

# Superobitelj ABC-prenositelja

---

**Kliček, Filip**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:682156>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**FILIP KLIČEK**

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Sveučilište u Zagrebu

# **SUPEROBITELJ ABC-PRENOSITELJA: STRUKTURA, FUNKCIJA I KLINIČKA VAŽNOST**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za Biokemiju

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

Zagreb, 2016

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	20. srpnja 2016
Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:	9. rujna 2016
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	16. rujna 2016

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

Potpis:

## Sadržaj

<b>§ Sažetak .....</b>	<b>iv</b>
<b>§ 1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Stanična membrana .....</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1. Membranski proteini i prijenos tvari preko membrane .....</i>	<i>3</i>
<b>§ 2. Prikaz odabrane teme .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Superobitelj - subobitelj ABC prenositelja.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Struktura ABC prenositelja .....</b>	<b>7</b>
<i>2.2.1. Osnovne strukturne karakteristike.....</i>	<i>7</i>
<i>2.2.2. Struktura nukleotid-vezne domene ABC prenositelja.....</i>	<i>9</i>
<i>2.2.3. Struktura transmembranske domene ABC prenositelja.....</i>	<i>10</i>
<b>2.3. Funkcija ABC prenositelja.....</b>	<b>13</b>
<i>2.3.1. Mehanizam prijenosa tvari .....</i>	<i>13</i>
<b>2.4. Klinička uloga .....</b>	<b>17</b>
<i>2.4.1. Cistična fibroza.....</i>	<i>18</i>
<i>2.4.2. Ateroskleroza .....</i>	<i>19</i>
<i>2.4.3. Upale .....</i>	<i>21</i>
<i>2.4.4. Melanom.....</i>	<i>22</i>
<b>2.5. Zaključak .....</b>	<b>23</b>
<b>§ 3. Literaturna vrela .....</b>	<b>24</b>

## § Sažetak

U živom svijetu ABC prenositelji su sveprisutna superobitelj transmembranskih membranskih proteina. Superobitelj se dijeli na sedam pojedinih subobitelji koje označavamo slovima A-G. Aktivni su prenositelji (pumpe) što znači da hidroliziraju molekule ATP-a kako bi pogonili transport tvari preko membrane usprkos elektrokemijskog gradijenta. Supstrati koje prenose su aminokiseline, peptidi, proteini, metalni ioni, lipidi... Ovisno o smjeru prijenosa tvari razlikujemo ABC importere i ABC eksportere.

ABC prenositelji su međusobno strukturno vrlo slični i njihova je struktura dobro očuvana kroz evoluciju. Građeni su od dvije transmembranske domene i dvije nukleotid-vezne domene. Jedna transmembranska domena i nukleotid-vezna domena ostvaruju strukturnu cjelinu koja čini polovicu prenositelja. Shodno tome prenositelji mogu biti građeni kao homodimeri ili heterodimeri. Nukleotid-vezna domena nije prolazila značajnije promjene kroz evoluciju te je gotovo identična među subobiteljima. S druge strane transmembranske dome se razlikuju među prenositeljima. Prema građi transmembranske domene i smjeru prijenosa tvari razlikujemo ABC importere tipa I, II i III te eksportere.

Zbog strukturnih razlika prenositelja nastaju i razlike u mehanizmu prijenosa tvari. Općeprihvaćen mehanizam prijenosa tvari je „mehanizam alternirajućeg pristupa“, po kojem se prenositelj može nalaziti u dvije alternirajuće konformacije s veznim mjestom za ligand izloženim prema periplazmatskom prostoru, odnosno citoplazmi. Međutim, u posljednjih nekoliko godina predloženi su i alternativni mehanizmi prijenosa tvari i izmjene konformacije ABC prenositelja.

Zbog svoje sveprisutnosti i iznimno važne funkcije prijenosa tvari, mutacije gena koji kodiraju ABC prenositelje mogu izazvati vrlo teška i smrtonosna oboljenja. U ovom radu biti će dan osvrt na njihovu ulogu u nastanku cistične fibroze, arteroskleroze, upalnih procesa te kako poznavanje mehanizma djelovanja ove skupine proteina može u budućnosti pomoći pri ranom otkrivanju metastaza.

## § 1. Uvod

Fundamentalna jedinica života je stanica. Prva jednostavna stanica pojavila se prije 3,8 milijuna godina i pretpostavlja se da se sastojala se od samoreplicirajuće RNA unutra fosfolipidne membrane. Evolucijom su se iz prve stanice razvila dva osnovna tipa stanica u suvremenom svijetu: prokariotska i eukariotska stanica. Zbog zajedničkog evolucijskog pretka, fundamentalne stanične strukture su zadržane u obje vrste stanice: stanična membrana, citosol i ribosomi. Eukariotska stanica je složenija od prokariotske. Osnovna razlika među stanicama je postojanje organela i organizacija genoma. Prokariotska stanica nema organela i svi se procesi odvijaju u jednom odjeljku, dok eukariotska stanica posjeduje organele i među njima postoji stroga podjela funkcija. Nukleoid (prokariotski genom) nije odijeljen od ostatka stanice dok je nukleus (eukariotski genom) odijeljen poroznom membranom.

### 1.1. Stanična membrana

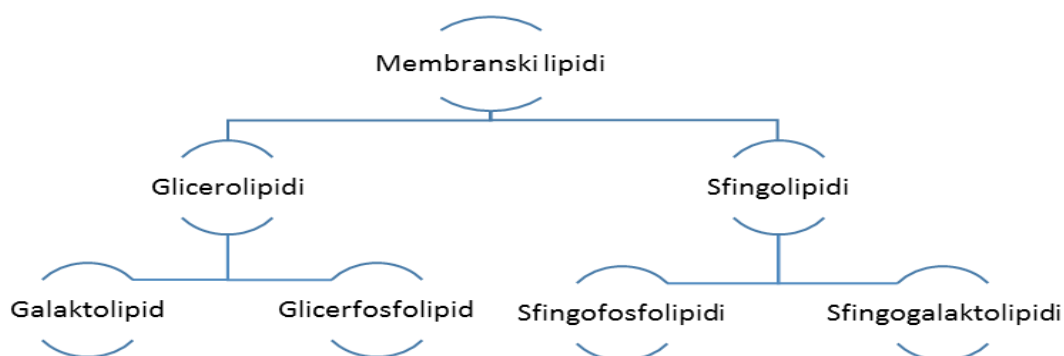
Membrane definiraju vanjske granice stanica te kontroliraju prijenos molekula u i iz stanice. Organeli eukariotskih stanica građeni su od vlastitih membrana, a neki organeli posjeduju i vlastiti genom. Membrane organiziraju kompleksne reakcijske puteve, važne su prilikom stanične pretvorbe energije te se preko njih odvija komunikacija među stanicama. Karakteristike svih membrana su fleksibilnost, selektivno su propusne prema polarnim tvarima i gotovo nepropusne za nabijene tvari te su samo-zatvarajuće.<sup>1</sup>

Osnovna građevna jedinica staničnih membrana su amfipatski<sup>1</sup> lipidi. Membranski lipidi su građeni od alkoholne okosnice (glicerol ili sfingozin) na koju esterskom vezom mogu biti vezane masne kiseline i različite polarne ili nabijene skupine (fosfati, saharidi, alkoholi, ...). Ovisno o okosnici, lipide dijelimo na: glicerolipide i sfingolipide. Također, ovisno o sastavu

---

<sup>1</sup> Amfipatska molekula je građena od hidrofilne i hidrofobne regije.

polarnog dijela molekule (polarne glave), razlikujemo: fosfolipide (sadrže fosfat) i glikolipide (sadrže saharide).



Slika 1. Podjela membranskih lipida prema okosnici i polarnoj glavi.

Glicerofosfolipidi, drugog naziva fosfogliceridi, građeni su od glicerolne okosnice na koju su vezane masne kiseline esterskom vezom na prvi i drugi C-atom glicerola, i polarne ili nabijene glave (serin, kolin, ... ) koja je vezana na treći C-atom glicerola fosfodieterskom vezom. Fosfogliceridi su najrašireniji tip lipida i ovisno o njihovoj strukturi uvelike će ovisiti svojstva membrane.

Lipidi su netopljivi u vodi i stoga stvaraju lipidne agregate. Termodinamski gledano stvaranje lipidnih agregata je potaknuto povećanjem entropije. Agregati smanjuju dodirnu površinu između hidrofobnog dijela lipida i vode, čime se smanjuje broj molekula vode koje mora biti uređene oko lipida, što je entropijski povoljno. Ovisno o prirodi lipida, nastaju tri tipa agregata: micle, dvosloj i vezikule. Lipidni dvosloj je tip agregata kojeg grade membranski lipidi i u kojem dva lipidna sloja čine dvodimenzionalnu strukturu. Kontakt među slojevima lipida ostvaren je preko hidrofobnih dijelova lipida, dok je hidrofilna glava solvativirana molekulama vode s obje strane dvosloja. Lipidni dvosloj je nestabilan jer su hidrofobni rubovi u kontaktu s vodom stoga se lipidni dvosloj savija čineći time šuplju sferu, vezikulu. Vezikula je najstabilniji agregat membranskih lipida u vodenoj otopini jer eliminira izlaganje hidrofobnih regija lipida vodenom mediju. Zbog svoje stabilnosti iz vezikule se razvila današnja stanična membrana.<sup>1</sup>

Građa stanične membrane objašnjava se modelom tekućeg mozaika. Stanična membrana je građena od lipidnog dvosloja koji je zatvoren u veliku vezikulu. Lipidi u dvosloju imaju očekivanu orijentaciju, hidrofobne regije se nalaze u unutrašnjosti dvosloja dok

hidrofilne regije interagiraju s vodenim medijem. Mozaičnost membrane slikovito opisuje da membrana nije homogeno građena samo od membranskih lipida već su u nju nejednoliko ugrađeni razni proteini i kolesterol. Membrana je asimetrične građe tj. može se po sastavu razlikovati vanjski (međustanični prostor) i unutarnji (citosol) sloj lipidnog dvosloja. „Tekući mozaik“ naglašava činjenicu da konstituenti membrane u principu mogu slobodno gibati u ravnini lipidnog dvosloja. Također, lipidi uz pomoć proteina (flipaze, flopaze i skramblaze) mogu mijenjati orijentaciju što dodatno potvrđuje model tekućeg mozaika.

### *1.1.1. Membranski proteini i prijenos tvari preko membrane*

Sastavni dio stanične membrane čine proteini koju su vršitelji gotovo svih membranskih funkcija. Proteini mogu biti ugrađeni u lipidni dvosloj ili kovalentno/elektrostatski asocirani na površinu lipidnog dvosloja s obje strane dvosloja. Stoga razlikujemo transmembranske proteine (ugrađene u membranu) i periferne proteine (asocirane uz membranu). Transmembranski proteini ostvaruju interakciju s membranom preko transmembranske domene tj. preko hidrofobnih bočnih ogranaka na transmembranskoj domeni koji su okrenuti prema lipidnom dvosloju, dok se hidrofilni bočni ogranci i skupine nalaze u unutrašnjosti transmembranske domene. Periferni proteini mogu ostvarivati interakciju s površinom lipidnog dvosloja preko nabijenih bočnih ogranaka ili mogu biti kovalentno vezani za sam lipid ili za membranu preko oligosaharidnog sidra.

Funkcija membranskih proteina je izrazito raznolika. Mnogi membranski proteini sudjeluju u biosignalnim putevima kao receptori i prenositelji primarnog signala koji pokreće ciljanu kaskadu enzimskih reakcija u stanici. Također i enzimi mogu biti ugrađeni u membranu gdje kataliziraju razne reakcije. U ovom radu posebna pažnja biti će usmjerena na izuzetno važnu funkciju membranskih proteina, a to je prijenos tvari preko membrane.

Zbog činjenice da je stanična membrana gotovo nepropusna za polarne i nabijene tvari,<sup>1</sup> evolucijom su se razvili proteini čija je uloga premostiti lipidni dvosloj te omogućiti izmjenu tvari između citosola i međustaničnog prostora. Izmjena tvari je moguća bez utroška energije (pasivni transport) ili s utroškom energije (aktivni transport).



Pasivni transport se odvija u smjeru elektrokemijskog gradijenta<sup>II</sup> liganda. Proteini koji omogućavaju pasivni prijenos tvari dijele se na kanale i prenositelje. Strukturno se protežu punom dužinom kroz lipidni dvosloj te su uglavnom oligomerni proteini. Prenositelji ubrzavaju selektivno kretanje otopljenih tvari preko membrane olakšavajući difuziju otopljenje tvari. Kanali uglavnom pospješuju prijenos iona i vode. Učestali strukturni motivi su:  $\alpha$ -zavojnica i  $\beta$ -bačva. Otvaranje kanala regulirano je određenim signalom koji je karakterističan za svaki pojedini kanal. Kada su otvoreni omogućavaju gibanje iona u smjeru njihovog elektrokemijskog gradijenta brzinom koja je bliska brzini slobodne difuzije. Pokazuju specifičnost za ione, ali ne podliježu kinetičkom efektu zasićenja proteina.

Aktivni transport se odvija u smjeru suprotnom od elektrokemijskog gradijenta tvari koja se prenosi. Takav prijenos tvari omogućavaju aktivni prenositelji ili pumpe. Prema „izvoru“ energije razlikujemo primarne i sekundarne prenositelje. Primarni aktivni prenositelji koriste energiju dobivenu direktno iz kemijske reakcije. Sekundarni aktivni prenositelji sprežu prijenos jedne tvari u smjeru elektrokemijskog gradijenta s prijenosom tvari suprotno od njenog elektrokemijskog gradijenta. U kategoriju primarnih aktivnih prenositelja pripada obitelj ATPaza.

Obitelj ATPaza je specifična jer kao izvor energije za aktivni prijenos tvari katalizira hidrolizu ATP-a<sup>III</sup>. Razlikujemo tri tipa ATPaza. ATPaza tipa P sudjeluju u aktivnom prijenosu metalnih kationa u stanici (P označava autofosforilacijsku aktivnost). ATPaza tipa F sudjeluju u reakcijama koje služe za dobivanje energije u mitohondrijima, bakterijama i kloroplastima te u određenim uvjetima mogu hidrolizirati molekule ATP-a (F od „*energy coupling-factor*“ u prijevodu s eng. faktor energetske sprege). F-ATPaza je sinonim za ATP-sintazu. ATPaze tipa V su slične ATP-azama tipa F i služe za povećanje koncentracije H<sup>+</sup> iona u mnogim staničnim odjeljcima. U obitelj ATPaza pripada superobitelj ABC (*ATP binding casete* prijevod s eng. ATP vezne kasete) prenositelja. Prema navedenoj podjeli ATPaza, ABC prenositelji čine zasebnu kategoriju.

---

<sup>II</sup> Suma koncentracijskog i električnog gradijenta

<sup>III</sup> Adenozin trifosfat

Također, razlikuju se vrste prijenosa tvari s obzirom na broj supstrata. Tako razlikujemo uniport (jedan supstrat se prenosi), simport (prenose se dva supstrata u istom smjeru) i antiport (prenosi dva supstrata u suprotnim smjerovima). Simport i antiport se objedinjeno nazivaju kotransporti.

## § 2. Prikaz odabrane teme

### 2.1. Superobitelj - subobitelj ABC prenositelja

ABC prenositelji, kako je već rečeno, pripadaju obitelji ATPaza. Koriste energiju dobivenu iz hidrolize molekula ATP-a kako bi pogonili prijenos liganada preko stanične membrane (objašnjenje u daljnjem tekstu). Strukturno su građeni kao heterodimeri ili homodimeri. ABC prenositelji mogu biti eksporter (prenose tvari iz stanice u okolinu) ili importer (prenose tvari u stanicu iz okoline). Predstavljaju veliku, raznovrsnu i sveprisutnu superobitelj membranskih prenositelja.<sup>2</sup> Veličina i sveprisutnost ove superobitelji se može objasniti s evolucijskog stajališta. Najvjerojatnije su to bili prvi prenositelji koji su se pojavili u staničnoj membrani.

Supstrati ABC prenositelja su aminokiseline, peptidi, proteini, metalni ioni, lipidi, žučne soli i mnoštvo hidrofobnih spojeva. Važan aspekt aktivnosti ABC prenositelja je njihova uloga u otpornosti stanice na razne lijekove. Zbog te uloge pacijenti oboljeli od raka mogu postati rezistentni na dobivene lijekove nakon dužeg vremena.

Ljudski genom nosi 48 ABC gena koji čine superobitelj te su podijeljeni u sedam subobitelji. Subobitelji su označene velikim tiskanim slovima od A do G. Geni su organizirani tako da kodiraju cijele prenositelje ili „polu-prenositelje“. Cijeli prenositelji (građeni su od dvije transmembranske domene i dvije nukleotid-vezne domene) mogu biti kodirani jednim genom ili geni mogu kodirati „polu-prenositelje“ (građeni su od samo jedne transmembranske domene i jedne nukleotid-vezne domene) koji se potom slažu u funkcionalne homodimere ili heterodimere.<sup>2,9</sup>

Subobitelj A sadrži 12 gena koji kodiraju cijele prenositelje. Proteini subobitelji A uključeni su u promet lipida u raznim organima i tipovima stanica. U ovoj superobitelji nalaze se neki od najvećih ABC prenositelja. Subobitelj B je jedinstvena za sisavce te ovdje nalazimo gene koji kodiraju „polu-prenositelje“ (četiri gena) i cijele prenositelje (četiri gena). Neki od supstrata ove subobitelji su: peptidi, žučne soli, željezo, Fe/S klaster. Osobito su aktivni u kancerogenim stanicama. Subobitelj C kodira dvanaest cijelih prenositelja. Nadalje, subobitelj C sadrži gene koji kodiraju: 1) kanal za ione klora, 2) prenositelje čiji su ligandi nukleotidi i 3)

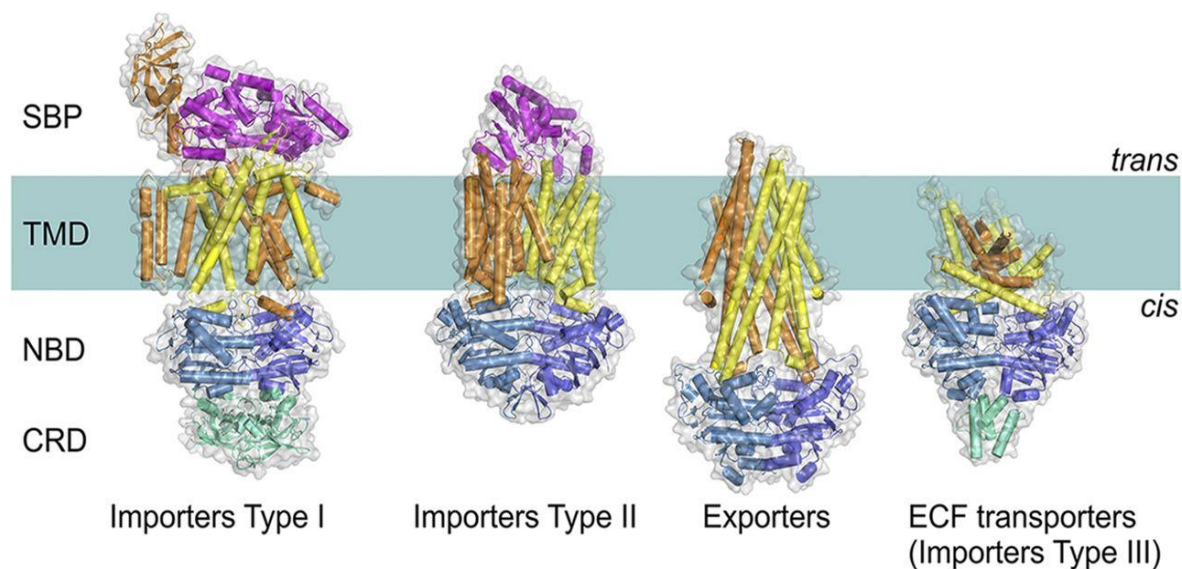
prenositelje koji izbacuju bakterijske i gljivične toksine iz stanice. Članovi ove obitelji sudjeluju i u biosignalizaciji. Subobitelj D sadrži četiri gena koji kodiraju polu-prenositelje. Geni se isključivo ekspremiraju u peroksisomima. U subobitelji E nalazi se samo jedan protein koji prepoznaje oligoadenilatne produkte određenih virusnih infekcija. Protein ne posjeduje transmembransku domenu. Karakteristika subobitelji F je da ne posjeduje transmembranske domene, čime je njihova transporterska funkcija upitna. Članovi subobitelji G su obrnuti „polu-prenositelji“ što znači da se nukleotid-vezna domena nalazi na N-kraju dok je transmembranska domena na C-kraju proteina.<sup>2,9</sup>

## 2.2. Struktura ABC prenositelja

### 2.2.1. Osnovne strukturne karakteristike

Svi ABC prenositelji imaju jezgru koja se sastoji od dvije transmembranske domene (TMD) i dvije nukleotid-vezne domene (NBD). NBD su evolucijski očuvane, u vidu strukture i aminokiselinskog slijeda te su ujedno i biljeg superobitelji. NBD nije uvijek asociiran na transmembransku domenu već može biti uključen u razne funkcije koje se ne događaju na staničnoj membrani. Zbog prethodne činjenice ime ABC prenositelj se koristi jedino kada postoji kompleks transmembranske domene i nukleotid-vezne domene na staničnoj membrani.<sup>3</sup>

TMD, za razliku od NBD-a, pojavljuje se u nekoliko nepovezanih struktura. Strukture međusobno ne dijele značajne sličnosti u aminokiselinskom slijedu. Stoga su, do sad, određena četiri tipa ABC prenositelja prema strukturi transmembranske domene (Slika 2).



Slika 2. Četiri tipa ABC prenositelja prema strukturi transmembranske domene. Transmembranske (TMD) domene su žuto i narančasto obojene, nukleotid-vezne domene (NBD) su tamno i svjetlo plavo obojene. CRD (zeleno) i SBP (ljubičasto) su dodatni proteini koji sudjeluju u regulaciji ABC prenositelja i pomažu prilikom prijenosa supstrata. *Trans* označava izvanstanični prostor dok *cis* označava unutar stanični prostor. Preuzeto iz <sup>3</sup>

Tri tipa ABC prenositelja su importeri (tip I, tip II i tip III) koji se mogu naći jedino kod prokariota. Četvrti tip ABC prenositelja je eksporter te je prisutan kod prokariota i eukariota.<sup>3</sup>

Kod prokariota struktura cijelog prenositelja ostvaruje se kroz kombinaciju individualno eksprimiranih domena TMD i NBD ili eksprimiranih parova TMD-NBD. Za razliku, kod eukariota većina ABC prenositelja građena je od jedinstvenog polipeptidnog lanka koji se smatra u sve četiri funkcionalne jedinice. Uz osnovne četiri podjedinice kod prokariota postoje i dva dodatna pomoćna proteina: CRD (C-terminalna regulatorna podjedinica) i SBP (supstrat-vezni protein).<sup>3</sup>

### 2.2.2. Struktura nukleotid-vezne domene ABC prenositelja

Svaka NBD ima jezgru od približno 200 aminokiselina i sastoji se od dvije subdomene: veća domena slična RecA (koja se nalazi i kod ostalih P-ATPaza) i strukturno raznolikiju domenu bogatu  $\alpha$ -zavojnica koja je jedinstvena za ABC prenositelje. Karakteristični i očuvani elementi primarne, sekundarne i tercijarne strukture nukleotid-vezne domene su (Slika 3):

A-petlja koja sadrži aromatičnu aminokiselinu (uglavnom tirozin) koja pomaže pozicionirati ATP

P-petlja ili Walker A motiv je fosfat-vezna petlja koja sadrži evolucijski sačuvani lizin. Amidni dušik iz okosnice i  $\epsilon$ -amino skupina lizina stvaraju mrežu interakcija s  $\beta$ -fosfatom i  $\gamma$ -fosfatom iz ATP-a.

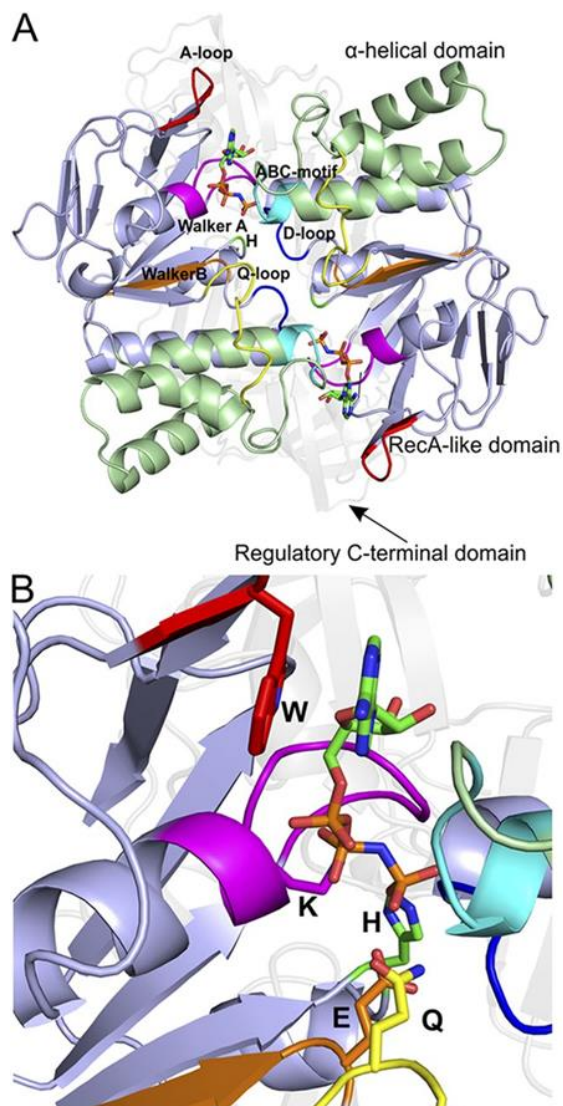
Walker B motiv ( $\phi - \phi - \phi - \phi - \text{Asp} - \text{Glu}$ , pri čemu je  $\phi$  hidrofobna aminokiselina) pomaže pri koordiniranju iona magnezija. Negativno nabijena aminokiselina na kraju motiva, često glutamat, vrlo vjerojatno polarizira molekulu vode.

D-petlja (motiv  $\text{Ser} - \text{Ala} - \text{Leu} - \text{Asp}$ ) slijedi odmah nakon Walker B motiva. Promjena konformacije D-petlje utječe na geometriju katalitičkog mjesta i pomaže prilikom stvaranja aktivnog mjesta.

H-petlja sadrži očuvani histidin. Histidin interagira s aspartatom iz D-petlje, glutamatom iz Walker B motiva i  $\gamma$ -fosfatom iz ATP-a. Potpomaže prilikom pozicioniranja vode, glutamata i magnezijevog iona.

Q-petlja je slijed od osam aminokiselina s očuvanim glutaminom na svojem N-kraju. Omogućava glutaminu unutra svoje petlje ulazak i izlazak iz aktivnog mjesta. Stvara aktivno mjesto kad su ATP-Mg vezani te isto narušava kada je ATP hidroliziran.

Karakteristični motiv ( $\text{Leu} - \text{Ser} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Gln}$ ) se pojavljuje u subdomeni. Nije prisutan kod ostalih ATPaza tipa P. Motiv se nalazi na N-kraju dugačke zavojnice koja usmjerava pozitivni naboj dipola zavojnice prema  $\gamma$ -fosfatu ATP-a.<sup>3,4</sup>



Slika 3 (A) Dimerna struktura nukleotid-vezne domene prenositelja maltoze; (B) Uvećani prikaz aktivnog mjesta, istaknute su važnije aminokiseline. Preuzeto iz <sup>3</sup>

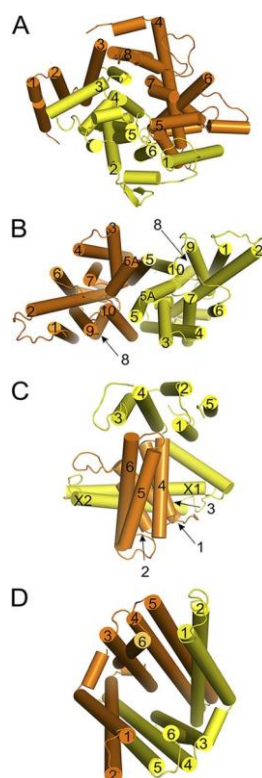
### 2.2.3. Struktura transmembranske domene ABC prenositelja

Kod sva četiri tipa ABC prenositelja put kojim se supstrati (ligandi) prenose ostvaruje se kroz interakcije transmembranskih domena.

Transmembranske domene importera tipa I su identične (homodimeri) ili strukturno slične. Svaka od TMD građena je od pet zavojnica. U mnogo slučajeva prisutna je dodatna N-terminalna zavojnica, koja omata zavojnice susjedne transmembranske domene i time isprepliće domene. Zbog toga zbroj zavojnica koje grade par transmembranskih domena iznosi 12. No međutim, neke TMD sadrže i po devet transmembranskih zavojnica. Prolaz za ligand se

formira između komplementarnih transmembranskih domena funkcionalnog prenositelja (Slika 4 A).<sup>3</sup> Proteini HisPQM (specifičan za histidin) i MalFGK (specifičan za maltozu) su primjeri tog tipa prenositelja koji su dobro istraženi.<sup>4</sup>

ABC importeri tipa II imaju dvije identične transmembranske domene pri čemu je svaka građena od deset transmembranskih zavojnica. U tipu II TMD su poravnate jedna kraj druge. Ne posjeduju zavojnice koje isprepliću susjedne transmembranske domene. Dodatno, u svakoj TMD postoji i pseudo dvostruka simetrija među segmentima koji sadrže zavojnice 2-5 i zavojnice 7-10. Te dvije subdomene imaju slično pakiranje, ali obrnute su orijentacije s obzirom na membranu. Zavojnice pojedine TMD su vrlo čvrsto pakirane, dvije TMD stvaraju poru kroz koju mogu prolaziti supstrati (Slika 4 B).<sup>3,4</sup> Kristalna struktura ABC importera tipa II određena je na proteinu BtuC (vitamin B<sub>12</sub> transporter) iz *Escherichia coli*.<sup>4</sup>



Slika 4. Struktura transmembranske domene ABC prenositelja. (A) MalF i MalG podjedinice prenositelja maltoze; (B) BtuC dimer prenositelja vitamina B<sub>12</sub>; (C) Žuto T-komponenta i S-komponenta prenositelja HmpZ; (D) membranske domene eksportera iz *Thermotoga maritima*. Transmembranske zavojnice su numerirane prema slijedu aminokiselina. Sprezajuće zavojnice obilježene su X1 i X2. Preuzeto iz <sup>3</sup>

Importer tipa III posjeduju strukturno i funkcionalno nepovezane transmembranske domene. Jedna TMD je označena kao T-komponenta koja može biti građena od četiri do devet transmembranskih zavojnica. Druga TMD se označava kao S-komponenta te veže supstrat koji



se prenosi s visokim afinitetom. S-komponenta je građena od šest transmembranskih zavojnica ali nekoliko S-komponenti ima i dodatnu N-terminalnu domenu. Kod ovog tipa prenositelja supstrat se najvjerojatnije prenosi preko S-komponente, a ne kroz TMD.<sup>3</sup> (Slika 4 C)

ABC eksportereri su međusobno vrlo slični te su građeni od šest transmembranskih zavojnica po domeni. Transmembranske zavojnice su izdužene u citosol stanice. Posljedično, NBD su od unutarnje površine membrane udaljene oko 25 Å. Prolaz za supstrat kod ABC eksportera se ostvaruje između dvije transmembranske domene. Kod svih ABC eksportera kojima je riješena trodimenzionalna struktura uočeno je da TMD i NBD ostvaruju interakciju, pri čemu tipično TMD prethodi NBD (postoje iznimke) (Slika 4D).<sup>3</sup> Prva kristalna struktura ABC eksportera visoke rezolucije određena je na proteinu Sav1866 iz *Staphylococcus aureus*. Kod proteina Sav1866 uočena je zanimljiva interakcija između dvije TMD. Individualne TMD nisu samo poravnate jedna pored druge već se međusobno obgrljuju. Riješena je kristalna struktura Sav1866 u kompleksu s ATP-om pri čemu je središnja šupljina između transmembranskih domena otvorena prema međustaničnom prostoru. Šupljina je relativno hidrofilna što sugerira da predstavlja sekrecijski džep, s malim afinitetom ili bez afiniteta prema hidrofobnim supstratima. Sav1866 je poslužio kao predložak za modeliranje humanih ABC prenositelja.<sup>4</sup>

Transmembranske domene ABC importera tipa I i II sadrže takozvane „sprezajuće zavojnice“ kojima se ostvaruje interakcija s nukleotid-veznom domenom. „Sprezajuća zavojnica“ je kratka  $\alpha$ -zavojnica u jednoj od TMD koja je pozicionirana u citoplazmi, a ne u membrani te ostvaruje interakciju s NBD monomerom. Na taj način su transmembranska domena i nukleotid-vezna domena spojene. Upravo pomoću sprezajuće zavojnice su konformacijske promjene u NBD povezane s TMD te se preko iste izazivaju konformacijske promjene u TMD. Sprezajuća zavojnica se može naći između treće i četvrte zavojnice kod importera tipa I, između šeste i sedme zavojnice kod importera tipa II te u intracelularnoj omći između četvrte i pete zavojnice kod ABC eksportera. Regija NBD koja interagira sa sprezajućom zavojnicom TMD-a sadrži Q-omću. Brazda u koju se pozicionira sprezajuća zavojnica nalazi se između dvije subdomene NBD-a.<sup>3</sup>

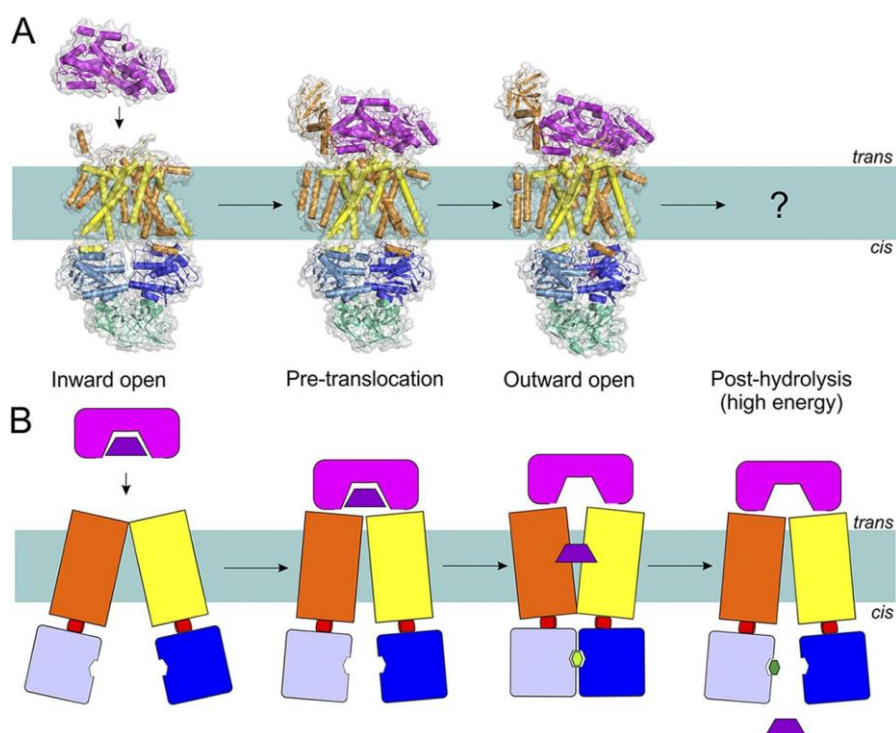
## 2.3. Funkcija ABC prenositelja

Glavna funkcija cijele superobitelj ABC prenositelja je prijenos tvari preko membrane. Glavna karakteristika mehanizma prilikom prijenosa tvari je promjena konformacije transmembranske domene i nukleotid-vezne domene uslijed vezanja ili hidrolize ATP-a. Zbog strukturne raznolikosti ABC prenositelja, raznolik je i njihov mehanizam prijenosa tvari.

### 2.3.1. Mehanizam prijenosa tvari

Mehanizam tipa I ABC importera objašnjen je na dobro okarakteriziranom ABC importeru maltoze iz *E. coli*. ABC importer maltoze je građen od MalF i MalG transmembranske domene, dvije MalK citoplazmatske ATPaze i periplazmatskog proteina MBP (*maltose-binding protein*).<sup>3,5</sup> Generalno prihvaćeniji mehanizam je „mehanizam alternirajućeg pristupa“, čiji je princip objašnjen u idućem odlomku.

U prvom koraku, dok nema vezanih nukleotida, transmembranske domene su otvorene prema citoplazmi. U drugom koraku MBP donosi supstrat te se zajedno sa supstratom veže na transmembranske domene s vanjske strane. Vezanje MBP-a izaziva konformacijske promjene u transmembranskoj domeni i nukleotid-veznoj domeni. Uslijed ove konformacijske promijene povećava se afinitet NBD-a prema ATP-u. U trećem koraku, ATP se veže na svaku od dvije NBD te dolazi do sparivanja NBD. Sparivanje posljedično otvara šupljinu između TMD prema vanjskoj strani membrane što omogućava maltozi ulazak u šupljinu. Tijekom ovog koraka MBP je još uvijek vezan na transmembranske domene. U četvrtom koraku dolazi do hidrolize ATP-a i otpuštanja maltoze u citoplazmu. Sama hidroliza ATP-a ne mijenja konformaciju ABC importera već naknadno otpuštanje ADP-a i ortofosfata omogućava povratak transmembranskih domena u početni položaj. U ovom koraku dolazi i do disocijacije MBP-a.<sup>3</sup>



Slika 5. Prikaz mehanizma prijenosa tvari pomoću ABC importera tipa I na maltoznom transporteru iz *E. coli*. (A) Strukturni prikaz (B) Shematski prikaz. NBD (plavo i svjetlo-plavo), TMD (narančasto i žuto), MBP (ružičasto), maltoza (ljubičasto), ATP (svijetlo-zeleno) i ADP (tamno-zeleno). *Trans* (periplazmatski prostor) i *cis* (citoplazma). Preuzeto iz <sup>3</sup>

Maltoza difuzijom ulazi u periplazmatski prostor i veže se na MBP s visokim afinitetom, dok je afinitet transportera prema maltozi upola manji. Zbog ove činjenice prijenos maltoze s MBP na transporter je gotovo nemoguć, ali se svejedno događa. Razlog tomu je što maltoza unutar kompleksa MBP:maltoza ostvaruje interakcije s oba reznja proteina. Kada se MBP veže na prenositelj mijenja mu se konformacija zbog čega je maltoza u tom kompleksu u kontaktu samo s jednim reznjem, što značajno smanjuje afinitet MBP prema maltozi. Dodatno, MalG podjedinica posjeduje periplazmatsku omču koju umeće u maltoza-vezno mjesto. Omča možebitno služi kao kompetitivni ligand koji onemogućuje vezanje maltoze na MBP-a.<sup>5</sup>

Periplazmatski MBP potreban je i za inicijaciju transporta maltoze. Naime, MBP stimulira ATPaznu aktivnost ABC prenositelja. Biološki razlog je taj: ako MBP nije vezan na TMD, ABC prenositelj ima vrlo nisku ATPaznu aktivnost. Razlog niske ATPazne aktivnosti prenositelja je nedostatak ključnih aminokiselina u aktivnom mjestu. Vezanjem MBP-a dolazi do približavanja i parcijalnog ostvarivanja interakcija nukleotid-veznih domena te se tako dovode katalitički aktivne aminokiseline u kontakt sa suprotnom nukleotid-veznom domenom. D-omča i Walker A motiv u nukleotid-veznoj domeni su senzori  $\gamma$ -fosfata ATP-a koji svojim vezanjem izaziva konformacijsku promjenu D-omče, koja nadalje propagira otvaranje transmembranskih

domena prema vanjskoj strani membrane. U toj konformaciji ABC prenositelja dolazi do hidrolize ATP-a te se karakteristični strukturni motiv ABC prenositelja s jedne domene pozicionira u ATP-vezno mjesto suprotne domene. U aktivnom mjestu stvara se mreža interakcija između ATP-a,  $Mg^{2+}$ , vode i evolucijski sačuvanih katalitički aktivnih aminokiselina.<sup>5,11</sup>

Hidroliza ATP-a destabilizira interakciju između nukleotid-veznih domena te reorijentira transmembranske domene pri čemu simultano disocira MBP u periplazmatski prostor.<sup>5</sup>

Predložen je i alternativni mehanizam u kojem ATP samostalno diktira prijenos tvari preko ABC importera maltoze, a ne uslijed prenositeljem-posredovane interakcije s MBP. U alternativnom mehanizmu ATP samostalno može inicirati konformacijsku promjenu transmembranskih domena iz otvorenih prema citoplazmi u otvorene prema periplazmatskom prostoru. To je moguće jer vezanje ATP-a stimulira dimerizaciju nukleotid-veznih domena. Startna konformacija u alternativnom mehanizmu ABC importera je otvorena prema periplazmatskom prostoru pri čemu su na importer vezani ATP i MBP bez supstrata. To je pretpostavljeno jer se dominantne interakcije događaju između MBP-a i importera na koji je vezan ATP, te zbog visoke koncentracije ATP-a u citoplazmi. Umjesto inicijacije transporta, MBP protein u alternativnom mehanizmu potiče disocijaciju ADP-a i ortofosfata te time utječe na obrtni broj transporter. Ista opažanja su nađena kod ABC importera tipa I i II te ABC eksportera. Alternativni mehanizam je predložen i istraživan jer se MBP veže s nanomolarnim afinitetom na transporter koji je otvoren prema periplazmatskom prostoru te ne dolazi do značajne promjene ATPazne aktivnosti u odsustvu MBP i maltoze. U daljnjem istraživanju treba odrediti limitirajući korak prilikom transporta maltoze.<sup>6</sup>

Uz generalnu građu ABC prenositelja postoji i niz dodatnih domena koji izvršavaju razne funkcije, uglavnom regulatorne. Primjer regulacije nalazimo kod molibdat/volframat ABC importera iz *Methanosarcina acetivorans*. Regulatorna domena veže volframat i drži importer otvoren prema citosolu kada je koncentracija volframata u citoplazmi visoka. Isti način regulacije nalazimo i kod metionin importera iz *E. coli*. Osim regulacijske aktivnosti, na dodatne domene mogu biti vezani i razni proteini.<sup>7</sup>

Važno je naglasiti da u navedenim radovima regulacija ABC prenositelja nije u fokusu. Po mom mišljenju ključ po kojem bi se predložena dva oprečna mehanizma prijenosa maltoze

ujedinila nalazi su upravo u regulaciji. Nadalje, vjerojatniji je alternativni i noviji mehanizam zbog izrazito visoke koncentracije ATP-a u bakterijskoj stanici. Jak argument alternativnog mehanizma je mala promjena ATPazne aktivnosti u odsustvu MBP i maltoze, no ovo može biti i varljiv dokaz zbog nedostatka informacije o interakcijama prenositelja s regulatornim molekulama.

Pretpostavljeni mehanizam ABC eksportera je isti kao i kod ABC importera tipa I s tom razlikom da se supstrat veže neposredno na prenositelj te se prijenos tvari odvija u suprotnom smjeru, tj. iz stanice.

Za razliku od importera, eksporterima nije potreban dodatni protein za dovođenje supstrata već ga oni samostalno vežu. Predložena su četiri načina na koja ABC prenositelj prepoznaju i prenose supstrat. U prvom načinu supstrat iz unutrašnjosti (stanice ili organela) ulazi u lipidni dvosloj te se potom veže na prenositelj i direktno otpušta u izvanstanični prostor. U drugom načinu, kao i u prvom, supstrat se veže iz lipidnog dvosloja ali se u ovom slučaju prenosi na akceptor. U trećem načinu, koji je karakterističan za ione i otopljene tvari, supstrat se veže na prenositelj iz citoplazme i prenosi direktno u izvanstanični prostor. Četvrti način je sličan trećem samo što se supstrat prenosi na akceptor, a ne otpušta se u izvanstanični prostor.<sup>10</sup>

Zanimljivo svojstvo eukariotskih ABC prenositelja je postojanje nesimetričnih ATPaznih mjesta. Oni nastaju kada dođe do mutacije od očuvanog slijeda aminokiselina. Rezultat je gotovo jedinstven i specifičan među različitim vrstama (ribe, ptice, sisavci). Jedna NBD je očuvana i funkcionalno aktivna dok je samo na drugoj domeni došlo do mutacije i do značajnog smanjenja ATPazne aktivnosti. Prilikom ovakve mutacije transporter je još uvijek aktivan ili ima oslabljenu aktivnost. Zbog toga je mehanizam prijenosa tvari malo izmijenjen i umjesto dvije molekule ATP-a troši se samo jedna za aktivni prijenos tvari. Dodatna razlika u odnosu na mehanizam alternirajućeg pristupa je način na koji se NBD dimer otvara. Uobičajeno je potrebno hidrolizirati dvije molekule ATP-a da bi se NBD dimer otvorio, no ovisno energetske barijeri simultane konformacijske promjene TMD i NBD u odnosu na brzinu hidrolize ATP-a, jedna molekula ATP-a može biti dovoljna za disocijaciju NBD dimera, čak i ako su oba aktivna mjesta očuvana. NBD s mutacijom u aktivnom mjestu zadržala je strukturnu ulogu, tj. sudjeluje u stvaranju NBD dimera. Također se smatra da naknadna hidroliza ATP-a u mutiranom

aktivnom mjestu pomaže prilikom otvaranja kompleksa prema citoplazmi. Asimetrične nukleotid-vezne domene najčešće se pojavljuju kod heterodimernih ABC prenositelja.<sup>7</sup>

Uz već predstavljeni „mehanizam alternirajućeg pristupa“, ABC eksporteri prenose tvari i pomoću „flip-flop“ mehanizma. Mehanizam je istraživao na flipazi MsbA iz *E. coli*. U prvom koraku bočno otvoreni prenositelj veže supstrat, lipid. Vezanjem lipida dolazi do konformacijske promijene koja stvara nukleotid-vezni dimer te dolazi do hidrolize ATP-a. U sljedećem koraku zbog nastalih konformacijskih promjena nastaje poravnati klaster naboja koji se nalazi na unutrašnjoj strani prenositelja. Poravnati klaster se vektorski orijentira u smjeru u kojem se lipid prenosi. Takvo mikrokruženje hidrofobnog supstrata nije energetski povoljno, stoga dolazi do „flipa“ lipida u energetski povoljniji položaj. U posljednjem koraku „flipanje“ lipida signalizira konformacijsku promjenu u kojoj se vezani lipid otpušta sa suprotne strane u lipidni dvosloj.

Stehiometrija prijenosa tvari u navedenim procesima nije jednostavna i ne može se generalizirati za cijelu superobitelj ABC prenositelja, ovisno o tome jesu li obje nukleotid-vezne domene hidrolitički aktivne ili ne. Homodimer ABC prenositelja uglavnom troše dvije molekule ATP-a po ciklusu prijenosa tvari. Učestalost pojave mutacije nukleotid-vezne domene je veća kod heterodimera, stoga u njihovom slučaju potrebno je eksperimentalno određivati stehiometriju prijenosa tvari.

## 2.4. Klinička uloga

U posljednjih nekoliko godina porastao je interes, a time i istraživanja ABC prenositelja jer je otkrivena poveznica između mnogih bolesti i mutacija gena koji kodiraju ABC prenositelje te samih malformacija ABC prenositelja. Mutacije alela koji kodiraju ABC prenositelje izazivaju teške, a po kad i smrtonosne bolesti. Bolesti su uglavnom nasljednog karaktera. U daljnjem tekstu pobliže će biti objašnjene tri bolesti (cistična fibroza, arterioskleroza i melanom ) te upalni proces i njihova povezanost s ABC prenositeljima.

### 2.4.1. Cistična fibroza

Cistična fibroza je oboljenje koje zahvaća dojenčad i djecu. Uzrokovana je mutacijom i nefunkcionalnošću kanala za prijenos kloridnih iona. Kanal za prijenos kloridnih iona nosi povijesnu oznaku CFRT (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), a sustavni naziv ovog kanala je ABCC7 jer pripada subobitelji C ABC prenositelja. CFRT/ABCC7 je jedini kanal u superobitelji ABC prenositelja, shodno tome, strukturno se razlikuje od ostatka superobitelji ABC prenositelja. Gen koji kodira kanal za prijenos kloridnih iona je očuvan u velikom broju vrsta. Tok aniona kroz navedeni kanal je potreban za normalan rad epitela dišnog sustava, probavnog sustava i gušterače. Bez toka aniona, usporava se tok vode u sluznicu pluća, zbog čega se stvara dehidrirana sluz u plućima u kojoj se mogu razviti smrtonosne bakterijske upale.

Strukturno je kanal identičan ostalim prenositeljima u ABC superobitelji uz dodatak posebne domene R, koja sudjeluje u regulaciji kanala. R domena je građena od približno 200 aminokiselina i vezana je istodobno na transmembransku domenu jedne polovice i nukleotid-veznu domenu druge polovice ABC prenositelja. Otvaranje kanala je strogo ovisno o R domeni koja inhibira tok iona kroz kanal ukoliko nije fosforilirana od PKA (protein kinaza A). Kao i svi ABC prenositelji, i ABCC7 prenositelj troši energiju u obliku ATP-a. R domena ne utječe na vezanje ATP-a.<sup>15</sup>

Mutacija CFRT gena stvara nefunkcionalni protein koji se odmah nakon translacije razgrađuje. Dolazi do delecije kodona za fenilalanin na poziciji 508 u nukleotid-veznoj domeni. Navedena mutacija odgovorna je za oko 90% svih cističnih fibroza u ljudskoj populaciji. Biofizička istraživanja, *in vitro* i *in vivo*, pokazala su da delecija F508 izaziva termodinamičku destabilizaciju nukleotid-vezne domene i igra ključnu ulogu u patogenosti cistične fibroze. U strukturi ABC prenositelja, nedostatak F508 indirektno narušava interakciju između nukleotid-vezne domene i transmembranske domene. To je moguće jer se F508 nalazi u regiji na nukleotid-veznoj domeni koja je odgovorna za većinu interakcija s citoplazmatskom omčom transmembranske domene. Dodatno, F508del mutacija izaziva i konformacijsku promjenu nukleotid-vezne domene u kojoj valin, na položaju 510, iz „djelomično zakopanog“ položaja u proteinu biva okrenut prema hidrofilnom mediju. Nadalje, konformacijska promjena mispozicionira glicin te se zbog toga narušavaju vodikove veze u okosnici proteina.<sup>16</sup>

Predloženo je liječenje u kojem bi se pojačala interakcija između transmembranske domene i nukleotid-vezne domene kod F508del-ABCC7. Provedena istraživanja pokaza su da niti jedna od supresorskih mutacija nukleotid-vezne domene nije vratila punu funkciju nukleotid-vezne domene kada je domena bila samostalna. Međutim, kad se nukleotid-vezna domena našla u kompleksu s transmembranskom domenom, uočeno je potpuno povlačenje strukturnog defekta. Jednako tako vraćena je puna funkcija nukleotid-veznoj domeni. Supresori mogu biti male molekule koje se čvrsto vežu na pravilno smotanu nukleotid-veznu domenu, čime značajno stabiliziraju njenu nativnu strukturu. Smatra se da bi mogli imati dostatan utjecaj da isprave patologiju uzrokovanu odsustvom fenilalanina na poziciji 508. S obzirom da ništa nije tako jednostavno, daljnja istraživanja su pokazala da je jednako tako potrebno stabilizirati i kontaktnu površinu između nukleotid-vezne domene i transmembranske domene.<sup>16</sup>

#### 2.4.2. Ateroskleroza

Ateroskleroza je bolest krvožilnog sustava u kojoj dolazi do zadebljanja i očvršćivanja stijenki krvnih žila. Zadebljane stjenke je plak, tj. nakupine lipida, kolesterola, kalcija i drugih tvari koje se nalaze u krvi. Točan uzrok ateroskleroze nije poznat, pretpostavlja se da bi uzrok mogle biti mutacije gena koje kodiraju ABCA1, ABCG5 i ABCG8 prenositelje (o čemu malo više u daljnjem tekstu). Prema trenutnom shvaćanju, ateroskleroza može biti inicirana kada dođe do oštećenja unutarne stijenke arterije pod utjecajem raznih faktora, npr. pušenje, visoki krvni tlak, visoke koncentracije lipida, kolesterola, šećera u krvi, itd. Ono što bolest čini opasnom je mogućnost pojave srčanih i moždanih udara zbog fragmentacije plakova i nastajanja krvnih ugrušaka koji mogu slobodno kolati organizmom.<sup>12</sup>

Transport lipida i kolesterola je esencijalan za normalan rad ljudskog organizma. Lipidi uneseni prehranom, ili biosintetizirani, pakiraju se u lipoproteinske čestice koje omogućavaju njihov transport u hidrofilnom mediju. Lipoproteinske čestice građene su od apolipoproteina (proteini koji vežu lipide u krvi) i lipida. U prometovanju lipida osim lipoproteinskih čestica sudjeluje i niz signalnih receptora i transportera. Mutacija bilo koje komponente u prometovanju lipida u organizmu može dovesti do dislipidemije (bolest metabolizma lipida).<sup>13</sup>



Proučavane su rijetke i nasljedne dislipidemije, Tangier-ova bolest i sitosterolemija, uzrokovane mutacijama u lokusima koji kodiraju ABC prenositelje te poveznica među tim mutacijama i aterosklerozom. Analizom navedenih bolesti dobiven je uvid u mehanizam fiziološkog procesa koji je nazvan „obrnuti transport kolesterola“, a koji je potreban kako bi ABCA1 i ABCG1 tim mehanizmom mogu prenositi lipide i potisnuti aterosklerozu.<sup>13</sup>

Fenotip Tangier-ove bolesti pokazuje nakupljanje kolesterola i estera kolesterola u stanicama. Posebno naglašeno nakupljane uočeno je kod endotelnih stanica. Kod oboljelih također je uočen potpuni nedostatak HDL-a (*high density lipoprotein*) u krvi. Mutacije koje dovode do oboljenja su recesivne. Nadalje, mutacije u alelima koji kodiraju ABCA1 prenositelj koreliraju sa Tangier fenotipom.<sup>13</sup>

ABCA1 prenositelj sudjeluje u biosintezi HDL-a i određuje njezinu brzinu. Obrnuta korelacija između koncentracije HDL-a i kardiovaskularnih bolesti sugerira da bi gubitak funkcije ABCA1 prenositelja povećao aterosklerozu, dok bi pojačana aktivnost ABCA1 prenositelj inhibirala aterosklerozu. U prilog ovoj pretpostavci ide povećanje vjerojatnosti kardiovaskularnog oboljenja kod Tangier-ove bolesti. Mutacija samo jednog alela kod heterozigota koji kodiraju ABCA1 prenositelj pokazala je trostruko povećanje rizika od kardiovaskularnog oboljenja, no međutim, zbog malog broja ljudi koji su sudjelovali u istraživanju nije sasvim jasno kako promjena aktivnosti ABCA1 prenositelja utječe na sintezu HDL u sveopćoj populaciji. Veća istraživanja nisu našla jasnu poveznicu.<sup>13</sup>

Studije na miševima gdje je *Abca1* lokus deletiran ili *over*-ekspimiran generalno podržavaju hipotezu da ABCA1 održava koncentraciju HDL-a u krvi te sekrecijom kolesterola iz stanice značajno sprječava pojavu ateroskleroze. Miševi su imali izraženiju aterosklerozu, u seriji istraživanja, kada su miševima presađivali *Acbca1*<sup>-/-</sup> koštanu srž. Navedeno upućuje na važnost sekrecijske aktivnosti ABCA1 prenositelja u održavanju koncentracije HDL-a i zaštite protiv ateroskleroze. Međutim, makrofag specifična delecija *Abca1* nije imala jak utjecaj na lezije.<sup>13</sup>

Sitosterolemija, kao i Tangier-ova bolest, je rijetki, autosomalni, recesivni, lipidni, poremećaj. Karakterizira je loš utrošak sterola koji su uneseni prehranom (uključujući biljni sterol sitosterol). Sindrom je povezan s razvojem ksintoma, hiperkolesterolemije i preranim koronarnim oboljenjem. Oboljeli od sitosterolemije apsorbiraju veći udio prehrambenih

kolesterola te izlučuju manje kolesterola u žuč, u usporedbi s neoboljelima. Sitosterolemiju izaziva mutacija jednog ili oba gena u regiji koji kodiraju ABC prenositelje ABCG5 i ABCG8.<sup>13</sup>

Rana istraživanja su pokazala da su pacijenti oboljeli od sitosterolemije skloniji ranoj i teškoj aterosklerozi. Fenotip sitosterolemije nije povezan s promjenom koncentracije kolesterola u lipoproteinskim česticama, zbog čega je predloženo da značajno povećanje koncentracije biljnih sterola u pacijentima predstavlja neovisan faktor koji uzrokuje aterosklerozu. PROCAM istraživanje je otkrilo da je povišenje koncentracije sitosterola i sitosterol/kolesterol omjera povezano s povećanom pojavnošću srčanih udara. Napravljena su i istraživanja čiji rezultati su u suprotnosti s prethodno iznesenim opažanjima. Njihov je zaključak da ne postoji povezanost između koncentracije sterola i ateroskleroze, također, dodaju da miševi kojima nedostaju ABCG5 i ABCG8 prenositelji ne pokazuju povećanu sklonost aterosklerozi. Iako pacijenti oboljeli od sitosterolemije pate od preuranjene ateroskleroze, gubitak funkcije ABCG5 i ABCG8 prenositelja nije jednoznačno povezan s aterosklerozom.<sup>13</sup>

Po mom mišljenju oprečni rezultati dobiveni kroz razna istraživanja se mogu objasniti kompleksnošću ateroskleroze. Evidentna je povezanost oboljenja i mutacija ABCA1, ABCG5 i ABCG8 prenositelja, ali iste mutacije nisu samodostatne za inicijaciju oboljenja. Možebitno da su mutacije dobra startna točka za razvoj oboljenja, ali je potreban okolišni čimbenik za inicijaciju bolesti, kao što je nedostatak tjelovježbe, pušenje, nepravilna prehrana, itd. Jednako tako, genske mutacije nužno ne gase u potpunosti transportnu aktivnost proteina, što je već viđeno kod asimetričnih NBD-a. U budućnosti je moguća genska terapija koja bi poticala ekspresiju specifičnih ABC prenositelja kako bi se ublažili simptomi ateroskleroze, ali najvjerojatnije neće dovesti do potpunog ozdravljenja.

### 2.4.3. Upale

Upala u organizmu ukazuje na ne-homeostaznu reakciju u vaskularnom tkivu na različite stimulanse kao što su: patogeni, ozljede, ksenobiotici, itd. Tijekom evolucije, upale su se razvile kao mehanizmi samoobrane i preživljavanja. Dobro su definirane različite faze upalne reakcije. Akutni period je inicijalna faza u kojoj najprije u pomoć dolaze prisutne imunološke stanice, potom stanica luči razne citokine. Zatim u upaljeno mjesto dolaze anti-upalni agensi koji

smiruju upalu. Unutar akutne faze stvara se edem pomoću imunoglobulina i fibrina, što se očituje kao naticanje upaljenog mjesta. Akutna reakcija može prijeći u kronično stanje ovisno o dinamici uklanjanja stimulansa, tj. upale. Kronična upala je štetna za tkivo, stoga je regulacija upalne reakcije od iznimne važnosti za obnavljanje tkiva i ponovnu uspostavu homeostaze.<sup>14</sup>

ABCA1 i ABCG1 prenositelji posjeduju anti-upalna svojstva, što je pokazano u nekoliko istraživanja. Jedno od istraživanja je vršeno na miševima kojima je nedostajao jedan ili oba gena koji kodiraju ABCA1 i ABCG1 prenositelje. U miševima je injektiran bakterijski lipopolisaharid koji pokreće upalni proces kod miševa. Praćeno je nekoliko upalnih parametara (MCP-1, TNF- $\alpha$  i IL-6). Kod miševa kojima je nedostajao gen ABCA1 prenositelj primijećene su mnogo veće vrijednosti praćenih parametara u odnosu na kontrolne miševima. Drugo, istraživanje na kulturi stanica u kojima su makrofagima nedostajali ABCG1 prenositelj ili oba ABCG1 i ABCA1 prenositelja izlučivali su značajno više citokina i kemokina. Stanice koje su imale pro-upalni fenotip *Abca1*<sup>-/-</sup>*Abcg1*<sup>-/-</sup> postale su osjetljivije na acetiliran ili oksidiran LDL u prisutnosti ACAT inhibitora te su spremnije kretale u proces apoptoze. Navedeni eksperimenti smanjili su koncentraciju slobodnog kolesterola u plazmi te je generalni konsenzus istraživanja da anti-upalna svojstva ABCA1 i ABCG1 prenositelja proizlaze iz njihove sposobnosti da kontroliraju koncentraciju slobodnog kolesterola u plazmi i njihovoj distribuciji u lipidnom raftu. ABCA1 prenositelj sudjeluje u signalnom putu i stvaranju kompleksa prilikom upalnog procesa.<sup>13</sup>

#### 2.4.4. Melanom

Melanom je agresivan tumor koji je odgovoran za 80% smrtnih slučajeva povezanih s karcinomom kože. Većini pacijenata se kirurški ukloni primarni tumor, no gotovo jedna petina pacijenata razvije metastaze. Metastazni melanom ima tendenciju brzog širenja te je otporan na kemoterapiju. Ciljana terapija pokazala je ograničen uspjeh kod malog broja pacijenata, te dodatno, pacijenti brzo razvijaju otpornost na primljeni lijek. Praćenje metastaza u krvi je trenutno ograničeno i provodi se pomoću specifičnih markera. Za pacijente oboljele od karcinoma od iznimne je važnosti rano otkrivanje metastaza, stoga se radi na otkriću novog

markera koji će se specifičnije pojavljivati u ranim fazama metastaziranja. Među novim markerima nalazi se i ABC prenositelj iz subobitelji B, ABCB5.

ABCB5 prenositelj je pojačano ekspresiran kod tumor-inicijacijskih stanica. Učestalost prenositelja je mala na stanici. Značajno je da se ABCB5 prenositelj ne pojavljuje samostalno već uvijek u kombinaciji sa ostalim markerima. ABCB5 prenositelj ima potencijala postati standardnim markerom za otkrivanje ranog metastaznog melanoma. Nedostatak prenositelja je njegova mala učestalost na površini stanice.

## 2.5. Zaključak

ABC prenositelji su tek nedavno otkrivena superobitelj proteina. Struktura ABC prenositelja točno je određena na svega nekoliko prenositelja iz modelnih organizama, posebice iz *E. coli*. Zbog svoje brojnosti i evolucijske starosti, raznolikost ABC prenositelja je iznimna. Vjerujem da je to možda najraznolikija skupina proteina u živome svijetu. Za sada postoji konsenzus među istraživačima o osnovnoj strukturi svih ABC prenositelja, ali postoje neke razlike među subobiteljima, pa čak i pojedinim prenositeljima unutar same subobitelji. Omanje razlike u strukturi mogu imati značajne utjecaje na mehanizam prijenosa tvari. Područje ABC prenositelja je tek u začetku te su u tijeku intenzivna i velika istraživanja koja pokušavaju otkriti koji su supstrati prenositelja, mehanizam prijenosa i općenita uloga ABC prenositelja u životu stanice. Zbog svoje sveprisutnosti odgovorni su za vrlo dugačak popis bolesti. Istraživači se nadaju da potpunim uvidom u svijet ABC prenositelja mogu stvoriti terapijske pripravke za liječenje oboljenja nastalih uslijed mutacija i malformacija ABC prenositelja.

### § 3. Literaturna vrela

1. D. L Nelson i M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2013, str. 357-370; 386-409; 413-414.
2. S. Wilkens, *F1000Prime Rep* **7** (2015) 7-14
3. J. ter Beek, A. Guskov, i D. J. Slotboom, *J. Gen. Physiol.* **143** (2014) 419-435
4. K. P Locher, *Philos. Trans. R. Soc., B* **364** (2009) 239-245
5. J. Chen, *Curr Opin Struct Biol.* **23** (2013) 492-498
6. H. Bao i F. Duong, *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 3439-3448
7. E. Procko, M. L. O'Mara, W. F. Bennett, D. P. Tieleman, R. Gaudet, *FASEB J.* **23** (2009) 1287-1302
8. A. Ward, C. L. Reyes, J. Yu, C. B. Roth i G. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (2007) 19005-19010
9. M. Dean, Y. Hamon i G. Chimini, *J. Lipid Res.* **42** (2001) 1007-1017
10. E. J. Tarling, T. Q. de Aguiar Vallim i P. A. Edwards, *Trends Endocrinol. Metab.* **24** (2013) 342-350
11. G. Chang, C. B. Roth, *Science* **293** (2001) 1793-1800
12. <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/atherosclerosis>  
(preuzeto 17. srpnja 2016)
13. M. L. Fitzgerald, Z. Mujawar i N. Tamehiro, *Atherosclerosis* **211** (2010) 361-370
14. C. Kizil, N. Kyritsis i M. Brand, *EMBO Rep.* **16** (2015) 416-426
15. D. C. Gadsby, P. Vergani i L. Csanády, *Nature* **440** (2006) 477-483.
16. J. F. Hunt, C. Wang i R. C. Ford, *Cold Spring Harb Perspect Med.* **3** (2013) a009514.