

ZABURZENIA ASYMETRYCZNEGO ROZMIESZCZENIA FOSFATYDYLOSERYNY W BŁONIE KOMÓRKOWEJ – NAJNOWSZE TEORIE

DISTURBANCES OF THE ASYMMETRY OF PHOSPHATIDYL SERINE
IN THE CELL MEMBRANE – THE LATEST DATA

Agnieszka MARCZAK, Zofia JÓŹWIAK

Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Asymetryczne rozmieszczenie lipidów błonowych ma ogromne znaczenie dla utrzymania prawidłowej homeostazy komórek, a tym samym i organizmu. Pomimo iż wiele prac ukazało się na temat mechanizmów prowadzących do zachowania asymetrycznego charakteru rozmieszczenia lipidów błonowych, wciąż pojawiają się nowe doniesienia wyjaśniające to ciekawe zjawisko. Szczególnie interesujące wydają się badania dotyczące przemieszczania fosfatydyloseryny (PS) w apoptozie. Niniejszy artykuł przedstawia najnowsze teorie dotyczące przemieszczania się fosfatydyloseryny na powierzchnię komórek.

Słowa kluczowe: fosfatydyloseryna, asymetria, apoptoza.

Summary: The maintenance of transbilayer lipid asymmetry is essential for normal cell membrane function and homeostasis of organisms. Even though many articles appeared about loss of transmembrane phospholipid asymmetry, constantly come out new data about this interesting occurrence. The most noteworthy are studies about phosphatidylserine (PS) externalization in apoptosis. This article presents the latest data about the redistribution of PS on the surface of the cells.

Key words: phosphatidylserine (PS), asymmetry, apoptosis.

1. FIZJOLOGICZNE KONSEKWENCJE ASYMETRYCZNEGO ROZMIESZCZENIA FOSFOLIPIDÓW W BŁONIE KOMÓRKOWEJ

Powszechnie wiadomo, że dzięki trzem klasom transporterów wewnątrz błonowych (flipazy, flopazy i skramblazy) fosfolipidy są utrzymywane w zewnętrznej bądź wewnętrznej monowarstwie dwuwarstwy lipidowej. Procentowa zawartość fosfolipidów w poszczególnych monowarstwach zależy od rodzaju błony i funkcji danej komórki.

Do komórek, w których asymetria błony komórkowej najsilniej jest zaznaczona, należą między innymi erytrocyty, w których 80% sfingomieliny (SM) i 75% fosfatydylocholino (PC) jest zlokalizowane w zewnętrznej, a 75% fosfatydyloetanolaminy (PE) w wewnętrznej monowarstwie. Fosfatydyloseryna (PS) natomiast znajdowana jest tylko i wyłącznie w monowarstwie wewnętrznej. Badania z użyciem fosfolipaz oraz przeciwciał monoklonalnych pozwoliły także ocenić rozmieszczenie mniej licznych fosfolipidów. Stwierdzono iż kwas fosfatydowy (PA), fosfatydyloinozytol (PI) oraz 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu (PIP2), podobnie jak PS w 80% znajdują się w wewnętrznej, a w 20% w zewnętrznej monowarstwie błony [4].

Jak ważne dla komórki jest utrzymanie asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów, świadczyć mogą nieprawidłowości w funkcjonowaniu komórek, w których stwierdzono zaburzenia w asymetrycznym rozmieszczeniu lipidów błonowych. Utrata asymetrycznego rozmieszczenia lipidów w błonie prowadzi do zmian we właściwościach fizycznych błony, które z kolei znajdują swe odzwierciedlenie w oddziaływaniach komórka - komórka i błona - białka wewnątrzkomórkowe [9,48]. W wyniku przypadkowych zmian położenia lipidów zaburzeniom może ulegać między innymi aktywność enzymatycznych białek cytoplazmatycznych. Przykładem takiego białka jest jeden z najlepiej scharakteryzowanych enzymów zależnych od fosfolipidów – białkowa kinaza C. Wiąże się ona z cytoplazmatyczną powierzchnią błony komórkowej. Enzym ten wymaga do pełnej aktywacji dwóch kofaktorów lipidowych: diacyloglicerolu i fosfatydyloseryny [37]. Utrata asymetrii lipidowej powoduje obniżenie stężenia tych lipidów w monowarstwie wewnętrznej i redukuje ich interakcje z białkową kinazą C i innymi białkami, które wiążą się poprzez PS z błoną. Ponieważ wiele z tych białek uczestniczy w przekazywaniu sygnałów w komórce, można powiedzieć, że zmiany w rozkładzie lipidów mogą przyczynić się do zaburzeń w przekazywaniu informacji.

O ważności asymetrycznego ułożenia fosfolipidów może świadczyć również fakt, że zaburzenia asymetrii lipidów błonowych obserwowane są między innymi w takich schorzeniach, jak: anemia sierpowata, cukrzyca [9] czy syndrom Scotta [47]. Ponadto komórki krwi, na których powierzchni jest eksponowana PS, łatwiej przylegają do endotelium naczyń włosowatych, co przyspiesza proces krzepnięcia krwi i może powodować nieoczekiwane zakrzepy.

Przemieszczanie się PS jest też jednym ze zjawisk obserwowanych w procesie programowanej śmierci komórki, czyli apoptozie, zarówno w różnych komórkach jądrzastych jak i bezjądrzastych erytrocytach człowieka [5,13,31,32,45]. Dzięki eksternalizacji PS, komórki apoptotyczne są rozpoznawalne przez makrofagi mające receptory dla PS i są przez te makrofagi fagocytowane [6,16].

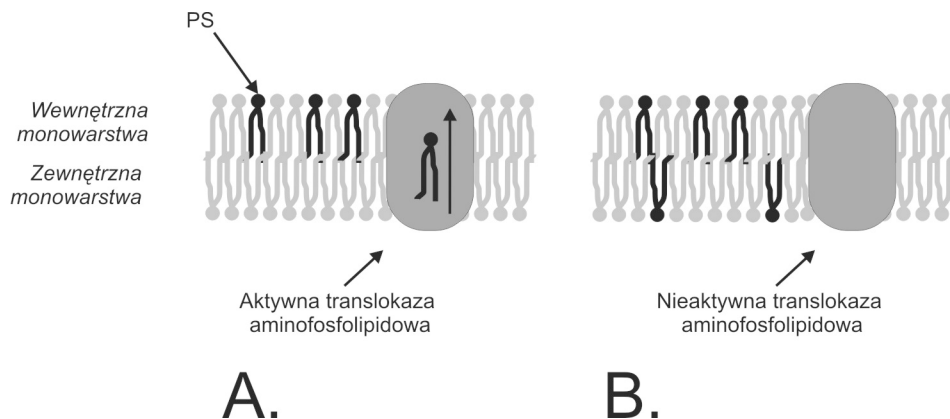
W badaniach związanych z przemieszczaniem się PS dużo uwagi poświęca się roli reaktywnych form tlenu. Istnieją doniesienia wskazujące, że przyczyną przemieszczania się PS może być proces utleniania tego fosfolipidu [23,43]. Proces utleniania PS może zachodzić zarówno pod wpływem reaktywnych form tlenu (RFT) tworzonych w wyniku przemian związków egzogennych, jak i w następstwie procesów zachodzących wewnątrz komórki, między innymi w procesie apoptozy.

2. ENZYMY UCZESTNICZĄCE W REGULACJI POŁOŻENIA PS

Fosfolipidy mogą spontanicznie przemieszczać się między wewnętrzną i zewnętrzną monowarstwą. Obecne w błonie specjalne enzymy dbają o to, aby takie fosfolipidy, które zmieniły położenie wracały na właściwą część błony [20]. Najważniejszym enzymem, który reguluje położenie PS w błonie komórkowej, jest translokaza aminofosfolipidowa (APT II), białko o masie 116 kDa (ryc. 1). Zidentyfikowano 4 izoformy APT II specyficznej dla PS [12]. Translokaza aminofosfolipidowa jest białkiem wrażliwym na stres oksydacyjny oraz na alkilowanie jej grup SH [15,43]. Utrata zdolności przemieszczania PS do wewnętrznej monowarstwy może być przyczyną obecności tego fosfolipidu w monowarstwie zewnętrznej. Początkowo proponowano dwa wyjaśnienia:

1 – dochodzi do modyfikacji grup SH translokazy wrażliwych na czynniki utleniające i w ten sposób hamowana jest aktywność tego enzymu [15],

2 – APT pozostaje aktywna, ale nie rozpoznaje utlenionej fosfatydyloseryny (PSox) jako substratu i dochodzi do nagromadzenia PS na powierzchni błony [43]. Jednak eksperymenty Tyuriny i wsp. [43] wykazały, że zarówno PS, jak i PSox są rozpoznawane przez translokazę, co wyklucza tę drugą teorię.

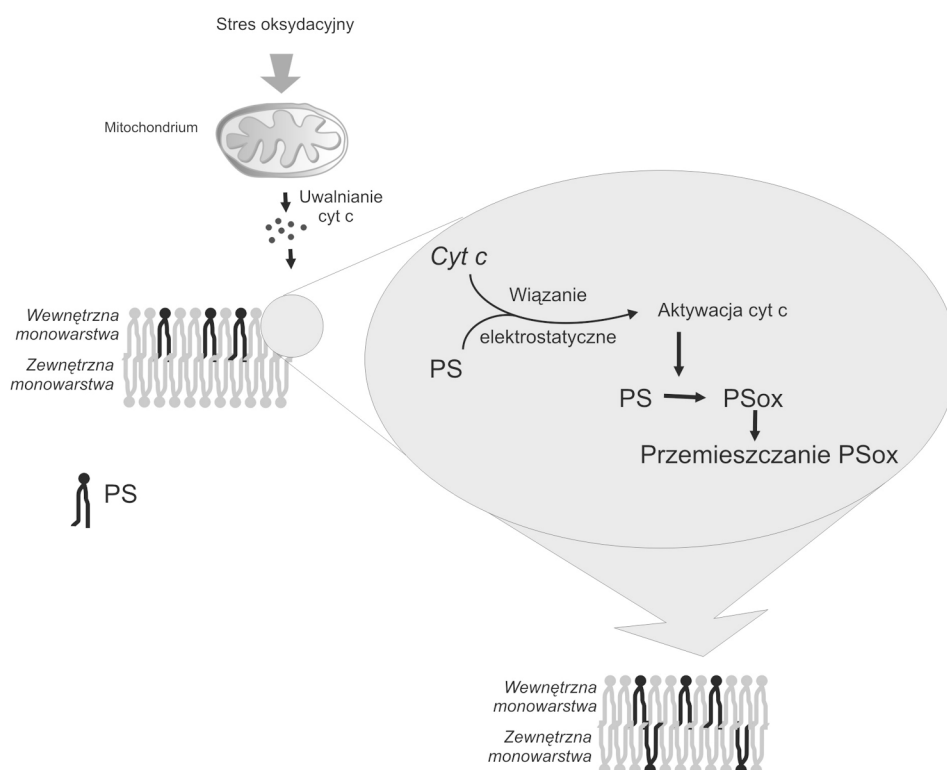


RYCINA 1. Translokaza aminofosfolipidowa jest najważniejszym enzymem regulującym położenie PS w błonie komórkowej (A). Utrata zdolności przemieszczania PS przez translokazę może być przyczyną obecności tego fosfolipidu w monowarstwie zewnętrznej (B) (na podstawie [44] zmodyfikowany)

W apoptozie w regulowaniu położenia PS w błonie komórkowej uczestniczy rodzina białek ABC [7]. Wykazano, że eksternalizację PS powoduje białko ABCA1. Inne badania wskazują jednak, że udział tego białka w eksponowaniu PS na powierzchni komórki jest niewielki [40]. Udział w transporcie PS mają również aktywowane przez jony wapnia skramblazy, transportujące lipidy biernie w obie strony [10].

3. ROLA CYTOCHROMU C

Według grupy Kagana [23, 24] w procesie utleniania i następnie eksternalizacji PS najprawdopodobniej uczestniczy cytochrom c (ryc. 2). Cytochrom c jest to hemoproteina pełniąca funkcję transportera elektronów pomiędzy kompleksami cytochromów bc1 a oksydazą cytochromową w mitochondriach. Uczestniczy więc w produkcji energii w komórce. Potwierdzony jest także udział cytochromu c w procesie apoptozy, podczas której wydostaje się on z mitochondriów i tworzy w cytoplazmie wraz z czynnikiem Apaf-1 apoptosom. Ostatnio odkryto jego dodatkową funkcję w apoptozie. Otóż stwierdzono, że uczestniczy on w utlenianiu dwóch fosfolipidów: kardiolipiny (CL) obecnej w mitochondriach [27] i PS w błonie komórkowej [23]. Cytochrom c jest białkiem ($pI=10,3$), które ma w pH fizjologicznym osiem dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych. Może więc tworzyć wiązania elektrostatyczne z anionowymi fosfolipidami błonowymi, takimi jak: PS, CL i PI, które z kolei obdarzone są ładunkiem ujemnym [35,41]. Poprzez elektrostatyczne i hydrofobowe interakcje z ujemnie naładowaną kardiolipiną obecną w mitochondriach cytochrom c uzyskuje aktywność pseudoperoxydazy i katalizuje utlenianie CL. Ta zdolność cytochromu c do uzyskiwania aktywności enzymatycznej jest możliwa dzięki obecności w cząsteczce cytochromu



RYCINA 2. Udział cytochromu c w przemieszczaniu PS do zewnętrznej monowarstwy błony komórkowej (na podstawie [44] zmodyfikowany)

hemu, którego żelazo może ulegać odwracalnemu utlenieniu. W normalnych warunkach kardiolipina nie występuje na zewnątrz mitochondriów, ale aktywacja cytochromu c do peroksydazy jest obserwowana również w innych obszarach cytozolowych. Cytochrom c uwalniany podczas apoptozy z mitochondriów może tworzyć także wiązania elektrostatyczne z PS obecną w wewnętrznej monowarstwie dwuwarstwy lipidowej. Silna interakcja między cytochromem c i PS została potwierdzona zarówno w modelowych systemach, jak i naturalnych błonach komórkowych [38,41]. Pomimo iż powinowactwo cytochromu c do PS jest niższe niż do CL, cytochrom może również tworzyć stabilne kompleksy z PS oraz pełnić rolę katalizatora procesu utleniania fosfolipidu w sposób analogiczny do reakcji utleniania kardiolipiny w mitochondriach. W procesie utleniania fosfolipidów przez cytochrom c istotną rolę pełnią również reaktywne formy tlenu (O_2^- i H_2O_2) generowane podczas apoptozy [23]. Dowodem na to są badania Matsury i wsp. [32], w których okazało się, że melfalan (czynniki alkilujący), który indukuje eksternalizację PS_{ox} w komórkach HL-60, nie powoduje tego efektu w komórkach HP100 wykazujących nadekspresję katalazy, enzymu z grupy oksydoreduktaz, katalizującej proces rozkładu nadtlenu wodoru (H_2O_2) [32]. Potwierdzeniem natomiast hipotezy o roli cytochromu c w procesie utleniania PS mogą być badania z wykorzystaniem komórek pozbawionych cytochromu c (c-/-). W komórkach nie zawierających tego białka nie dochodziło do utleniania PS pod wpływem H_2O_2 czy tBuOOH [22]. Włączenie egzogenego cytochromu c do tych komórek powodowało odbudowanie wrażliwości PS na utlenianie i zdolności fosfolipidu do przemieszczania na powierzchnię. Ponadto eksperymenty Matsury i wsp. [34] wykazały, że obserwowany z upływem czasu wzrost ilości PS na powierzchni komórek skorelowany był ze wzrostem ilości cytochromu c pojawiającego się w cytozolu.

Interesujące jest, że kaskada reakcji apoptotycznych wywołana przez różne czynniki proapoptotyczne powoduje selektywne utlenianie PS, podczas gdy liczniej reprezentowane w błonie fosfolipidy, takie jak PC czy PE, są w znacznie mniejszym stopniu utleniane lub nawet obserwuje się brak ich utlenienia [23, 25, 33, 44].

4. BEZPOŚREDNIE DOWODY NA OBECNOŚĆ PS_{ox} NA POWIERZCHNI KOMÓREK

Pomimo iż w wielu pracach pojawiały się informacje, że przemieszczanie się PS do zewnętrznej monowarstwy poprzedzone jest jej utlenieniem, to dopiero badania Matsury i wsp. [34] oraz Dimanche-Boitrel i wsp. [11] dostarczyły bezpośredniego dowodu na powstawanie PS_{ox} w komórkach. Wykorzystanie techniki HPTLC pozwoliło nie tylko na potwierdzenie, iż dochodzi do utleniania PS, ale także na ilościowe oznaczenie PS_{ox} na powierzchni komórek. Największy stopień utlenienia PS obserwowano w błonie plazmatycznej w porównaniu z błonami wewnętrznymi organelli komórkowych, takich jak: mitochondria, jądro, lizosomy czy mikrosomy [24]. Utlenianie PS poprzedza lub zbiega się z licznymi procesami apoptotycznymi, m.in. z aktywacją kaspazy 3. Interesujące jest, że w komórkach kontrolnych Jurkat PS_{ox} występuje w niewielkich

ilościach wewnątrz komórki, natomiast nie stwierdza się formy utlenionej na powierzchni błony plazmatycznej. Dopiero po dodaniu przeciwciał antyFas indukujących apoptozę w tych komórkach obserwowano wzrost PS α wewnątrz, jak i pojawienie się fosfolipidu na powierzchni komórki. Badania z wykorzystaniem sondy DCFH-DA wykazały, że Fas indukuje tworzenie RFT, a w następstwie również ubytek zredukowanego glutationu (GSH) [34].

Powyższe dane sugerują, że przemieszczanie się PS z wewnętrznej do zewnętrznej monowarstwy błony rozpoczyna się dopiero po osiągnięciu przez PS w warunkach stresu oksydacyjnego poziomu progowego [11].

5. ROLA TRATW LIPIDOWYCH

Badania dotyczące roli tratw lipidowych w eksternalizacji PS wykazały różnice między komórkami żywymi a apoptotycznymi. Badania z zastosowaniem aneksyny V pozwoliły stwierdzić, że w żywych komórkach PS była obecna w obrębie tratw lipidowych. Natomiast w komórkach apoptotycznych PS pojawiała się poza tratwami [21]. Jednak pomimo tego iż w komórkach tych PS nie była obserwowana wewnątrz tratw, to mikrodomeny okazały się jednak niezbędne do utrzymania fosfolipidu na powierzchni błony. W eksperymentach, w których za pomocą MCD (ang. *methyl- β -cyclodextrin*) usuwano cholesterol z błony komórkowej, notowano drastyczną redukcję liczby komórek apoptotycznych zawierających PS w zewnętrznych regionach błony. Obecność MCD nie wpływała natomiast na inne markery apoptozy (stopień kondensacji chromatyny nie ulegał zmianie).

Pozostaje więc pytanie, czy przemieszczanie się PS do zewnętrznej monowarstwy błony wymaga obecności tratw lipidowych. Ishii i wsp. [21] wykazali, że tratwy są strukturalnie modyfikowane podczas apoptozy. Autorzy sugerują, że chociaż w komórkach apoptotycznych nie zmienia się zawartość cholesterolu w tratwach lipidowych, to może zmieniać się jego rozmieszczenie w mikrodomenach. Te sugestie oparto na wynikach badań, w których dodana pochodna perfringolizyny (BCQ), selektywnie łącząca się z cholesterolem występującym tylko w regionach błony bogatych w cholesterol, nie rozpoznawała w komórkach apoptotycznych tratw lipidowych. Podczas apoptozy obserwowano także zmiany zawartości PS i PE. Powyższe zmiany strukturalne tratw lipidowych wskazują nie tylko na występowanie różnic w procesie eksternalizacji PS w żywych i apoptotycznych komórkach, ale także na udział tratw w selektywnym usuwaniu нефunkcjonalnych komórek w drodze fagocytozy [21].

6. UDZIAŁ KASPAZ W EKSTERNALIZACJI PS

Szeroko dyskutowany jest udział kaspaz w eksternalizacji PS. Są to proteiny cisteinowe (ang. *caspase-cysteine-dependent aspartate specific protease*), które mają kluczowe znaczenie dla przebiegu apoptozy [1, 28]. Jednym z substratów dla kaspazy 3 jest białkowa kinaza Cd, która fosforyluje skramblazę 1 [19]. W ten sposób kaspaza 3 może wpływać na przemieszczanie PS. Potwierdzeniem udziału kaspaz w

translokacji są badania z inhibitorami kaspaz: Cbz – Val – Ala – ASP (OMe) – fluorometyloketonu oraz Cbz – Leu – Glu – Thr – ASP (OMe) – fluorometyloketonu. Ich obecność hamowała ekspozycję PS w liniach komórkowych ulegających apoptozie. To sugerowałoby, iż proces przemieszczania PS jest zależny od kaspaz [17]. Jednak eksperymenty wielu innych grup wskazują raczej, że jest to proces kaspazozależny. W limfocytach T, w których apoptoza indukowana była za pomocą staurosporyny czy etopozyny, żaden z inhibitorów kaspaz nie spowodował zahamowania przemieszczania PS [17].

Ciekawych danych dostarczają badania prowadzone na dojrzałych erytrocytach człowieka. Są to komórki pozbawione jądra komórkowego i innych organelli komórkowych, więc nie wszystkie mechanizmy obserwowane w innych komórkach mają miejsce w erytrocytach. Badania Mandala i wsp. [30] wykazały po raz pierwszy w erytrocytach człowieka, że w proces przemieszczania fosfatydyloseryny pod wpływem stresu oksydacyjnego zaangażowana jest kaspaza 3. Prokaspaza 3 w komórkach, poddanych działaniu wodoronadtlenku tertbutylu (tBHT), była aktywowana do kaspazy 3. Występowanie aktywnej formy kaspazy 3 w erytrocytach potwierdzono na podstawie rozdziałów elektroforetycznych oraz w obecności Ac-DEVD-pNA, specyficznego substratu kaspazy 3. W przypadku, gdy w roztworze obecny był inhibitor kaspazy 3, fagocytoza erytrocytów zachodziła z mniejszą intensywnością. W komórkach poddanych działaniu tBHT obserwowano także zmniejszenie aktywności translokaz aminofosfolipidów (flipaz) i przemieszczanie PS oraz zwiększoną fagocytozę erytrocytów. Według Mandala i wsp. [30] regulacja procesu przemieszczania PS przez kaspazę 3 może odbywać się albo poprzez bezpośrednie uszkodzenia translokazy fosfolipidów, albo, co jest bardziej prawdopodobne, poprzez pośredni wpływ na regulatory flipaz. Chociaż rola kaspazy 3 w tym procesie jest znacząca, to jednak nie tylko proteaza odpowiada za przemieszczanie fosfatydyloseryny do powierzchniowej monowarstwy błony. Wykazano bowiem, że dodanie inhibitorów kaspazy 3 nie powodowało całkowitego zahamowania procesu przemieszczania PS [30]. Również Weil i wsp. [46] zaobserwowali apoptozę w erytrocytach kurcząt wywołaną działaniem staurosporyny i cykloheksimidu zarówno w obecności, jak i przy braku osocza. Obserwowano zmianę kształtu komórki, przemieszczanie PS na powierzchnię komórki, kondensację i fragmentację chromatyny. W przeciwieństwie natomiast do komórek żaby (*Rana*) nie notowano aktywacji kaspaz. Proces apoptozy nie był tu hamowany przez inhibitor kaspaz.

7. CZYNNIKI ZAPOBIEGAJĄCE APOPTOTYCZNEJ ŚMIERCI KOMÓREK

Wolne rodniki generowane podczas apoptozy powodują utlenianie PS, a w konsekwencji również zaburzenia w asymetrii fosfolipidów. Zatem wzmożenie ochrony antyoksydacyjnej powinno zapobiec temu niekorzystnemu zjawisku. Rzeczywiście istnieją liczne doniesienia, które sugerują, że podwyższony poziom GSH [3] oraz nadekspresja enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: Mn-dysmutaza nadtlenkowa, katalaza i

tioredoksyny [2, 8, 14], powodują, że komórki stają się odporne na czynniki pro-apoptotyczne generowane podczas apoptozy zachodzącej z udziałem mitochondriów. Podobnie antyoksydanty niskocząsteczkowe, zarówno te naturalne (witamina E) jak i związki farmakologiczne, które hamują utlenianie PS, mogą przeciwdziałać procesowi eksternalizacji PS, a tym samym zapobiegać wychwytywaniu komórek przez makrofagi. W komórkach Jurkat witamina E efektywnie hamowała zależną od cytochromu c zmianę asymetrii PS podczas apoptozy indukowanej przez aktynomycynę D [18].

Ciekawych danych dostarczyły również badania z wykorzystaniem leku przeciwnowotworowego – etopozytu [42]. Jest to selektywnie działający antyoksydant, który chroni lipidy przed utlenieniem, ale nie hamuje utleniania związków tiolowych z powodu wysokiej reaktywności rodników fenoksylowych etopozytu z grupami SH [26]. Może on więc pełnić dwojaką funkcję: potęgować apoptozę albo zapobiegać utlenianiu PS, a tym samym przeciwdziałać translokacji PS na powierzchnię komórek i zachodzeniu zjawiska fagocytozy.

W specyficznych warunkach chronić komórki przed apoptozą może także endogenna PS. Rolę ochronną PS stwierdzono w procesie apoptozy indukowanej przez promieniowanie UV w komórkach CHO oraz w komórkach Neuro-2a preinkubowanych z kwasem heksadekozanowym. Wzbogacenie medium w wielonienasycony kwas tłuszczowy pobudzało komórki do zwiększonej produkcji PS oraz powodowało zwiększoną translokację kinazy Raf-1 do błon. Ze względu na to, iż Raf-1 współuczestniczy w regulacji apoptotycznych procesów, powyższe dane sugerują, że zarówno wzrost wewnątrzkomórkowej zawartości PS, jak i zmiana lokalizacji kinazy mogą chronić komórki przed apoptozą [29, 36, 39].

LITERATURA

- [1] ABRAHAM MC, SHAHAM S. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* 2004; **14**: 184–193.
- [2] ANDOH T, CHOCK PB, CHIUEH CC. The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 9655–9660.
- [3] ARMSTRONG JS, JONES DP. Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. *FASEB J* 2002; **16**: 1263–1265.
- [4] BALASUBRAMANIAN K, SCHROIT AJ. Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death. *Annu Rev Physiol* 2003; **65**: 701–734.
- [5] BARROSO G, TAYLOR S, MORSHEDI M, MAZUR F, GAVINO F, OEHNINGER S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 2006; **85**: 149–154.
- [6] BORISENKO GG, MATSURA T, LIU S-X, TYURIN VA, JIANFEI J, SERINKAN FB, KAGAN VE. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells – existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys* 2003; **413**: 41–52.
- [7] BORST P, ELFERINK RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002; **71**: 537–592.
- [8] CHEN Y, CAI J, MURPHY TJ, JONES DP. Overexpressed human mitochondrial thioredoxin confers resistance to oxidant-induced apoptosis in human osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 33242–33248.
- [9] DALEKE DL, LYLES JV. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1486**: 108–127.

- [10] DALEKE DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 2003; **44**: 233–242.
- [11] DIMANCHE-BOITREL MT, MEURETTE O, REBILLARD A, LACOUR S. Role of early plasma membrane events in chemotherapy-induced cell death. *Drug Resist Updat* 2005; **8**: 5–14.
- [12] DING J, WU BP, MA Y, LI X, SLAUGHTER C, GONG L. Identification and functional expression of four isoforms of ATPase II the putative aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 23378–23386.
- [13] EISELE K, LANG PA, KEMPE DS, KLARL BA, NIEMÖLLER O, WIEDER T, HUBER SM, DURANTON C, LANG F. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; **210**: 116–122.
- [14] EPPERLY MW, GRETTON JE, SIKORA CA, JEFFERSON M, BERNARDING M, NIE S, GREENBERG JS. Mitochondrial localization of superoxide dismutase is required for decreasing radiation-induced cellular damage. *Radiat Res* 2003; **160**: 568–578.
- [15] FABISIAK JP, TYURIN VA, TYURINA YY, SEDLOV A, LAZO JS, KAGAN VE. Nitric oxide dissociates lipid oxidation from apoptosis and phosphatidylserine externalization during oxidative stress. *Biochemistry* 2000; **39**: 127–128.
- [16] FADOK VA, BRATTON DL, FRASCH SC, WARNER ML, HENSON PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 551–562.
- [17] FERRANO-PEYRET C, QUEMENEUR L, FLACHER M, REVILLARD JP, GENESTIER L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol* 2002; **169**: 4805–4810.
- [18] FORSBERG AJ, KAGAN VE, SCHROIT AJ. Thiol oxidation enforces phosphatidylserine externalization in apoptosis-sensitive and -resistant cells through a deltaprim/cytochrome C release-dependent mechanism. *Antioxid Redox Signal* 2004; **6**: 2003–2008.
- [19] FRASCH SC, HENSON PM, KAILEY JM, RICHTER DA, JANES MS, FADOK VA, BRATTON DL. Regulation of phospholipids scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase C δ . *J Biol Chem* 2000; **275**: 23–65.
- [20] HOLTHUIS JC, LEVINE TP. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 209–220.
- [21] ISHII H, MORI T, SHIRATSUCHI A, NAKAI Y, SHIMADA Y, OHNO-IWASHITA Y, NAKANISHI Y. Distinct localization of lipid rafts and externalized phosphatidylserine at the surface of apoptotic cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; **327**: 94–99.
- [22] JIANG J, SERINKAN BF, TYURINA YY, BORISENKO GG, MI Z, ROBBINS PD, SCHROIT AJ, KAGAN VE. Peroxidation and externalization of phosphatidylserine associated with release of cytochrome c from mitochondria. *Free Radical Biol Med* 2003; **35**: 814–825.
- [23] KAGAN VE, BORISENKO GG, SERINKAN BF, TAURINA YY, TYURIN VA, JIANG J, LIU S, SHVEDOVA AA, FABISIAK JP, UTHAINSANG W, FADEEL B. Appetizing rancidity of apoptotic cells for macrophages: oxidation externalization and recognition of phosphatidylserine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; **285**: L1–L17.
- [24] KAGAN VE, BORISENKO GG, TYURINA YY, TYURIN VA, JIANG J, POTAPOVICH AL, KINI V, AMOSCATO AA, FUJII Y. Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radical Biol Med* 2004; **15**: 1963–1985.
- [25] KAGAN VE, FABISIAK JP, SHVEDOVA AA, TYURINA YY, TYURIN VA, SCHOR NF, KAWAI K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett* 2000; **477**: 1–7.
- [26] KAGAN VE, KUZMENKO AI, TYURINA YY, SHVEDOVA AA, MATSURA T, YALOWICH JC. Pro-oxidant and antioxidant mechanisms of etoposide in HL-60 cells: role of myeloperoxidase. *Cancer Res* 2001; **61**: 7777–7784.
- [27] KAGAN VE, TYURINA VA, JIANG J, TYURINA YY, RITOV VB, AMOSCATO AA, OSIPOV AN, BELIKOVA NA, KAPRALOV AA, KINI V, VLASOVA II, ZHAO Q, ZOU M, DIP, SVISTUNENKO DA, KURNIKOV IV, BORISENKO GG. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* 2005; **1**: 223–232.
- [28] KILIAŃSKA ZM, MIŚKIEWICZ A. Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 129–152.

- [29] KIM HY, AKBAR M, LAU A, EDSALL L. Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3) Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. *J Biol Chem* 2000; **275**: 35215–35223.
- [30] MANDAL D, MOITRA PK, SAHA S, BASU J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett* 2002; **513**: 184–188.
- [31] MARCZAK A. Apoptoza erytrocytów człowieka. *Post Biol Kom* 2005; **32**: 359–373.
- [32] MATSURA T, KAI M, JIANG J, BABU H, KINI V, KUSUMOTO C, YAMADA K, KAGAN VE. Endogenously generated hydrogen peroxide is required for execution of melphalan-induced apoptosis as well as oxidation and externalization of phosphatidylserine. *Chem Res Toxicol* 2004; **17**: 685–696.
- [33] MATSURA T, SERINKAN BF, JIANG J, KAGAN VE. Phosphatidylserine peroxidation/externalization during staurosporine-induced apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Lett* 2002; **31**: 25–30.
- [34] MATSURA T, TOGAWA A, KAI M, NISHIDA T, NAKADA J, ISHIBE Y, KOJO S, YAMAMOTO Y, YAMADA K. The presence of oxidized phosphatidylserine on Fas-mediated apoptotic cell surface. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1736**: 181–188.
- [35] NANTES IL, ZUCCHI MR, NASCIMENTO OR, FALJONI-ALARIO A. Effect of heme iron valence state on the conformation of cytochrome c and its association with membrane interfaces A CD and EPR investigation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 153–158.
- [36] NESHAAT M, RAITANO A, WANG H, REED J, SAWYERS C. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1179–1186.
- [37] NEWTON AC, JOHNSON JE. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1376**: 155–172.
- [38] PINHEIRO TJ, FLOVE GA, WATTS A, RÖDER H. Structural and kinetic description of cytochrome c unfolding induced by the interaction with lipid vesicles. *Biochemistry* 1997; **36**: 13122–13132.
- [39] SALOMONI P, WASIK M, RIEDEL R, REISS K, CHOI J, SKORSKI T, CALABRETTA B. Expression of constitutively active Raf-1 in the mitochondria restores antiapoptotic and leukemogenic potential of a transformation-deficient BCR/ABL mutant. *J Exp Med* 1998; **187**: 1995–2007.
- [40] SMITH JD, WAEDELDE C, HORWITZ A, ZHENG P. Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux. *J Biol Chem* 2002; **277**: 17797–17803.
- [41] TUOMINEN EK, WALLACE CJ, KINNUNEN PK. Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *J Biol Chem* 2002; **277**: 8822–8826.
- [42] TYURINA YY, SERINKAN BF. Lipid antioxidant etoposide inhibits phosphatidylserine externalization and macrophage clearance of apoptotic cells by preventing phosphatidylserine oxidation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 6056–6064.
- [43] TYURINA YY, TYURIN VA, ZHAO Q, DJUKIC M, QUINN PJ, PITT BR, KAGAN VE. Oxidation of phosphatidylserine: a mechanism for plasma membrane phospholipid scrambling during apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **324**: 1059–1064.
- [44] TYURINA YY, SHVEDOVA AA, KAWAI K, TYURIN VA, KOMMINEINI C, QUINN PJ, SHOR NF, FABISIAK JP, KAGAN VE. Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine. *Toxicology* 2000; **148**: 93–101.
- [45] VANCE JC, STEENBERGEN R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res* 2005; **44**: 207–234.
- [46] WEIL M, JACOBSON MD, RAFF CM. Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Soem and chicken erythrocytes. *J Cell Biol* 1998; **10**: 369–377.
- [47] ZWAAL RFA, COMFURIUS P, BEVERS EM. Scott syndrome a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1636**: 119–128.
- [48] ZWAAL RFA, COMFURIUS P, BEVERS EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**: 971–988.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 18.12. 2006 r.

Przyjęto: 15.01. 2007 r.

90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16,

e-mail: aszwar@biol.uni.lodz.pl