



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Barbara Rubinić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Studentica 4. godine Medicinskog fakulteta

**MEHANIZAM PREBACIVANJA
FOSFATIDILSERINA U APOPTOZI**

Završni rad

Rad je izrađen na Zavodu za biokemiju

Mentor rada: prof.dr.sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2019. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

20. svibnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

12. srpnja 2019.

Mentor rada: prof.dr.sc. Ita Gruić Sovulj

Potpis:

Sadržaj

§ Popis kratica	VII
§ Sažetak.....	X
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Stanična membrana	1
1.2. Stanična smrt	4
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	6
2.1. Lokalizacija fosfatidilserina u vanjskom sloju stanične membrane u apoptotičnoj stanici..	6
2.2. Utjecaj eksprimiranog fosfatidilserina na stanice retikuloendotelnog sustava	12
2.3. Važnost transporta fosfatidilserina u biomedicinskim znanostima.....	15
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XVI

§ Popis kratica

ABC transporter	<i>ATP-binding cassette</i> transporter
AIF	čimbenik induktora apoptoze
ATP	adenozin trifosfat
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSG	basagin
CD4+	<i>cluster of differentiation 4</i>
CD95	<i>cluster of differentiation 95</i>
cryo-EM	<i>cryogenic electron microscopy</i>
DISC	<i>death induced signaling complex</i>
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
FAD	flavin adenin dinukleotid
FADD	<i>Fas associated protein with death domain</i>
GM	gangliozyd
gp	glikoprotein
HEK294	<i>Human embrionic kidney 294</i>
HIV	virus humane imunodeficijencije
Ig	imunoglobulin
MFG-E8	globulin mliječne masti EGF čimbenik rasta 8
NBD	<i>nucleotide binding domain</i>
NPTN	neuroplastin
PE	fosfatidiletanol
PIP	fosfatidilinozitolfosfat
PC	fosfatidilkolin
PS	fosfatidilserin
RNA	ribonukleinska kiselina
TIM	protein T limfocita za imunoglobulin i mucin 4
TMD	transmembranska domena
hTMEM16K	ljudski transmemembranski protein 16K

mTMEM16A	transmemembranski protein iz porodice miša <i>Muridae</i> 16A
mTMEM16F	transmemembranski protein iz porodice miša <i>Muridae</i> 16F
nhTMEM16	transmemembranski protein iz porodice gljiva <i>Nectria haematococca</i> 16
TNF- α	čimbenik tumorske nekroze α
TNFR-1	receptor čimbenika tumorske nekroze 1
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRADD	<i>TNFR associated death domain</i>
Xkr	<i>Xk related protein</i>

§ Sažetak

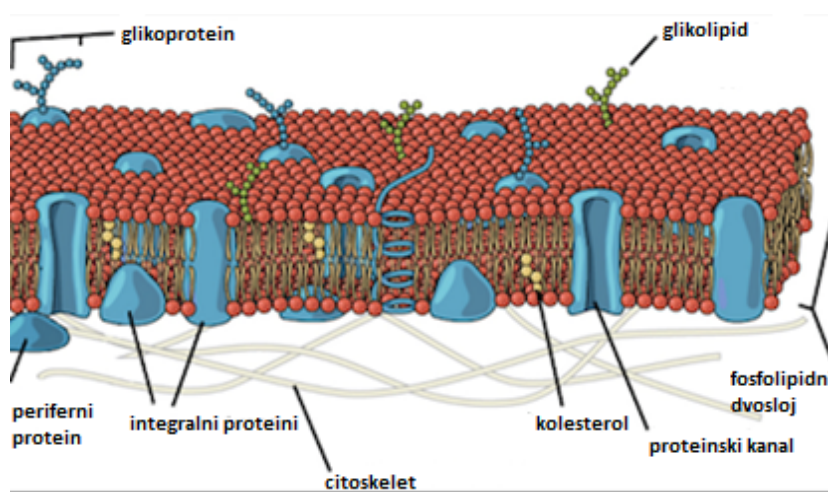
Stanica je osnovna funkcionalna jedinica živih bića. Omeđena je staničnom membranom koja ima asimetričnu raspodjelu fosfolipida. Stanična smrt važna je za normalnu funkciju organizma. Nekroza i apoptoza su programirane stanične smrti. Prema mehanizmu nastanka apoptoza se dijeli na intrinzičnu i ekstrinzičnu. Jedan od krajnjih ciljeva apoptoze jest prebacivanje fosfatidilserina s unutarnjeg na vanjski sloj stanične membrane. Taj proces odvija se pomoću tri skupine transmembranskih proteina - skramblaze ovisne o kalciju (TMEM16F), skramblaze ovisne o kaspazama (Xkr) te flipaza ovisnih o kalciju i kaspazama (ATP11A i ATP11C). TMEM16F veže dva iona kalcija čime postaje aktivna te dolazi do prijenosa lipida i iona. Xkr nije aktivna u nativnom stanju, već nakon djelovanja kaspaze stvara heterotetramere s neuroplastinom i basaginom te u tom obliku vjerojatno djeluje kao skramblaza. ATP11 proteini su konstitucijski aktivni te prebacuju fosfatidilserin s vanjskog sloja membrane u unutarnji sloj. Flipaza je inhibirana cijepanjem kaspazom i porastom intracelularne razine kalcijevih iona tijekom apoptoze stoga fosfatidilserin ostaje eksprimiran na vanjskom sloju stanične membrane. Ekspersijom fosfatidilserina stanica šalje "eat me" signal fagocitima. Signal prepoznaju protein T limfocita za imunoglobulin i mucin 4 (TIM4) s IgV domenom, globulin mliječne masti EGF faktor rasta 8 (MFG-E8) te aneksini 1 i 2. Ova istraživanja imaju važnu ulogu u biomedicinskim znanostima i razvoju lijekova. Otkriveno je da virus HIV-a koristi prekomjernu ekspersiju fosfatidilserina kako bi ušao u limfocite. Također, tumorska vaskularna mreža na endotelu ima povećanu ekspersiju fosfatidilserina. Ova bi otkrića mogla biti prvi korak k razvoju ciljane terapije za HIV i tumore.

§ 1. UVOD

1.1. Stanična membrana

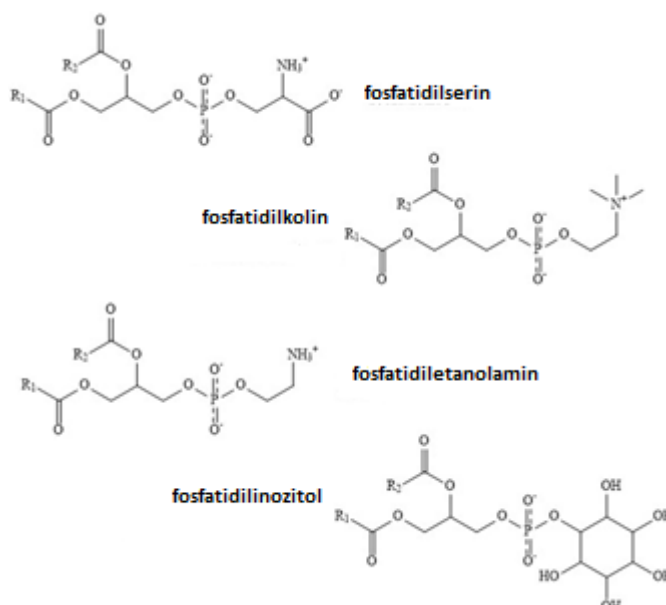
1.1.1. Građa stanične membrane

Stanica je osnovna funkcionalna jedinica živih bića. Stanična je membrana struktura koja odvaja unutrašnjost stanice i izvanstanični prostor. To je vrlo kompleksna struktura koja se sastoji od fosfolipidnog dvosloja, kolesterola i proteina; prikazana na Slici 1.¹



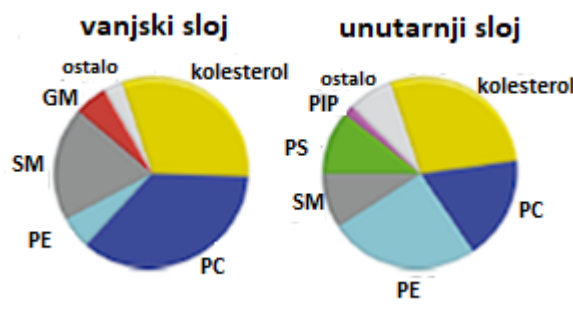
Slika 1. Shematski model stanične membrane čija je osnova fosfolipidni dvosloj, a u njoj se nalaze proteini (periferni, integralni i transmembranski proteinski kanali) i kolesterol. S unutrašnje strane membrane nalazi se citoskelet, dok su s vanjske strane glikoproteini i glikolipidi. Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora 1.

Fosfolipidi su amfipatske molekule koje grade dvosloje. Hidrofobni dijelovi su okrenuti jedni prema drugima te između njih postoje hidrofobne interakcije, a hidrofilni su dijelovi u kontaktu s citosolom i izvanstaničnim prostorom. Fosfolipidi se prema strukturi dijele na glicerofosfolipide i sfingolipide. Struktura fosfolipida sastoji se od fosfatidne kiseline na koju su fosfodieterskom vezom vezane polarne skupine: kolin, etanolamin, serin, inozitol.² Njihove strukture prikazane su na Slici 2.



Slika 2. Prikaz strukturnih formula fosfolipida – fosfatidilserin, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin i fosfatidilinozitol.

Razmještaj fosfolipida je asimetričan. Fosfatidiletanolamin i fosfatidilserin nalaze se u unutrašnjem sloju membrane, a fosfatidilkolin u vanjskom sloju što se vidi na Slici 3.³



Slika 3. Grafički prikaz asimetričnog rasporeda lipida između dva sloja stanične membrane. Kratica PC predstavlja fosfatidilkolin, PE fosfatidiletanolamin, SM sfingomijelin, GM gangliozide, PS fosfatidilserin te PIP fosfatidilinozitol fosfat. Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora 3.

Fosfolipidi se neometano gibaju lateralnom difuzijom, no za prijelaz iz jednog u drugi sloj potrebni su odgovarajući enzimi. U skupinu fosfolipida ubrajaju se i sfingolipidi. Osnova strukture sfingolipida jest dugolančani alifatski alkohol, sfingozin, koji osim hidroksilne skupine sadrži i amino skupinu. Osim fosfolipida, membrana sadržava glikolipide koji se nalaze u vanjskom sloju membrane.

Kolesterol je lipid građen od gonanskog prstena - fuzionirana 3 šesteročlana i jedan peteročlani prsten i sastoji se od hidrofobnog i hidrofilnog dijela.⁴ Njegova je uloga u staničnoj membrani regulacija fluidnosti.

Membranski proteini odgovorni su za većinu funkcija stanične membrane. Prema načinu interakcija s membranom razlikuju se integralni proteini koji prolaze kroz membranu te periferni koji su povezani slabijim elektrostatskim silama s membranom te ne prolaze kroz fosfolipidni dvosloj. Prijelaz lipida iz unutrašnjeg u vanjski sloj događa se uz pripadne membranske enzime u kojima razlikujemo tri vrste: flopaze (ATP-aza tipa P), flipaza (ABC transporteri) i skramblaze.⁵ ATP-aze tipa P građene su od alfa helikalne strukture te imaju dvije konformacije, E1 i E2. One su primarni aktivni prenositelji koji kataliziraju autofosforilaciju na aspartatnom ostatku čime dolazi do konformacijske promjene, promjene afiniteta veznog mjesta i u konačnici prijenosa lipida iz vanjskog u unutarnji sloj stanične membrane.⁶ ABC transporteri građeni su od dviju transmembranskih domena (TMD) i dvije citosolne domene koje vežu ligande (NBD-s).⁷ Za prijenos potrebno je vezanje i hidroliza ATP-a. Skramblaze su pasivni prijenosnici aktivirani kalcijevim ionima.⁸

1.1.2. Funkcija stanične membrane

Mnogobrojne su funkcije stanične membrane. Strukturna uloga stanične membrane je odvajanje citosola i izvanstaničog prostora koji se međusobno razlikuju po koncentraciji iona natrija, kalija i kalcija. Samim time na membrani je ostvaren membranski potencijal, a protokom iona kroz ionske kanale postiže se stvaranje akcijskog potencijala koji je bitan za pravilnu funkciju srca i središnjeg živčanog sustava.⁹

Osim strukturne uloge, stanična membrana ima i funkcionalnu ulogu, a jedna od najvažnijih je prijenos signala. U prijenosu signala sudjeluju membranski proteini koji često djeluju kao receptori za ligande (iznimka su steroidni hormoni koji lako prolaze kroz membranu). Receptori se odlikuju visokom specifičnošću prema ligandu. Unutar stanice dolazi do aktivacije sekundarnog glasnika i do izražaja dolazi amplifikacija signala. Receptor se desenzitizira kao prilagodba na produljenu izloženost ligandom. Između različitih signalnih puteva postoji komunikacija kako bi se postigla homeostaza u stanici.¹⁰

Lipidi nisu pasivni promatrači, već aktivno sudjeluju u prijenosu signala. Primjer za to su sekundarni glasnici koji nastaje aktivacijom proteina G spregnutog s fosfolipazom C ($G_{\alpha q}$ receptor). Navedeni enzim hidrolizira fosfolipid na diacilglicerol i inozitol-1,4,5-trisfosfat. Diacilglicerol aktivira protein kinazu C, a inozitol-1,4,5-trisfosfat djeluje kao ligand te otvara

kalcijev kanal na sarkoplazmatskom retikulumu.¹¹ Eikozanoidi su, derivati fosfolipida koji sadrži arahidonsku kiselinu iz citosolnog sloja membrane. Oni sudjeluju u parakrinoj signalizaciji.¹²

1.2. Stanična smrt

1.2.1. Vrste stanične smrti

Prva klasifikacija stanične smrti dana je 1973. godine. Ona je zasnovana na morfološkim svojstvima procesa. Tada je podijeljena u 3 skupine: nekroza tipa 1 koja je povezana s heterofagijom u izoliranim stanicama (apoptoza), nekroza tipa 2 koja je povezana s autofagijom (autofagija) te tip tri koji nije vezan niti uz jedan tip digestije te nastaje debris (nekroza).¹³ Danas se stanična smrt klasificira prema biokemijskim svojstvima te postoji 13 različitih vrsta¹⁴ od kojih se, kao najčešće i najpoznatije, izdvajaju apoptoza i nekroza.

Suprotno općem mišljenju, nekroza nije isključivo patološki fenomen koji nastupa jednostavnim prekidom funkcioniranja stanice, već programirana stanična smrt koja se može pojaviti u fiziološkim procesima kao što je odumiranje epitelnih stanica crijeva u odraslom čovjeku.¹⁵ Regulirana nekroza naziva se još i nekroptoza te je potaknuta vezanjem proteina TNF- α (čimbenik tumorske nekroze) na TNFR-1 (receptor za čimbenik tumorske nekroze). Unutarstanična domena TNFR-1 ostvaruje interakciju s proteinom TRADD (*TNFR Associated Death Domain*) koji sadrži "domenu smrti".¹⁶

1.2.2. Apoptoza

Prema najnovijoj klasifikaciji, apoptoza se dijeli u četiri različita tipa stanične smrti ovisno o tome je li nastala intrinzičnom pobudom, koja može biti ovisna ili neovisna o kaspazama ili nastala ekstrinzičnom pobudom, do koje dolazi pobudom receptora smrti.¹⁴

Ekstrinzična apoptoza aktivira se zbog vanjske pobude vezanja letalnih liganada (FAS ligand, TNF- α , TRAIL...) na odgovarajuće receptore. Jedan od primjera je FAS ligand koji se veže na CD95 (*cluster of differentiation 95*). FAS ligand je homotrimerni protein koji pripada porodici proteina čimbenika tumorske nekroze.¹⁷ CD95, još nazvan FAS receptor, transmembranski je protein. Vezanjem FAS liganda dolazi do njegove oligomerizacije i indukcije signalnog kompleksa smrti (*DISC-death induced signaling complex*). Citoplazmatska domena CD95 još se naziva i domena smrti koja nakon aktivacije ostvaruje interakciju s C-terminalnim krajem proteina FADD (*Fas associated protein with death*

domain). FADD je most između receptora smrti i samog aktivatora jer on na svojem N-terminalnom kraju ostvaruje interakciju te hidrolizira prokaspazu-8 ili 10.¹⁸ Prokaspaza-8 je zimogen koja hidrolizom prelazi u aktivni enzim - kaspazu-8. Kaspaze su enzimi koje u svojem aktivnom mjestu sadrže cistein, a hidroliziraju proteinske supstrate nakon asparaginske kiseline.¹⁹ Kaspaza-8 pokreće kaspaznu kaskadu te aktivira efektorske kaspaze 3, 6 i 7. Efektorske kaspaze pokreću apoptozu.¹³

Intrinzična apoptoza aktivirana je unutrašnjom signalizacijom koja nastaje zbog niza nepovoljnih stanja u stanici (oksidacijski stres, oštećenje DNA...). Tada prevladavaju pro-apoptotički proteini koji stvaraju pore u mitohondrijskoj membrani.¹⁴ Ona gubi svoju funkciju i dolazi do otpuštanja mnogih proteina od kojih su za apoptozu značajni čimbenik induktora apoptoze (AIF) i citokrom c. AIF je oksidoreduktaza koja ima FAD kao prostetičku skupinu što ga svrstava u skupinu flavoproteina. Izlaskom iz mitohondrija, AIF odlazi u jezgru te pokreće apoptozu neovisnu o aktivaciji kaspaza.²⁰ Citokrom c je protein koji u sebi sadrži hem. Njegov izlazak iz mitohondrija nastaje pri visokoj koncentraciji kalcijevih iona u citosolu. Citokrom c zajedno s drugim proteinima u matriku stvara apoptosom koji aktivira kaspazu 9.²¹ Ta kaspaza aktivira efektorsku kaskadu kaspaza počevši s kaspazom 3.

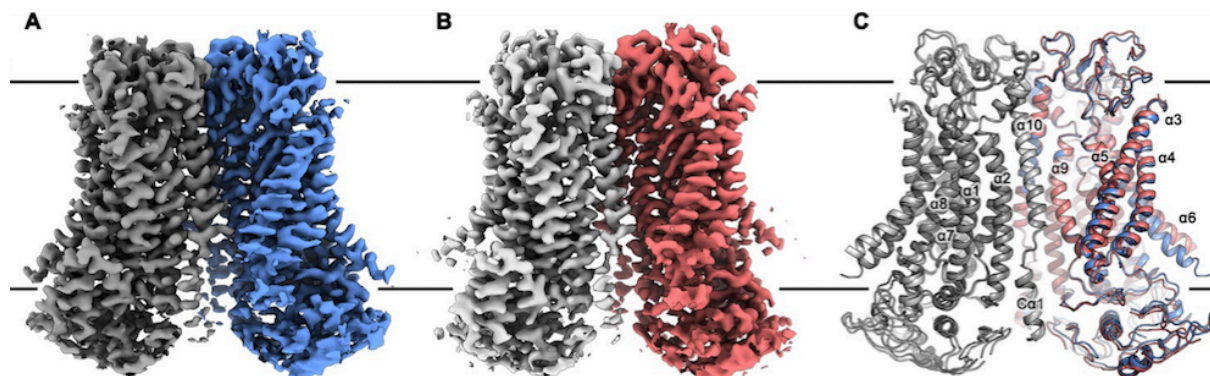
Apoptoza se javlja u fiziološkim i patološkim uvjetima. Fiziološka uloga najbolje se uočava tijekom embrionalnog razvoja. Pravilan razvoj i remodelacija srca temelji se upravo na apoptozi.²² Patološka apoptoza javlja se u stanicama jetre kada je ona zaražena virusom hepatitisa C.²³ Važnost odvijanja apoptoze pokazana je na primjeru translokacije kromosoma 14 i 18 (t:14,18) nakon čega dolazi do pretjerane ekspresije antiapoptotičnog proteina BCL-2. Apoptoza se ne može odvijati te nastaje folikularni limfom.²⁴ Upravo zbog ovih razloga potrebno je nastaviti istraživanja stanične smrti kako bi pojedini molekularni putevi jednoga dana postali cilj novim lijekovima ili ekspresija određenih proteina rani biološki markeri potencijalno smrtonosnih bolesti.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Lokalizacija fosfatidilserina u vanjskom sloju stanične membrane u apoptotičnoj stanici

2.1.1. Skramblaze ovisne o kalcijevim ionima

Skramblaze su pasivni prenositelji fosfolipida. U prijenosu fosfatidilserina ističu se proteini porodice TMEM16. Proteini navedene porodice su kloridni kanali ovisni o kalciju.²⁵ Dodatnu sposobnost prijenosa fosfatidilserina posjeduje transporter TMEM16F,²⁶ koji se nalazi u svim stanicama u tijelu.²⁵ U staničnoj liniji HEK294 (*human embryonic kidney 294*) proizveden je protein TMEM16F iz porodice miša *Muridae* (kasnije mTMEM16F) kako bi se tim eksperimentom riješila njegova transmembranska struktura (Slika 4.). Primarna struktura proteina mTMEM16F vrlo je slična ljudskom ortologu, točnije preklapanja su iznad 90%.²⁷



Slika 4. Struktura mTMEM16F eksprimiranih u humanoj staničnoj liniji HEK294 (*human embryonic kidney 294*) snimljena s cryo-EM (*single particle cryo-electron microscopy*). A - struktura mTMEM16F bez kalcijevog iona, B - struktura mTMEM16F u prisutnosti kalcijevog iona, C - shematski prikaz s označenim α -helikalnim motivima, dok je bojom prikazano preklapanje strukture s ionom kalcija (crveno i bijele zavojnice) te bez iona kalcija (plave i sive zavojnice). Horizontalnim crtama označena je stanična membrana.²⁷

Pokazano je kako mTMEM16F djeluje kao prijenosnik fosfolipida (skramblazna aktivnost) te ujedno kao ionski kanal niske selektivnosti. U prijenosu iona ima nešto veći afinitet prema prijenosu kationa, nego aniona. Elektrofiziološkim ispitivanjima utvrđena je kooperativnost pri prijenosu iona s Hillovim koeficijentom 1,7. Oba procesa, prijenos iona i prijenos lipida,

aktivirana su povećanjem intracelularne koncentracije kalcijevih iona. Pretpostavlja se kako na prijenos iona utječe i promjena membranskog potencijala, a ne isključivo vezanje kalcijevog iona. Kod membranskog potencijala u mirovanju, postoji konstitucijska ionska aktivnost, no ona je mala.²⁷

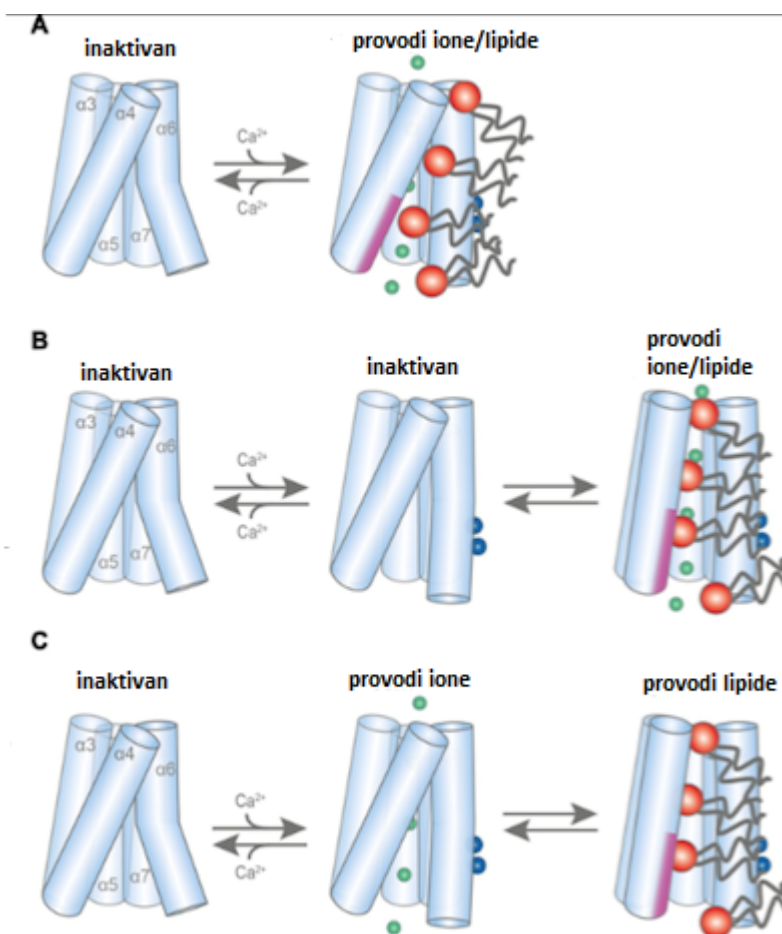
Primarna struktura proteina mTMEM16F pokazuje sličnosti s proteinom iz porodice miša *Muridae*, mTMEM16A (poklapanje primarne strukture iznosi 38%), proteinom iz vrste gljiva *Nectria haematococca*, nhTMEM16 (poklapanje primarne strukture je 25%) te s ljudskim proteinom, hTMEM16K kod kojeg poklapanje primarnih struktura iznosi 21%. Protein mTMEM16A je anionski kanal, dok nhTMEM16 posjeduje samo funkciju skramblaze. Strukture opisanog proteina mTMEM16F i nhTMEM16 vrlo su slične u inaktivnom stanju, no kod aktivacije kalcijem strukture pokazuju veće neslaganje. Ta činjenica povlači pitanje jesu li dobiveni podatci mTMEM16F za parcijalno aktiviran protein ili je mehanizam prijenosa lipida potpuno različit kod proteina mTMEM16F i nhTMEM16.²⁷

Pora proteina mTMEM16F u konformaciji u kojoj je vezan ion kalcija sastoji se od tri dijela. Na citosolnoj strani nalazi se široko grlo, slično lijevku, u koji nesmetano ulaze se hidratizirani ioni. Na mjestu 559 nalazi se neutralna aminokiselina glutamin (Gln559), dok se, na istom mjestu, u proteinu mTMEM16A nalazi pozitivna aminokiselina arginin. Zatim slijedi uski kanal slabog neto pozitivnog naboja, koji je hidrofobniji od uskog kanala proteina mTMEM16A. Promjer kanala u proteinu mTMEM16F smanjen je bočnim ogrankom aminokiseline tirozina na poziciji 563 (Tyr563). Tu njegov promjer iznosi svega 1,6Å. Zanimljivo je kako to suženje ne predstavlja barijeru koja određuje brzinu prijenosa iona što je dokazano u eksperimentu s mutiranim tipom proteina gdje je aminokiselina tirozin zamijenjena serinom. Nakon uskog kanala, ponovno se javlja široko grlo poput lijevka koje se otvara na izvanstaničnoj strani membrane. Na mjestu 506 nalazi se neutralna aminokiselina glutamin (Gln506), a mjestu 478 nalazi se pozitivno nabijena aminokiselina arginin (Arg478). U proteinu mTMEM16A na mjestu 506 nalazi se pozitivno nabijena aminokiselina arginin što objašnjava veću selektivnost navedenog proteina prema naboju nasuprot proteinu mTMEM16F. Mutacijom aminokiseline arginin na 478 mjestu u alanin na proteinu mTMEM16F pokazana je izrazito smanjena skramblazna aktivnost.²⁷

mTMEM16F postaje aktivan kada ioni kalcija sjedaju u šupljinu koju čine polarne, kisele aminokiseline na α -heliksi 6, 7 i 8. Vezanjem kalcijevog iona dolazi do konformacijske promjene na lancima α_3 , α_4 i α_6 . Polarne, negativno nabijene aminokiseline na α_6 heliksi

stvaraju interakciju s vezanim ionom kalcija i time je smanjena mobilnost $\alpha 6$ -heliksa. Izlaskom iona kalcija iz veznog mjesta dolazi do povećanja mobilnosti $\alpha 6$ lanca te do njegovog zakretanja za 20° dalje od lanca $\alpha 4$. U proteinu mTMEM16A dolazi do upravo suprotne promjene, odnosno $\alpha 6$ lanac se zakreće prema $\alpha 4$ lancu te se pretpostavlja da je u toj konformaciji inhibirana skramblazna aktivnost. U eksperimentima gdje je mutirano vezno mjesto za kalcij i glicin na $\alpha 6$ lancu proteina mTMEM16F, pokazano je kako je, gore navedeni mehanizam aktivacije kalcijevim ionima, temelj zajedničke aktivacije prijenosa iona i lipida.²⁷

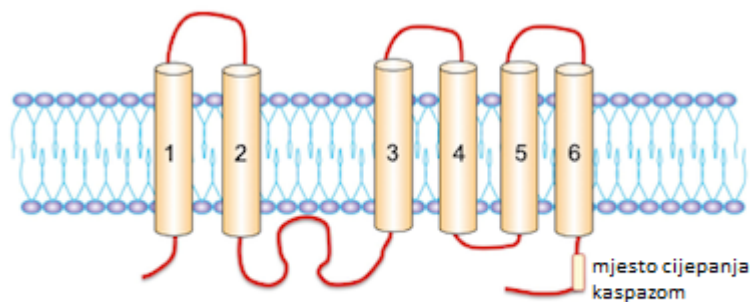
U navedenom istraživanju, dane su tri hipoteze mehanizma prebacivanja lipida koje su prikazane na Slici 5. U prvoj hipotezi pretpostavlja se da je skramblaza inaktivna, sve dok se na nju ne veže ion kalcija. Tada dolazi do prijenosa iona i lipida, međutim na različitim dijelovima skramblaze. U tom konformacijskom stanju, izvanstanični dio gore opisane pore ostaje zasjenjen, odnosno zatvoren, te se difuzija lipida događa izvan te pore. Dolazi do stvaranja interakcija s polarnim ostacima aminokiselina mTMEM16F i polarnog dijela fosfolipida što dovodi do destabilizacije membrane. Tako se smanjuje energijska barijera za prijenos fosfolipida. Druga hipoteza pretpostavlja mehanizam gdje je protein također u nativnom stanju inaktivan. Nakon vezanja iona kalcija, nastaje intermedijer koji se sastoji od niza konformacijskih stanja $\alpha 3$ i $\alpha 4$ heliksa. Smatra se da interakcija fosfolipida s proteinom mTMEM16F olakšava konformacijsku promjenu $\alpha 4$ heliksa. Prijenos iona i lipida provodi se u gore opisanoj pori. Nije razjašnjeno radi li se o jednoj konformaciji proteina koja provodi i ione i lipide ili se radi o dvije različite konformacije koje su u ravnoteži s proteinom na koji je vezan kalcijev ion. U trećoj hipotezi protein bez iona kalcija u inaktivnoj je konformaciji. Vezanjem iona kalcija dolazi do ravnoteže između dvije konformacije, jedna koja prenosi lipide i druga koja djeluje kao ionski kanal. Pretpostavlja se kako je treća hipoteza najvjerojatnija, međutim to ostaje otvoreno pitanje na koje će odgovoriti buduća istraživanja u tom području.²⁷



Slika 5. Prikaz tri pretpostavljena mehanizma djelovanja proteina mTMEM16F. Prva hipoteza (A) pretpostavlja da se skramblaza aktivira vezanjem iona kalcija te dolazi do prijenosa iona i lipida, ali na različitim mjestima u proteinu. Druga hipoteza (B) pretpostavlja da aktivacijom s ionom kalcija, dolazi do simultanog prijenosa iona i lipida u otvorenoj konformaciji proteina. Treća hipoteza (C) pretpostavlja da aktivacijom proteina ionom kalcija, dolazi do nastajanja konformacije koja prenosi lipide i konformacije koja prenosi ione te su one u ravnoteži. Shema je preuzeta iz izvora 27 te prilagođena.

2.1.2. Skramblaze ovisne o kaspazama

Skramblaze obitelji Xkr sudjeluju u apoptozi.²⁸ Proteini Xkr4, Xkr8 i Xkr9 prenose fosfatidilserina na vanjsku stranu membrane neovisno o prijenosu iona.²⁹ Xkr8 je transmembranski protein za koji se pretpostavlja da se sastoji od šest transmembranskih regija prikazanih na Slici 6., međutim pojedini eksperimenti pretpostavljaju da se sastoji od 10 transmembranskih regija.³⁰ Na citoplazmatskoj strani, na C- kraju nalazi se regija koju cijepa kaspaza 3 ili kaspaza 7.



Slika 6. Shematski prikaz strukture skramblaze ovisne o kaspazama, Xkr8, s mjestom na kojem dolazi do cijepanja kaspazama. Shema je preuzeta i prilagođena iz izvora 31.

Skramblaza Xkr8 nije aktivna u nativnom stanju. Odcjepljenjem 16 aminokiselina na C-kraju²⁹ pomoću kaspaze, dolazi do konformacijske promjene i dimerizacije proteina. Dimer se spaja u heterotetramer s basiginom (BSG) ili neuroplastinom (NPTN).³² Basigin je transmembranski glikoprotein koji, kao i neuroplastin, pripada imunoglobulinskoj superporodici. Oba proteina imaju važnu ulogu u intracelularnoj signalizaciji.^{33, 34} Vjerojatno u opisanom heterotetrameru djeluje kao skramblaza, no još nije poznat točan mehanizam. Xkr8 se nalazi u svim stanicama.

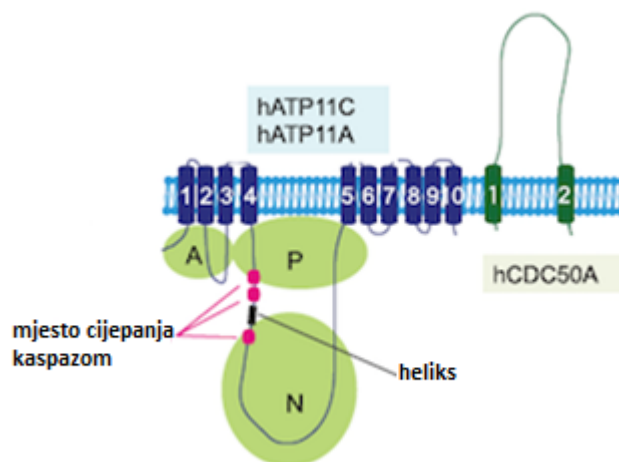
Skramblaze Xkr4 i Xkr9 također posjeduju šest transmembranskih podjedinica i domenu specifičnu za kaspaze. Međutim, njih može aktivirati i kaspaza 6. Za razliku od Xkr8, oni nisu podjednako eksprimirani u svim tkivima, već izrazita ekspresija Xkr4 nalazi se u mozgu i retini, zbog čega se smatra da ima važnu ulogu u neuralnom modeliranju. Xkr9 najviše je eksprimiran u crijevu.²⁹

Pokazano je kako humane stanične linije Raji i PBL985 koje ne eksprimiraju fosfatidilserin, u apoptozi manjka Xkr8.^{35, 36} To govori u prilog iznimnoj važnosti skramblaza porodice Xkr u mehanizmu prebacivanja lipida u apoptozi.

2.1.3. Flipaze ovisne o kaspazama

U prijenosu fosfolipida sudjeluju flipaze porodice P4-ATPaze pod nazivom ATP11A i ATP11C te Drs2p koji je najbliži homolog proteina u kvascu.³⁷ Flipaze su aktivni prenositelji čiji je cilj održavanje asimetričnog rasporeda fosfolipida. ATP11A protein je koji se sastoji od deset transmembranskih regija i dvije zavojnice koje imaju ATP-aznu aktivnost.³¹ Za

ekspresiju i lokalizaciju ATP11A flipaze nužan je akcesorni protein CDC50 koji posjeduje dvije transmembranske regije.^{38,39} Strukture oba proteina prikazane su na Slici 7.³¹



Slika 7. Shematski prikaz strukture flipaze hATP11A s deset transmembranskih podjedinica, ATP-aznom aktivnosti i mjestima gdje je cijepa kaspaza. Prikazane su tri domene flipaze: domena koja djeluje kao aktuator (A), domena koja veže nukleotide (N) i domena koja veže fosfat (P). Također, prikazan je i hCDC50A s dvije transmembranske podjedinice. Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora 31.

Na flipazi ATP11A postoje dvije domene na koje cijepa kaspaza 3, dok kod ATP11C postoje tri takve domene.⁴⁰ Pokazano je da kaspaza inaktivira flipazu i na taj način sprječava povratak fosfatidilserina s vanjskog na unutarnji sloj membrane te on ostaje lokaliziran u vanjskom sloju.⁴¹

Osim kaspaza, na aktivnost flipaza ATP11A i ATP11C utječu i kalcijevi ioni. Naime u apoptozi dolazi do povećanja intracelularne koncentracije kalcija koji će inhibirati flipaze, a aktivirati skramblazu.²⁷ Logično je kako ta inhibicija nije ireverzibilna, nego smanjenjem intracelularne koncentracije kalcija ponovno se opaža flipazna aktivnost.⁴²

Flipaza ATP11A i ATP11C eksprimirane su u svim tkivima. Osim navedenih postoje i druge flipaze sa sličnom funkcijom, a jedan primjer je flipaza ATP8B1. Ona je eksprimirana samo u jetri, crijevu i uhu. Mutacijom gena za ATP8B1 nastaje progresivna familijarna intrahepatička kolestaza.⁴³

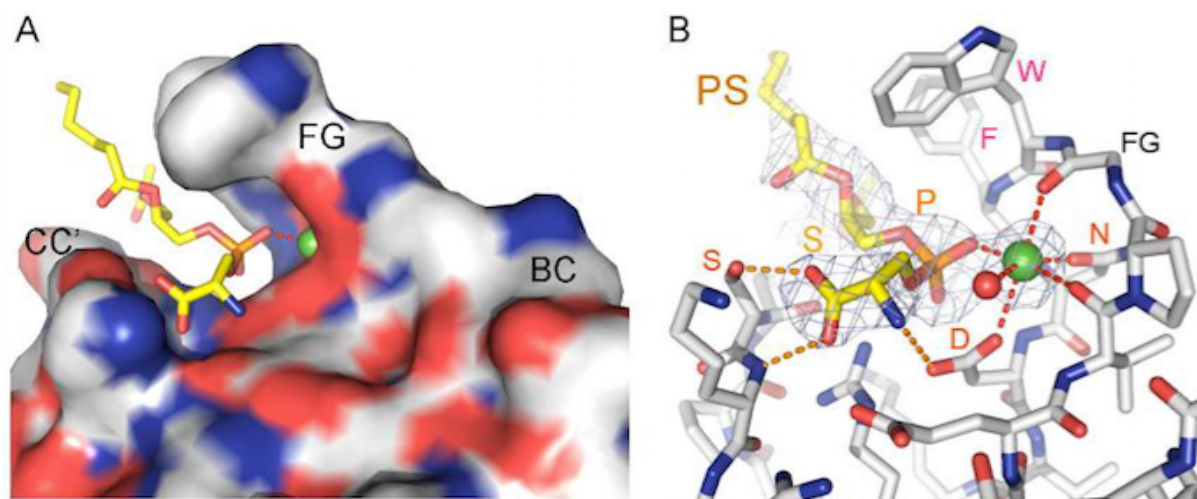
2.2. Utjecaj eksprimiranog fosfatidilserina na stanice retikuloendotelnog sustava

Ekspresijom fosfatidilserina u vanjskom sloju stanične membrane, stvara se signal stanicama retikuloendotelnog sustava za endocitozu apoptotičke stanice (takozvani "eat me" signal). Zanimljivo je kako makrofagi koji fagocitiraju apoptotične stanice također eksprimiraju fosfatidilserin na vanjskom sloju stanične membrane.⁵⁹

Molekule koje prepoznaju fosfatidilserin u vanjskom sloju stanične membrane apoptotične stanice su TIM4 (protein T limfocita za imunoglobulin i mucin 4)⁴⁴, MFG-E8 (globulin mliječne masti EGF čimbenik rasta 8)⁴⁵ i aneksin⁴⁶.

2.2.1. Protein T limfocita za imunoglobulin i mucin 4 (TIM4)

Protein T limfocita za imunoglobulin i mucin 4 (TIM4) transmembranski je protein koji se nalazi na limfocitima T. Kao i svaki transmembranski protein sastoji se od tri dijela: izvanstanične, membranske i citosolne domene. Izvanstanični dio na N-terminalnom kraju posjeduje domenu za interakciju sa imunoglobulinima. Također posjeduje i izrazito glikoziliranu domenu koja veže mucin. Posjeduje samo jednu transmembransku regiju te se u citoplazmatskom djelu nalazi mjesto koje sadrži motive tirozin-kinaze. Fosfatidilserin veže se za imunoglobulinsku (IgV) domenu. Eksperimentima s mišjom molekulom TIM4 (mTIM4) pokazana je interakcija fosfatidilserina te IgV domene. Fosfatna skupina koordinirana je na ion natrija ili kalcija. Kisik iz hidroksilna skupine serina ostvaruje interakciju između CC' mjesta (Slika 8.) i metalnog iona. Amino skupina serina stvara interakcije s aspartatom koji je koordiniran na metalni ion, dok karboksilna skupina serina stvara vodikovu vezu sa serinom na CC' mjestu.⁴⁷ Interakcije su prikazane na Slici 8.



Slika 8. Grubi prikaz interakcija mTIM4 imunoglobulinske domene s fosfatidilserinom (A). Detaljan prikaz važnih aminokiselina na regijama koje sudjeluju u interakciji fosfatidilserina (žuta boja) i mTIM4 IgV domene (B). Zelenom bojom prikazan je ion natrija. Slika je preuzeta iz izvora 47.

TIM4 spaja se s β_1 integrinom. β_1 integrin je transmembranski protein čija unutarstanična domena posjeduje Scr-tirozin kinaznu aktivnost te stvara sekundarne glasnike koji naposljetku dovode do fagocitoze apoptotične stanice.⁶⁰

2.2.2. Globulin mliječne masti EGF čimbenik rasta 8 (MFG-E8)

Globulin mliječne masti EGF faktor rasta 8 je protein koji se nalazi su u međustaničnom prostoru i ostvaruje interakciju s fosfatidilserinom eksprimiranim u vanjskom sloju stanične membrane apoptotičnih stanica. Globulin posjeduje i drugu domenu koja se sastoji od aminokiselina arginin-glicin-aspartat te se ona veže za $\alpha_v\beta_3$ integrine koji su eksprimirani na fagocitima.⁴⁵ *Knock-out* MFG-E8 miševi obolijevaju od autoimunog glomerulonefritisa.⁴⁸

2.2.3. Aneksin

Molekule aneksina I i II eksprimiraju makrofazi. To su proteini koji vežu ione kalcija i vežu se na fosfatidilserin izražen na apoptotičnoj stanici te uzrokuju fagocitozu. One su bivalentne što znači da mogu povezivati dvije stanice preko membrane.⁴⁹ Nažalost, još uvijek nije dobro poznat mehanizam internalizacije stanice posredovan aneksinom I ili II. Osim u apoptozi, oni imaju važno protuupalno djelovanje budući da inhibiraju fosfolipazu A_2 .⁵⁰ Zanimljivo je kako se protein iste porodice, aneksin V isto veže na fosfatidilserin, no s drugačijim ciljem. Interakcijom s fosfatidilserinom neće doći do fagocitoze stanice, već oni taj apoptotički signal

čine nevidljivima drugim proteinima koji ga prepoznaju te na taj način štite stanicu od fagocitoze.⁵¹ Aneksin V danas se u eksperimentima koristi kao marker apoptoze.

2.3. Važnost transporta fosfatidilserina u biomedicinskim znanostima

Virus humane imunodeficijencije (HIV) pripada porodici *Retroviridae*. Sadrži jednolančanu RNA molekulu i obavijen je lipidnom ovojnicom. Do sada se velika pažnja pridavala proteinima na ovojnici kao što su gp120/gp140 i gp41 koji omogućavaju ulazak virusa u ljudske CD4+ limfocite.⁵² Međutim, otkriveno je kako lipidna ovojnica sadrži veliki broj molekula fosfatidilserina.⁵³ Fosfatidilserin se veže na protein T limfocita za imunoglobulin i mucin (TIM) te ulazi u stanice T limfocita.⁵⁴ Važnost tog mehanizma za infekciju humanim virusom imunodeficijencije potvrdilo je istraživanje u kojem su dodana anti-TIM4 protutijela kako bi se onemogućila ta interakcija te je uočen smanjen unos virusa u T limfocite.⁵⁵

Zloćudni tumori drugi su uzrok smrti u Republici Hrvatskoj⁵⁶ te unutar prvih deset u cijelom svijetu⁵⁷, stoga predstavljaju veliki biomedicinski i javnozdrastveni problem. Otkriveno je kako mikrovaskulatura solidnog tumora posjeduje veću ekspresiju fosfatidilserina na stanicama endotela.⁵⁸ Ova saznanja otvaraju put dizajniranju i sintezi novih, specifičnih farmakofora kao budućnost liječenja tumora.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-cells/hs-the-cell-membrane/a/structure-of-the-plasma-membrane> (datum pristupa 15. svibnja 2019.)
2. D. Nelson, M. Cox, *Leningher principles of biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2005, str. 348-349.
3. H.I. Ingólfsson, M. N. Melo, F.J. van Eerden, C. Arnarez, C.A. Lopez, T.A. Wassenaar, X. Periole, A.H. de Vries, D. Peter Tieleman, S.J. Marrink, *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014) 14554-14559.
4. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Strayer, *Byochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2010, str. 326.
5. M. Ikeda, A. Kihara, Y. Igarsashi, *Bio. Pharm. Bull.* **29**(8) (2006) 1542-1546.
6. https://en.wikipedia.org/wiki/P-type_ATPase#cite_note-Pedersen_1987-2 (datum pristupa 3. ožujka 2019.)
7. P. M. Jones, A. M. George, *Cell. Mol. Life Sci.* **61** (2004) 682–699.
8. S.K. Sahu, S.N. Gummadi, N. Manoj, G.K. Aradhya, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **462** (2007) 103–114.
9. A.C. Guyton, J.E. Hall, *Medicinska fiziologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2012, str. 57-62.
10. D. Nelson, M. Cox, *Leningher principles of biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2005, str. 421-425.
11. <http://www.sivabio.50webs.com/ip3.htm> (datum pristupa 4. ožujka 2019.)
12. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Strayer, *Byochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2010, str. 370-371.
13. J.U. Schweichel, H.J. Merker, *Tetralogy* **7** (1973) 253-266.
14. L. Galluzzi, I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiry, S. Fluda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nuñez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H.U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, G. Kroemer, *Cell Death Differ.* **19** (2012) 107-120.

15. D.H. Barkla, P.R. Gibson, *Pathology* **31** (1999) 230–238.
16. P. Vandenabeele, L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, G. Kroemer, *Nat Rev Mol Cell Biol* **11** (2010) 700–714.
17. https://en.wikipedia.org/wiki/Fas_ligand (datum pristupa 10. ožujak 2019.)
18. L. Wang, J.K. Yang, V. Kabaleeswaran, A.J. Rice, A.C. Cruz, A.Y. Park, Q. Yin, E. Damko, S.B. Jang, S. Raunser, C.V. Robinson, R.M. Siegel, T. Walz, H. Wu, *Nat Struct Mol Biol.* **17** (2010) 1324-1329.
19. M.O. Hengartner, *Nature* **407** (2000) 770-776.
20. C. Candé, I. Cohen, E. Daugas, L. Ravagnan, N. Larochette, N. Zamzami, G. Kroemer, *Biochimie* **84** (2002) 215–222.
21. https://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_c (datum pristupa 10. ožujka 2019.)
22. M.J.B. van den Hoff, S.M. van den Eijnde, S. Virágh, A.F.M. Moorman, *Cardiovasc res* **45** (2000) 603-620.
23. I. Damjanov, S. Seiwerth, S. Jukić, M. Nola, Patologija Medicinska naklada, Zagreb, 2018, str. 480.
24. J.C. Reed, *J. Cell Biol* **124** (1994) 1-6.
25. L. Galletta, *Biophys. J.* **97** (2009) 3047-3053
26. J. Suzuki, M. Umeda, P. J. Sims, S. Nagata, *Nature* **468** (2010) 834-838.
27. C. Alvadia, N. K. Lim, V. C. Mosina, G. T. Oostergetel, R. Dutzler, C. Paulino, *eLIFE* **8** (2019) 1-28
28. J. Suzuki, D. P. Denning, E. Imanishi, H. R. Horvitz, S. Nagata, *Science* **341** (2013) 403-406.
29. J. Suzuki, E. Imanishi, S. Nagata, *J Biol Chem* **289** (2014) 30257-30267.
30. G. Yachdav, E. Kloppmann, L. Kajan, M. Hecht, T. Goldberg, T. Hamp, P. Hönigschmid, A. Schafferhans, M. Roos, M. Bernhofer, L. Richter, H. Ashkenazy, M. Punta, A. Schlessinger, Y. Bromberg, R. Schneider, G. Vriend, C. Sander, N. Ben-Tal, B. Rost et al. *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) W337-43.
31. S. Nagata, J. Suzuki, K. Segawa, T. Fujii, *Cell Death and Differ.* **23** (2016), 952–961.
32. J. Suzuki, E. Imanishi, S. Nagata, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **113** (2016) 9509-9514.
33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=682> (datum pristupa 13. svibnja 2019.)
34. <https://en.wikipedia.org/wiki/NPTN> (datum pristupa 13. svibnja 2019.)

35. B. Fadeel, B. Gleis, K. Högstrand, J. Chandra, T. Wiedmer, P. J. Sims, J. I. Henter, S. Orrenius, A. Samali, *Biochem Biophys Res Commun* **40** (1999) 504-511.
36. V. A. Fadok, A. de Cathelineau, D. L. Daleke, P. M. Henson, D. L. Bratton, *J Biol Chem* **276** (2001) 1071-1077.
37. X. Tang, M. S. Halleck, R. A. Schlegel, P. Williamson, *Science* **272** (1996) 1495-1497.
38. G. Lenoir, P. Williamson, C. F. Putus, J. C. M. Holthuis, *J. Biol. Chem* **284** (2009) 17956-17967.
39. L. M. van der Velden, C. G. K. Wlchers, A. E. D. van Breevoort, J. A. Coleman, R. S. Molday, R. Berger, L. W. J. Klomp, S. F. van de Graaf, *J. Biol. Chem* **285** (2010) 40088-40096.
40. K. Segawa, S. Kurata, Y. Yanagihashi, T. Brummelkamp, F. Matsuda, S. Nagata, *Science* **344** (2014) 1164-1168.
41. D. L. Bratton, V. A. Richter, J. M. Kailey, L. A. Guthrie, P. M. Henson, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 26159-26165.
42. K. Segawa, S. Kurata, S. Nagata, *J. Biol. Chem.* **291** (2016) 762-772.
43. P. Lykavieris, S. Mil, D. Crestein, M. Fabrem M. Hadchouel, L. Klomp, O. Bernard, E. Jacquemin, *J. Hepatol.* **29** (2003) 447-452
44. M. Miyanishi, K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura, S. Nagata, *Nature* **450** (2007), 435-439.
45. R. Hanayama, M. Tanaka, K. Miwa, A. Shinohara, A. Iwamatsu, S. Nagata, *Nature* **417** (2002) 182-187.
46. X. Fan, S. Krahling, D. Smith, P. Williamson, R. A. Schlegel, *Mol. Biol. Cell* **15** (2004) 2863-2872.
47. C. Santiago, A. Ballesteros, L. Martinez-Muñoz, M. Mellado, G. G. Kaplan, G. J. Freeman, J. M. Casasnovas, *Immunity.* **27** (2007) 941-951.
48. R. Hanayama, M. Tanaka, K. Miyasaka, K. Aozasa, M. Koike, Y. Uchiyama, S. Nagata, *Science.* **304** (2004) 1147-1150.
49. X. Fan, S. Krahling, D. Smith, P. Williamson, R. A. Schlegel, *Mol Biol Cell.* **15** (2004) 2863-2872.
50. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=301> (datum pristupa 17. svibnja 2019.)
51. H. Kenis, H. van Genderen, N.M. Deckers, P.A. Lux, L. Hofstra, J. Narula, C.P. Reutelingsperger *Exp. Cell. Res.* **312** (2006) 719-726.

-
52. S. Kalenić i sur., Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2013, str. 480.
 53. K. Morizono, I. S. Chen, *J Virol.* **88** (2014) 4275–4290.
 54. L. P. Kane, *J Immunol.* **184** (2010) 2743–2749.
 55. B. Sims, A. L. Farrow, S. D. Williams, A. Bansal, A. Krendelchtchikov, L. Gu, Q. L. Matthews, *Int. J. Nanomed.* **12** (2017) 4823-4833.
 56. I. Damjanov, S. Seiwerth, S. Jukić, M. Nola, Patologija Medicinska naklada, Zagreb, 2018, str.175.
 57. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (datum pristupa 11. svibnja 2019.)
 58. S. Ran, A. Downes, P. E. Thorpe, *Cancer Res* **62** (2002) 6132-6140.
 59. M. K. Callahan, P. Williamson, R. A. Schlegel, *Cell Death Differ.* **7** (2000) 645-653.
 60. R. S. Flannagan, J. Canton, W. Furuya, M. Glogauer, S. Grinstein, *Mol Biol Cell.* **25** (2014) 1511–1522.