [63]; 3) певними екто-нуклеотидазами, що визначає клітинну відповідь шляхом послідовної деградації позаклітинних нуклеотидів та нуклеозидів [12, 53, 56].

Е-НТФД-ази плазматичної мембрани виконують і деякі інші функції. Наприклад, НТФД-аза1 безпосередньо активує протеїн Ras та проліферацію клітин за регенерації печінки після часткової гепатектомії [64]. N-кінці цих ензимів мають також консенсусні послідовності, які фосфорилуються протеїнкіназою C [22], що, у свою чергу, може мати додаткове функціональне значення. C-кінцева послідовність НТФД-ази1 містить PDZ-домен (акронім, що поєднує перші букви назв трьох протеїнів: post synaptic density protein – (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* – (DlgA) та zonula occludens-1 protein), який часто знаходиться в комбінації з іншими доменами, що взаємодіють з протеїнами, наприклад, доменом SRC гомології 3 (SH3) та фосфотирозинзв'язувальним доменом (РТВ). Разом вони об'єднуються в комплекси, що сприяють передачі сигналів у клітину чи визначають локалізацію рецепторів [65].

Каталітичні властивості. Е-НТФД-ази відрізняються одна від одної як за клітинною локалізацією, так і за каталітичними властивостями. Чотири ензими НТФД-аза1,2,3,8, що локалізовані на поверхні клітини, відрізняються за специфічністю до субстрату (NTP), і за регуляцією активності дивалентними катіонами, і за утворенням продуктів розпаду (NDP, NMP) (табл. 4). Так, таблиця 4 ілюструє як змінюється ефективність гідролізу нуклеозидтрифосфатів, зокрема АТР та УТР, залежно від того, які іони є в інкубаційному середовищі, Mg^{2+} чи Ca^{2+} [66]. Максимальна активність Е-НТФД-аз виявляється при мілімолярних концентраціях катіонів Ca^{2+} чи Mg^{2+} . За відсутності цих катіонів ензими повністю інактивуються [15, 66]. Сумісне додавання цих катіонів не спричинює адитивного ефекту [5, 7, 28, 67, 68]. На відміну від НТФД-зи1 і НТФД-ази2, НТФД-аза3 та НТФД-аза8 мишей активуються переважно іонами Ca^{2+} [68]. Інші катіони (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) можуть заміщати Ca^{2+} і Mg^{2+} , але з меншою ефективністю. Одновалентні іони Na^+ чи K^+ не впливають на активність ензиму [12, 29]. Усі Е-НТФД-ази виявляють

максимальну активність при рН в межах 7,0–8,5 [66]. Але є деякі відмінності для конкретних представників.

Е-НТФД-ази досить стійкі до обробки протеазами [12, 27]. Трипсин, хімотрипсин, папаїн, субтилзін, еластаза та ін. не спричинюють значного зниження (менше 20%) Е-НТФД-азної активності, що, можливо, є наслідком захисту від дії позаклітинних протеїназ окремими структурами молекули ензиму. Оскільки Е-НТФД-ази є глікопротеїнами [12, 27], їхня низька чутливість до протеолітичних ензимів можливо обумовлена наявністю вуглеводневих ланцюгів у складі їхньої молекули.

Всі Е-НТФД-ази гідролізують NTP, а їхня гідролазна активність істотно коливається в межах підтипів ензимів (табл. 5). Так, НТФД-аза1 гідролізує АТР та АDP майже однаково добре, НТФД-аза3 виявляє вищу специфічність до АТР, ніж до АDP, а НТФД-аза2 є високоспецифічною до АТР і тому спочатку була класифікована як екто-АТР-аза [15, 66]. НТФД-аза1 гідролізує АТР майже одразу до АМР з короткотривалим утворенням невеликої кількості вільного АDP. Ця функціональна властивість дає можливість уникнути активації P2Y-рецепторів, чутливих до NDP. Цікаво, що значна кількість UDP акумулюється, коли UDP гідролізується НТФД-азою1 [66]. На відміну від НТФД-ази1, у процесі гідролізу АТР НТФД-азою2 вивільняється АDP, який потім акумулюється і повільно дефосфорилується до АМР. З одного боку, це призводить до видалення агоніста NTP-чутливих P2Y-рецепторів. З іншого боку, це веде до генерації агоністів нуклеозиддифосфатчутливих рецепторів, таких, наприклад, як P2Y₁- і P2Y₁₂-рецепторів тромбоцитів [69]. Ензиматична активність НТФД-ази3 та НТФД-ази8 веде до утворення проміжних продуктів їхніх реакцій, що сприяє короткотривалому акумулюванню NDP з одночасною присутністю NTP. Такі відмінності між каталітичними властивостями підтипів ензимів спричинені відмінностями в амінокислотній послідовності у вторинній, третинній та четвертинній структурах молекул ензимів [40, 70]. NMP гідролізуються до нуклеозидів та Рн екто-5'-нуклеотидазою (CD73), ензимом, що локалізований на клітинній поверхні і закорнений в мембрану глікозилфосфатидилінозитолом [71].

Інгібітори. Е-НТФД-ази не чутливі до інгібіторів іонних транспортерів: олігоміцину, ванадату, N-етилмалеїміду, *n*-хлоромеркурібензоату та ін. [28, 29]. Інгібування іонтранспортвальних АТР-аз (Na^+ , K^+ - та Ca^{2+} -АТР-ази

Таблиця 4. Співвідношення гідролізу NTP/NDP для E-НТФД-аз плазматичних мембран [66]

Ензим	Катіон	Людина чи щур	Миші
<i>Співвідношення АТР/АДР</i>			
НТФД-аза1	Ca ²⁺	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2
	Mg ²⁺	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1
НТФД-аза2	Ca ²⁺	7,2 ± 1,8	9,5 ± 1,8
	Mg ²⁺	3,5 ± 1,0	11,8 ± 2,4
НТФД-аза3	Ca ²⁺	4,3 ± 0,1	2,1 ± 0,4
	Mg ²⁺	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,3
НТФД-аза8	Ca ²⁺	2,2 ± 0,1*	1,4 ± 0,1
	Mg ²⁺	4,1 ± 0,7*	3,1 ± 1,2
<i>Співвідношення УТР/УДР</i>			
НТФД-аза1	Ca ²⁺	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,7
	Mg ²⁺	1,9 ± 0,4	2,6 ± 0,5
НТФД-аза2	Ca ²⁺	9,3 ± 1,3	15,1 ± 4,9
	Mg ²⁺	12,8 ± 2,0	13,4 ± 4,5
НТФД-аза3	Ca ²⁺	6,2 ± 0,5	2,4 ± 0,8
	Mg ²⁺	2,8 ± 0,5	1,7 ± 0,3
НТФД-аза8	Ca ²⁺	4,8 ± 0,2*	1,9 ± 0,2
	Mg ²⁺	9,2 ± 2,4*	1,7 ± 0,4

Примітка: * у щурів. Співвідношення представлені в таблиці – це співвідношення кількості субстрату реакції (нуклеозидтрифосфату) до продукту (нуклеозиддифосфату), яке ілюструє ефективність гідролізу. Середні значення даних одержані із щонайменше двох експериментів, виконаних із трикратною повторністю. Дослідження виконувались із використанням плазмід, які містили гени відповідних E-НТФД-аз людини, миші та щура. Плазміди трансфектували у клітини лінії COS-7 (лінія клітин нирки зеленої африканської мавпи)

плазматичної мембрани і Ca²⁺-АТР-ази саркоплазматичного ретикулу), наприклад ванадатом, зумовлено його взаємодією із сайтом фосфорилування інтермедіату, що є консервативним у всіх цих ензимів [31]. У молекулах E-НТФД-аз, які не інгібуються ванадатом, такого сайту не виявлено.

Відома велика кількість сполук, здатних змінювати і пригнічувати гідроліз нуклеотидів E-НТФД-азами. До них належать аналоги нуклеотидів та інгібітори P2-рецепторів [72, 73]. Але на сьогодні відома лише одна сполука, яку можна вважати інгібітором, це структурний аналог АТР – 6-N,N-діетил-D-β,γ-дибромометилен АТР (ARL67156, FPL67156 чи AR-c67156) [74]. Він вперше був описаний як селективний інгібітор екто-АТР-ази клітин крові, а пізніше було доведено його здатність інгібувати екто-АТР-ази різних тканин різних видів організмів: мембрани гладеньких м'язів сім'явивідного протоку миші, кроля та мурчачка [75, 76], вищих червікальних гангліїв щурів [77] і хромафінних клітин бика [74]. Але при

цьому ARL67156 не блокує АТР-азну активність ні плазматичних мембран клітин серця мурчачка [78], ні вузловатого ганглія щура [77].

В літературі представлені суперечливі відомості стосовно специфічності ARL67156. Так, в деяких публікаціях він описаний як «неспецифічний інгібітор екто-нуклеотидаз» [79] або «неспецифічний інгібітор екто-трифосфатнуклеотидази» [80], а в інших як «інгібітор екто-НТФД-аз» [75], «специфічний інгібітор НТФД-ази1» [81], «інгібітор НТФД-азної1 та НТФД-азної2 активності деяких тканин» [80]. Однією з можливих причин таких суперечливих даних є те, що вплив ARL67156 досліджувався і на нативних мембранозв'язаних формах ензиму, і солюбілізованих формах. Мембранне оточення E-НТФД-аз є важливим для прояву їхньої активності та субстратної специфічності [82], можливо з цим пов'язані відмінності в його здатності інгібувати ці ензими.

Після відкриття ARL67156 було ідентифіковано чотири члени родини екто-нуклеозидтрифосфатдифосфогідролаз – НТФД-азу1, 2, 3

Таблиця 5. Кінетичні параметри E-НТФД-аз людини, щура та миші [66]

Ензим	АТР		АДР		УТР		УДР	
	K_m , мкМ/л	V_{max} , ум. од./мг протеїну	K_m , мкМ/л	V_{max} , ум. од./мг протеїну	K_m , мкМ/л	V_{max} , ум. од./мг протеїну	K_m , мкМ/л	V_{max} , ум. од./мг протеїну
лНТФД-аза1	17 ± 1	0,94 ± 0,02	22 ± 1	0,75 ± 0,01	47 ± 4	1,05 ± 0,03	135 ± 10	0,79 ± 0,04
лНТФД-аза2	70 ± 2	2,3 ± 0,03	НВ	НВ	393 ± 30	3,9 ± 0,2	НВ	НВ
лНТФД-аза3	75 ± 10	0,79 ± 0,03	31 ± 1	0,18 ± 0,01	58 ± 6	0,57 ± 0,03	67 ± 3	0,17 ± 0,01
щНТФД-аза8	46 ± 5	0,74 ± 0,04	265 ± 20	0,61 ± 0,03	124 ± 10	1,17 ± 0,06	1780 ± 140	1,37 ± 0,08
мНТФД-аза1	12 ± 1	1,78 ± 0,04	13 ± 1	1,12 ± 0,02	49 ± 2	4,0 ± 0,11	92 ± 6	2,15 ± 0,09
мНТФД-аза2	37 ± 2	1,7 ± 0,05	НВ	НВ	49 ± 2	3,9 ± 0,1	НВ	НВ
мНТФД-аза3 [110]	11 ± 2	0,35 ± 0,02	19 ± 2	0,2 ± 0,01	10 ± 1	0,3 ± 0,01	27 ± 2	0,14 ± 0,01
мНТФД-аза8 [111]	13 ± 6	0,82 ± 0,02	41 ± 6	0,95 ± 0,08	47 ± 1	1,13 ± 0,02	171 ± 15	1,08 ± 0,02

Примітка. НВ – не встановлено, л – людина, щ – щура, м – миша; 1 умовна одиниця = 1 мкмоль субстрату/хв. Дослідження виконувались із використанням плазмід, які містили гени відповідних E-НТФД-аз людини, миші та щура. Плазмідні трансфектували у клітини лінії COS-7 (лінія клітин нирки зеленої африканської мавпи)

та 8 – і два члени родини екто-нуклеотидпірофосфатаз/фосфодіестераз – НПФ-азу1 та 3 [26, 66, 51]. ARL67156 є слабким конкурентним інгібітором НТФД-ази1, 3 та НПФ-ази1 людини з K_i 11±3, 18±4 і 12±3 мкМ відповідно [83]. Для пригнічення активності НТФД-ази2 та 8 та НПФ-ази3 цей інгібітор є мало ефективним.

До інших інгібіторів E-НТФД-аз належить 8-тіобутирил-аденозин-5'-трифосфат (8-BuS-АТР) [84] та 1-нафтол-3,6-дисульфонова кислота (BG0136) [72]. Але здатність цих сполук пригнічувати активність E-НТФД-аз сильно відрізняється для різних членів їхньої родини [85].

Тому пошук селективних інгібіторів екто-нуклеотидаз триває і до сьогодні, хоч ефективного специфічного інгібітора цих ензимів ще не знайдено. Часто дослідники зіштовхуються з явищем, коли інгібітор є ефективним лише для екто-нуклеотидаз певних тканин, клітин чи ізоформ ензиму і не виявляє інгібуючої дії на інші. Так, виявлено нечутливу і чутливу до сполук ртуті E-НТФД-азу, причому остання виявляється у трьох лініях дрібноклітинного раку легенів [86]. Крім того, чутлива до сполук ртуті E-НТФД-аза, яку виявлено в лінії клітин гепатоми людини [87], інгібується *n*-хлоромеркуріфенілсульфонатом (pCMPMS).

Структурно-функціональні модифікації. Активність E-НТФД-аз зазнає впливу різноманітних факторів. Так, вона пригнічується і під впливом оксидативного стресу [88]. Ці ензими зазнають також певної протеолітичної дії, що підвищує їхню активність, та різного глікозилування, що, очевидно, є необхідним для мембранної локалізації [33]. АТР-гідролізуючі члени родини E-НТФД-аз, проходячи через ендоплазматичний ретикулум та апарат Гольджі є каталітично неактивними і не порушують АТР-залежні процеси в цих органелах. Вони стають каталітично активними лише досягнувши клітинної поверхні [89].

N-кінцевий внутрішньоклітинний домен ензиму, наприклад НТФД-ази1, пальмітиюваний. А вкорочені форми цього ензиму, в яких не вистачає цієї N-кінцевої ділянки та амінокислотного залишку *Цис*₁₃, пальмітиювання не зазнають. Ця посттрансляційна модифікація, очевидно, є конститутивною і впливає на інтегральну мембранну локалізацію ензиму в ліпідних рафтах [90, 91]. Це робить ймовірним рециркулювання НТФД-ази1 із/у клітинну мембрану [92], що модулює сигнальні відповіді пуринергічного/піримідинергічного каскаду. НТФД-аза1 виявляє здатність до мультимеризації [37], яка полегшується її ацилюванням, і

здійснюється завдяки міжмолекулярним взаємодіям холестеролу і сфінголіпідзбагачених мікродоменів плазматичної мембрани [93]. Так, показано, що нестача холестеролу в мембрані призводить до сильного інгібування ензиму [91]. Розташування пальмітійованої НТФД-ази1 в ліпідних рафтах може впливати на певні G-протеїнспряжені рецептори і, таким чином, регулювати шляхи передачі сигналу у клітині. На відміну від НТФД-ази1, НТФД-ази3 та 2 не мають у складі свого поліпептидного ланцюга такого залишку *цис*, який би зазнавав таких посттрансляційних модифікацій.

Активність екто-АТР-ази (НТФД-ази8) плазматичних мембран гепатоцитів щурів змінюється під впливом гербіциду 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) в діапазоні концентрацій 10^{-9} – 10^{-4} М, при цьому спостерігається параболічна концентраційна залежність активності ензиму [94]. Активність екто-АТР-ази порушується також і після субхронічного інтрагастрального впливу 2,4-Д, регуляторів росту рослин івіну (N-оксид-2,6-диметил-піридин) та потейтину (молекулярний комплекс N-оксид-2,6-диметил-піридину із сукцинатом), сукцинату натрію та урсорезоксихолевої кислоти. Екто-АТР-азна активність плазматичних мембран клітин печінки зазнає впливу і гетерополядерних сполук Cu (II) та Co (III) з діетаноламіном ($[\text{Cu}_2\text{Co}_2(\text{H}_2\text{Dea})_2(\text{Dea})_4]^+$), що містять як аніонні замісники Cl^- , Br^- , I^- , NCS^- , CH_3COO^- [95].

Представлені вище результати досліджень свідчать, що екто-АТР-ази (НТФД-ази) є дуже чутливими до ксенобіотиків. Завдяки такій чутливості ксенобіотики можуть спричинити порушення передачі сигналу від позаклітинних нуклеотидів у клітину.

Транскрипційна регуляція експресії Е-НТФД-аз. Члени родини Е-НТФД-аз конститутивно експресуються в багатьох тканинах. Так, НТФД-ази1 є в ендотелії вен, артерій, В-клітинах, дендритних клітинах і деяких субпопуляціях Т-клітин [56, 96]. Регуляція експресії НТФД-ази1 тісно пов'язана із запальними цитокінами, оксидативним стресом і гіпоксією [97]. Е-НТФД-азна активність ендотеліальних клітин підвищується під впливом ацетилсаліцилової кислоти *in vitro* [98]. Транскрипція НТФД-ази2 в лінії клітин гепатоми мишей індукується 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*p*-діоксином (ТХДД) [99], тоді як він не впливає на експресію НТФД-ази1, НТФД-ази3 та інших Е-НТФД-аз і не індукує експресію НТФД-ази2 в багатьох інших лініях клітин [100]. Транскрипція НТФД-ази1 і 2 (CD39 і

CD39 1) значно зростає при хронічних панкреатитах та при раку підшлункової залози. Ці ензими переважно пов'язані із судинами і стромальними елементами в патологічній тканині [46]. Високий рівень мРНК протеїну CD39 позитивно корелює з виживанням хворих на рак підшлункової залози після резекції. В клітинах Сертолі щурів експресія НТФД-ази2 активується фолікулостимулюючим гормоном і цАМР [101] та пригнічується при біліарному цирозі [102]. В епідермальних клітинах карциноми збільшується кількість молекул каскаду ензимів гідролізу позаклітинних нуклеотидів після періодичної обробки їх позаклітинним АТР [103]. Це свідчить, що субстрат сам по собі може впливати на експресію свого власного каскаду гідролізу.

Важливим регулятором експресії НТФД-ази1 (CD39) макрофагів є цАМР [104]. Він активує протеїнкіназу А, яка, у свою чергу, активує інші кінази, такі як фосфатидил-інозитол-3-кіназу та ERK (extracellular-signal-regulated kinases – кіназа, що регулюється позаклітинними сигналами). Це запускає подальший каскад передачі сигналу, що зумовлює фосфорилування транскрипційних факторів CREB1 (cAMP response element-binding) та ATF2 (Activating transcription factor 2), які зв'язуються із промотором гена *Cd39* і підвищують його транскрипцію. Фактор транскрипції Sp1 також відіграє вирішальну роль у індукованій гіпоксією підвищеній експресії НТФД-ази1 [105], та промотор гена НТФД-ази3, яка регулюється гормоном трийодтироніном, має декілька сайтів зв'язування для Sp1 [106].

Активність Е-НТФД-ази може слугувати вірогідним показником онкогенного потенціалу епітеліальних клітин печінки [107]. Так, дослідження розподілення Е-НТФД-азної активності в зонах початкових змін та в самих пухлинних клітинах малігнізованої гепатоми, спричиненої впливом інтрагастрального введення гепатокарциногену N,N'-диметиламіноазобензену свідчать, що на відміну від нормальних клітин печінки, в яких Е-НТФД-азна активність (орієнтована в жовчні каналці) присутня лише на поверхні клітинних мембран зони передпухлинних змін, яка є місцем обширної диференціації, активність ензиму виявляється на всій поверхні клітини. Це свідчить про те, що зміни у розподілі молекул Е-НТФД-аз на поверхні клітин пов'язані з ранніми подіями неопластичного розвитку. Крім того, преонкогенні культури клітин позбавлені екто-ензиматичної активності і мають гладеньку поверхню, а трансформовані клі-

тини на поверхні мембрани мають вирости та мікроворсинки, на яких і концентруються Е-НТФД-ази [107]. Експресія НТФД-ази підвищена в меланомах і поступово зростає із прогресією пухлини [108], а посилена активність ензиму стимульованих ендотеліальних і мезангіальних клітин пригнічується глікокортикостероїдами [109].

Ще однією з причин, чому Е-НТФД-ази можуть бути залучені в контроль клітинного росту і малігнізацію є те, що один із їхніх субстратів, а саме АТР, яка є синергістом факторів росту [12], виявляє мітогенну дію, що було показано на мезангіальних клітинах нирок щурів [110] і низці клітинних ліній ссавців.

Отже, основна роль локалізованих на поверхні клітин Е-НТФД-аз полягає в контролі концентрації позаклітинних нуклеотидів, які є агоністами пуринергічних/піримідинергічних рецепторів. Е-НТФД-ази конкурують з P2-рецепторами за пул нуклеотидів ендogenous походження [111] і шляхом їхнього гідролізу модулюють функції цих рецепторів [112]. Таким чином, ці ензими залучені в регуляцію низки процесів, включаючи розвиток організму, кровоплин, секрецію, запалення, регуляцію об'єму клітини та імунні відповіді. Детальніше вивчення Е-НТФД-аз з метою усунення суперечливих відомостей і встановлення ролі цих ензимів у нормі та за патологічних станів, а також регуляції активності їх ендogenous та екзогенними чинниками становить великий інтерес для майбутніх досліджень.

ЭКТО-НУКЛЕОТИДАЗЫ СЕМЕЙСТВА ЭКТО-НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТДИ-ФОСФОГИДРОЛАЗ: СТРУКТУРА, ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

С. В. Яблонская, В. К. Рыбальченко

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: svtlana.yablonska@yahoo.com

Экто-нуклеотидазы – энзимы класса гидролаз, которые расщепляют внеклеточные нуклеозидтри- и нуклеозиддифосфаты. В обзоре представлены краткая история исследования, их классификация, строение и функциональное значение экто-нуклеозидтрифосфатдифосфогидролаз (Э-НТФД-аз). Эти энзимы являются гликопротеинами, заякореными в мембрану. Они не образуют фосфорилированной формы во время каталитического цикла и, по аналогии с мембранными АТР-азами, формируют

гомоолигомерные ансамбли. Активность этих энзимов зависит от двухвалентных ионов, в частности Ca^{2+} и Mg^{2+} . Функция Э-НТФД-аз в составе экто-нуклеотидазного каскада, который включает и другие нуклеотидгидролизующие энзимы, заключается в регулировании P2-рецепторной передачи информации через гидролиз их лиганда, в частности АТР. Приведены данные о влиянии на активность этих энзимов различных эндо- и экзогенных факторов.

Ключевые слова: экто-нуклеотидазы, экто-нуклеозидтрифосфатдифосфогидролазы, пуринергические/пиридинергические рецепторы, внеклеточные нуклеотиды.

ECTO-NUCLEOTIDASES OF ECTO-NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE FAMILY: STRUCTURE, LOCALIZATION AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE

S. V. Yablonska, V. K. Rybalchenko

Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: svtlana.yablonska@yahoo.com

Summary

Ecto-nucleotidases are enzymes of hydrolase class. They split extracellular nucleoside tri- and diphosphate. In this review a short history of these enzymes investigation, classification, structure, and functional significance of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDase) has been presented. These enzymes are glycoproteins anchored in membranes. They do not form phosphorylated enzyme's form during catalytic circle, and (by analogy with membrane-bound ATPases) form homooligomeric ensembles. Activity of these enzymes depends on bivalent ions, in particular Ca^{2+} and Mg^{2+} . E-NTPDases function in the composition of ecto-nucleotidase cascade that contains other nucleotide-hydrolyzing enzymes. They regulate P2-receptors by hydrolyzing its ligand specifically ATP. Both modern information and results of our investigation about influence of different endogenous and exogenous factors on activity of these enzymes has been presented.

Key words: ecto-nucleotidases, ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases, purinergic/pyrimidinergic receptors, extracellular nucleotides.

1. Rothstein A., Meier R. // J. Cell. Comp. Physiol. – 1948. – 32. – P. 77–95.

2. *Cummins J., Hyden H.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1962. – **60.** – P. 271–283.
3. *Wallach D. F. H., Ullrey D.* // *Ibid.* – 1962. – **64.** – P. 526–539.
4. *Венкстерн Т. В., Энгельгардт В. А.* // Докл. АН СССР. – 1955. – **102**, N 1. – С. 133–136.
5. *Куликова Н. В., Рыбальченко В. К.* Екто-АТФазная активность клеток и тканей. – К., 1986. – Деп. В Укр. НИИНТИ 29.10.86. №2422-Ук86. – 30 с.
6. *Lin S. H., Russell W. E.* // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**, N 25. – P. 12253–12258.
7. *Caldwell C. C., Davis M. D., Knowles A. F.* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1999. – **362**, N 1. – P. 46–58.
8. *Knowles A. F., Nagy A. K., Strobel R. S. et al.* // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – **269.** – P. 2373–2382.
9. *Strobel R. S., Nagy A. K., Knowles A. F. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271.** – P. 16323–16331.
10. *Christoforidis S., Papamarcaki T., Galaris D. et al.* // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – **234.** – P. 66–74.
11. *Frassetto S. S., Dias R. D., Sarkis J. J.* // *Mol. Cell Biochem.* – 1993. – **129**, N 1. – P. 47055.
12. *Plesner L.* // *Int. Review Cytol.* – 1995. – 158. – P. 141–214.
13. *Plesner L., Kirley T. L., Knowles A. F.* / *Ecto-ATPases: recent progress on structure and function* – New York: Publisher «Plenum», 1997. – 294 p.
14. *Zimmermann, H., Beaudoin, A. R., Bollen et al.* Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface. / In: *Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases.* Edited by van Duffel L., Lemmens R.M. – Shaker Publishing BV – 2000 – P. 1–8.
15. *Zimmermann H.* // *Drug Dev. Res.* – 2001. – **52.** – P. 44–56.
16. *Ziganshin A. U., Hoyle C. H. V., Burnstock G.* // *Ibid.* – 1994 – **32.** – P. 134–146.
17. *Maliszewski C. R., DeLepesse G. J. T., Schoenborn M. A. et al.* // *J. Immunol.* – 1994. – **153.** – P. 3574–3583.
18. *Handa M., Guidotti G.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – 218. – P. 916–923.
19. *Wang T.F., Guidotti G.* // *J. Biol. Chem.* – 1996. – 271. – P. 9898–9901.
20. *Kaczmarek E., Koziak K., Sévigny J. et al.* // *Ibid.* – P. 33116–33122.
21. *Wang T.F., Rosenberg P.A., Guidotti G.* // *Mol. Brain Res.* – 1997. – **47.** – P. 295–302.
22. *Kegel B., Braun N., Heine P. et al.* // *Neuropharmacol.* – 1997. – **36.** – P. 1189–1200.
23. *Kirley T. L.* // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272.** – P. 1076–1081.
24. *Chadwick B. P., Williamson J., Sheer D. et al.* // *Mamm. Genome* – 1998. – **9.** – P. 162–164.
25. *Bigonnesse F., Lévesque S.A., Kukulski F. et al.* // *Biochemistry USA.* – 2004. – **43.** – P. 5511–5519.
26. *Robson S.C., Sévigny J., Zimmermann H.* // *Purinergic Signal.* – 2006. – **2.** – P. 409–430.
27. *Lin S.H., Guidotti G.* // *J. Biol. Chem.* – 1989. – **264**, N 24. – P. 14408–14414.
28. *Heine P., Braun N., Heilbronn A., Zimmermann H.* // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – **262.** – P. 102–107.
29. *Lin S. H.* // *J. Biol. Chem.* – 1989. – **264**, N 24. – P. 14403–14407.
30. *Shull G. E., Greeb J.* // *Ibid.* – 1988. – **263.** – P. 8646–8657.
31. *Fausther M., Lecka J., Kukulski F. et al.* // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2007. – **292**, N 3. – P. G785–G795.
32. *Vasconcelos E. G., Ferreira S. T., de Carvalho T. M. U. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271.** – P. 22139–22145.
33. *Schulte am Esch J., Sévigny J., Kaczmarek E. et al.* // *Biochemistry USA.* – 1999. – **38.** – P. 2248–2258.
34. *Grinthal A., Guidotti G.* // *Ibid.* – 2000. – **39.** – P. 9–16.
35. *Failer B. U., Aschrafi A., Schmalzing G. et al.* // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – **270.** – P. 1802–1809.
36. *Stout J. G., Kirley T. L.* // *Biochemistry USA.* – 1996. – **35.** – P. 8289–8298.
37. *Wang T. F., Ou Y., Guidotti G.* // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273.** – P. 24814–24821.
38. *Grinthal A., Guidotti G.* // *Purinergic Signal.* – 2006 – **2.** – P. 391–398.
39. *Grinthal A., Guidotti G.* // *Biochemistry USA.* – 2002. – **41.** – P. 1947–1956.
40. *Grinthal A., Guidotti G.* // *Ibid.* – 2004. – **43.** – P. 13849–13858.
41. *Bork P., Sander C., Valencia A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – **89.** – P. 7290–7294.
42. *Kirley T. L., Crawford P.A., Smith T. M.* // *Purinergic Signal.* – 2006. – **2.** – P. 379–389.
43. *Ciana P., Fumagalli M., Trincavelli M. L. et al.* // *EMBO J.* – 2006. – **25.** – P. 4615–4627.
44. *Burnstock G.* // *Br. J. Pharmacol.* – 2006. – **147**, Suppl. 1. – P. S172–S181.

45. *Burnstock G., Knight G. E.* // *Int. Rev. Cytol.* – 2004 – **240**. – P. 31–304.
46. *Kunzli B. M., Berberat P. O., Giese T. et al.* // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2007. – **292**. – P. G223–G230.
47. *Dranoff J. A., Nathanson M. H.* // *J. Hepatol.* – 2000. – **33**. – P. 323–325.
48. *Lazarowski E. R.* Molecular and biological properties of P2Y receptors / In: E. M. Schwiebert (ed). *Extracellular Nucleotides and Nucleosides: Release, Receptors, and Physiological and Pathophysiological Effects.* – Academic, Amsterdam, Boston, 2003. – P. 59–96.
49. *Weisman G. A., Erb L., Garrad R. C. et al.* // *Drug Dev. Res.* – 1998. – **45**. – P. 222–228.
50. *Luthje J.* // *Klin. Wochenschr.* – 1989. – **67**. – P. 317–327.
51. *Stefan C., Jansen S., Bollen M.* // *Trends Biochem. Sci.* – 2005. – **30**. – P. 542–550.
52. *Goding J. W., Howard M. C.* // *Immunol. Rev.* – 1998. – **161**. – P. 5–10.
53. *Zimmermann H.* // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2000. – **362**. – P. 299–309.
54. *Jacobson K. A., Gao Z. G.* // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2006. – **5**. – P. 247–264.
55. *Зиганшин А. У.* // *Химия и жизнь.* – 2003. – № 12. – С. 18–21.
56. *Robson S. C., Wu Y., Sun X. F. et al.* // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2005. – **31**. – P. 217–233.
57. *Jhandier M. N., Kruglov E. A., Lavoie É. G. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2005 – **280**. – P. 22986–22992.
58. *Enjyoji K., Sévigny J., Lin Y. et al.* // *Nat. Med.* – 1999. – **5**. – P. 1010–1017.
59. *Velazquez B., Garrad R. C., Weisman G. A. et al.* // *Mol. Cell. Biochem.* – 2000. – **206**. – P. 75–89.
60. *Weisman G. A., Griffin K., Santiago-Perez L. I. et al.* // *Drug Dev. Res.* – 2001. – **53**. – P. 186–192.
61. *Hou M. Y., Harden T. K., Kuhn C. M. et al.* // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2002. – **282**. – P. H784–H792.
62. *Dubyak G. R., El-Moatassim C.* // *Am. J. Physiol.* – 1993. – **265**. – P. C577–C606.
63. *Roman R. M., Fitz J. G.* // *Gastroenterology* – 1999. – **116**. – P. 964–979.
64. *Wu Y., Sun X., Enjyoji K. et al.* // *Hepatology* – 2004. – **40**. – P. 222.
65. *Fan J. S., Zhang M.* // *Neuro. Signals.* – 2002. – **11**. – P. 315–321.
66. *Kukulski F., Lévesque S. A., Lavoie E. G. et al.* // *Purinergic Signal.* – 2005. – **1**. – P. 193–204.
67. *Зиганшин А. У., Зиганшина Л. Е., Бернсток Дж.* // *Эксперим. и клин. фармакол.* – 1997. – **60**, № 3. – С. 78–82.
68. *Vorhoff T., Zimmermann H., Pelletier J. et al.* // *Purinergic Signal.* – 2005. – **1**. – P. 259–270.
69. *Sévigny J., Sundberg C., Braun N. et al.* // *Blood.* – 2002. – **99**. – P. 2801–2809.
70. *Heine P., Braun N., Sévigny J. et al.* // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – **262**. – P. 102–107.
71. *Sträter N.* // *Ibid.* – 2006. – **2**. – P. 343–350.
72. *Gendron F. P., Benrezzak O., Krugh B. W. et al.* // *Current Drug Targets.* – 2002. – **3**. – P. 229–245.
73. *Ravi R. G., Kim H. S., Servos J. et al.* // *J. Med. Chem.* – 2002. – **45**. – P. 2090–2100.
74. *Drakulich D. A., Spellmon C., Hexum T. D.* // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – **485**. – P. 137–140.
75. *Westfall T. D., Sarkar S., Ramphir N. et al.* // *Br. J. Pharmacol.* – 2000b. – **129**. – P. 1684–1688.
76. *Ghildyal P., Manchanda R.* // *Auton. Neurosci.* – 2004. – **115**. – P. 28–34.
77. *Connolly G. P., Demaine C., Duley J. A.* // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1998. – **431**. – P. 769–776.
78. *Erga K. S., Seubert C. N., Liang H. X. et al.* // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – **130**. – P. 1065–1075.
79. *He M. L., Gonzalez-Iglesias A. E., Tomic M., Stojilkovic S. S.* // *Purinergic Signal.* – 2005. – **1**. – P. 135–144.
80. *Farahbakhsh N. A.* // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2003. – **44**. – P. 3952–3960.
81. *Machida T., Heerdt P. M., Reid A. C. et al.* // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – **313**. – P. 570–577.
82. *Mukasa T., Lee Y., Knowles A. F.* // *Biochemistry* – 2005. – **44**. – P. 11160–11170.
83. *Lévesque S. A., Lavoie É. G., Lecka J. et al.* // *Br. J. Pharmacol.* – 2007 – **152**, N 1. – P. 141–150.
84. *Gendron F. P., Halbfinger E., Fischer B. et al.* // *J. Med. Chem.* – 2000. – **43**. – P. 2239–2247.
85. *Iqbal J., Vollmayer P., Braun N. et al.* // *Purinergic Signal.* – 2005. – **1**. – P. 349–358.
86. *Shi X. J., Knowles A. F.* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – **315**. – P. 177–184.
87. *Knowles A. F.* // *Ibid.* – 1988. – **263**. – P. 264–271.
88. *Robson S. C., Daoud S., Begin M. et al.* // *Blood Coagul. Fibrinolysis* – 1997. – **8**. – P. 21–27.
89. *Zhong X. T., Malhotra R., Woodruff R. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 41518–41525.
90. *Koziak K., Kaczmarek E., Kittel A. et al.* // *Ibid.* – 2000. – **275**. – P. 2057–2062.

91. Papanikolaou A., Papafotika A., Murphy C. et al. // *Ibid* – 2005. – **280**. – P. 26406–26414.
92. Dunphy J. T., Linder M. E. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids* – 1998. – **1436**. – P. 245–261.
93. Melkonian K. A., Ostermeyer A. G., Chen J. Z. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**. – P. 3910–3917.
94. Ostrovska G., Yablonska S., Rybalchenko T. et al. // *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska. Sec. DDD. Pharmacia.* – 2004. – **17**, N 2. – P. 331–333.
95. Філінська О. М., Рибальченко Т. В., Островська Г. В. та ін. // *Доповіді НАН України.* – 2006. – № 3. – С. 173–175.
96. Mizumoto N., Kumamoto T., Robson S. C. et al. // *Nat. Med.* – 2002. – **8**. – P. 358–365.
97. Eltzschig H. K., Ibla J. C., Furuta G. T. et al. // *J. Exp. Med.* – 2003. – **198**. – P. 783–796.
98. Cheung P. K., Visser J., Bakker W. W. // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1994. – **46**. – P. 1032–1034.
99. Gao L., Dong L. Q., Whitlock J. P. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**. – P. 15358–15365.
100. Wood E., Broekman M. J., Kirley T. L. et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – **407**. – P. 49–62.
101. Lu Q. X., Porter L. D., Cui X. M. et al. // *J. Androl.* – 2001. – **22**. – P. 289–301.
102. Dranoff J. A., Kruglov E. A., Toure J. et al. // *J. Investig. Med.* – 2004. – **52**. – P. 475–482.
103. Wiendl H. S., Schneider C., Ogilvie A. // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res.* – 1998. – **1404**. – P. 282–298.
104. Liao H., Hyman M. C., Beak A. E. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – **285**. – P. 14791–14805.
105. Eltzschig H. K., Köhler D., Eckle T. et al. // *Blood.* – 2009. – **113**. – P. 224–232.
106. Barreto-Chaves M. L. M., Carneiro-Ramos M. S., Cotomacci G. et al. // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2006. – **251**. – P. 49–55.
107. Karasaki S. // *Cancer Res.* – 1992. – **32**. – P. 1703–1712.
108. Dzhandzhugazyan K. N., Kirkin A. F., Straten P. T. et al. // *FEBS Lett.* – 1998. – **430**. – P. 227–230.
109. Kapojos J. J., VandenBerg A., Borghuis T. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – **501**. – P. 191–198.
110. Schulze-Lohoff E., Ogilvie A., Sterzel R. B. // *J. Auton. Pharmacol.* – 1996. – **16**. – P. 381–384.
111. Goepfert C., Imai M., Brouard S. et al. // *Mol. Med.* – 2000. – **6**. – P. 591–603.
112. Alvarado-Castillo C., Harden T. K., Boyer J. L. // *Mol. Pharmacol.* – 2005. – **67**. – P. 114–122.
113. Ivanenkov V. V., Meller J., Kirley T. L. // *Biochemistry.* – 2005. – **44**. – P. 8998–9012.

Отримано 29.03.2010