

# **PNPLA porodica enzima: karakterizacija i biološka uloga**

Ana-Marija Lulić

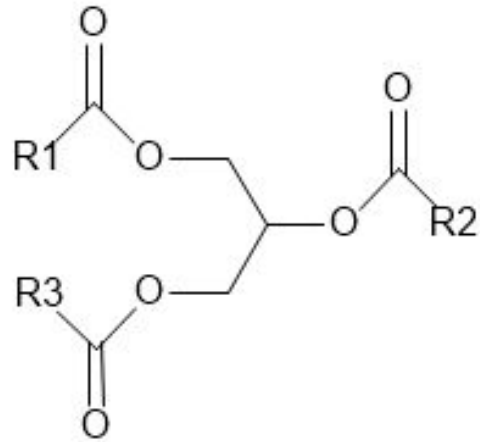
Kemijski seminar 1

Poslijediplomski studij kemije, smjer: biokemija

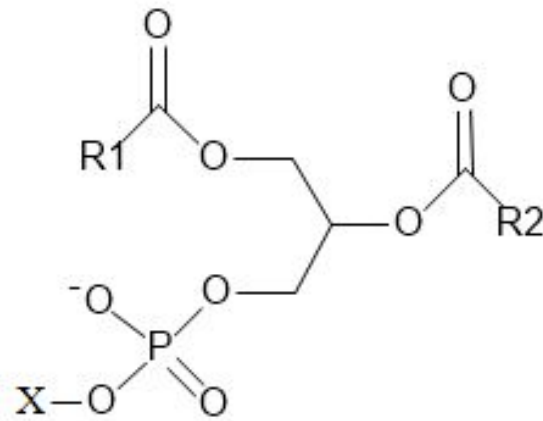
# Patatin-like phospholipase domain containing proteins

## (PNPLA)

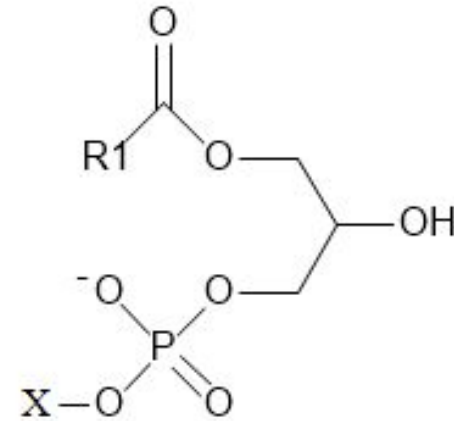
- $Ca^{2+}$ -independent phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) – hidroliza supstituenta na položaju *sn*-2 fosfolipida



Glicerolipid (triacilglicerid)



Glicerofosfolipid



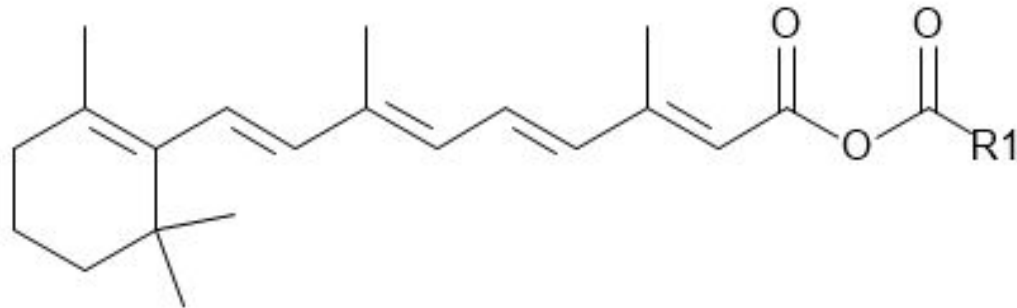
Glicerofosfolipid (lizofosfolipid)

X = -H (lizo)fosfatidilna kiselina

X =  $-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$  (lizo)fosfatidilserin

X =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$  (lizo)fosfatidiletanolamin

X =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$  (lizo)fosfatidilkolin



Retinolni ester

R1, R2 = acilne skupine

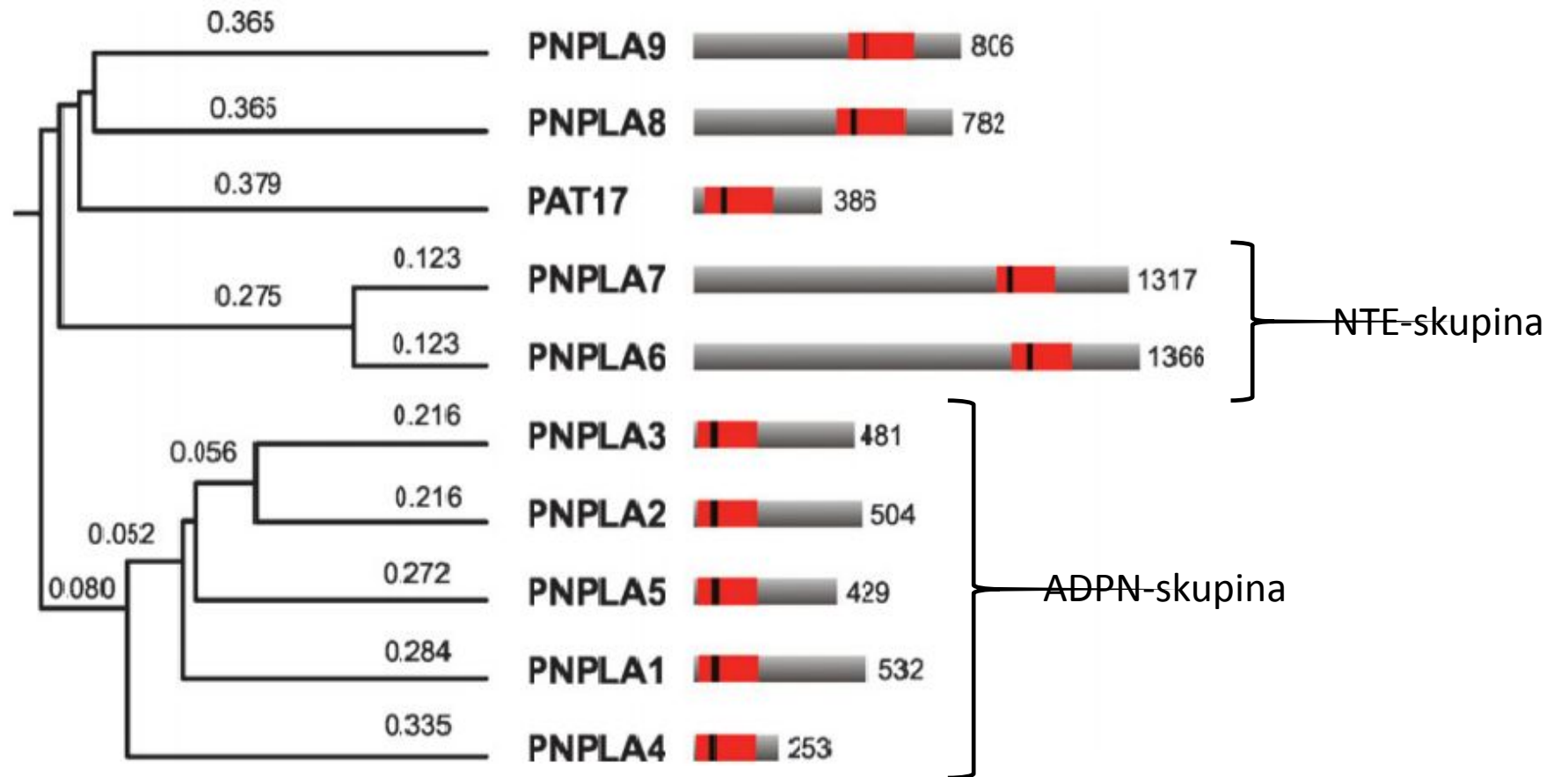
# Patatin

- Visoko zastupljen u gomolju krumpira
- Nespecifična acil-hidrolaza
- aktivno mjesto – katalitička dijada Ser-Asp  
→ Ser dio Gly-X-Ser-X-Gly motiva u  $\alpha/\beta/\alpha$  trosloju
- Sudjeluje u staničnoj signalizaciji, hidrolizi membranskih lipida, obrani od parazita



Pretpostavljena 3D struktura patatinske domene PNPLA1 enzima, katalitička dijada: Ser53-Asp172.

# PNPLA porodica enzima



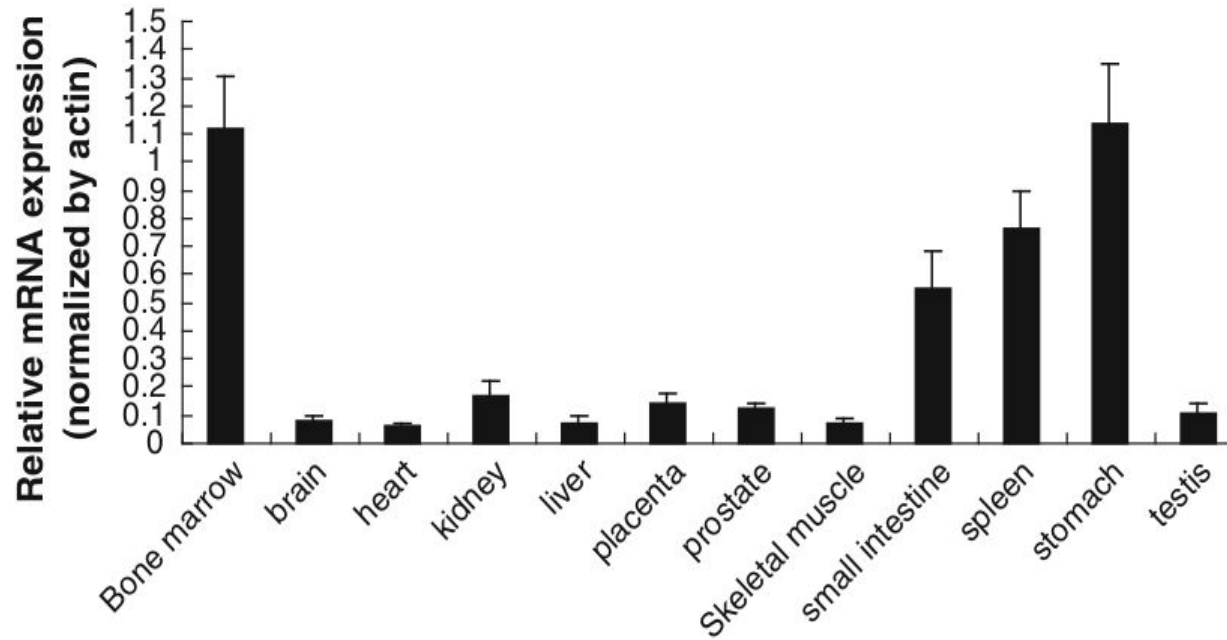
Filogenetski odnos i usporedba struktura PNPLA enzima.

## ADPN-skupina (PNPLA1-5)

- N-terminalna (patatinska) domena – katalitička dijada (Ser-Asp) + oksianionska šupljina (motiv bogat Gly)
- C-terminalna domena – varijabilna → sekvenca za asocijaciju s lipidnim kapljicama (LD, engl. *lipid droplets*)
- PNPLA4 – ne sadrži C-domenu → lokaliziran u citoplazmi
- Lipidne kapljice – dinamični organeli
  - lokalizirane u citosolu
  - sadrže triacilgliceride i kolesteril-estere, omeđene fosfolipidnim slojem
  - sastav ovisi o tipu stanice i tkivu

# PNPLA1

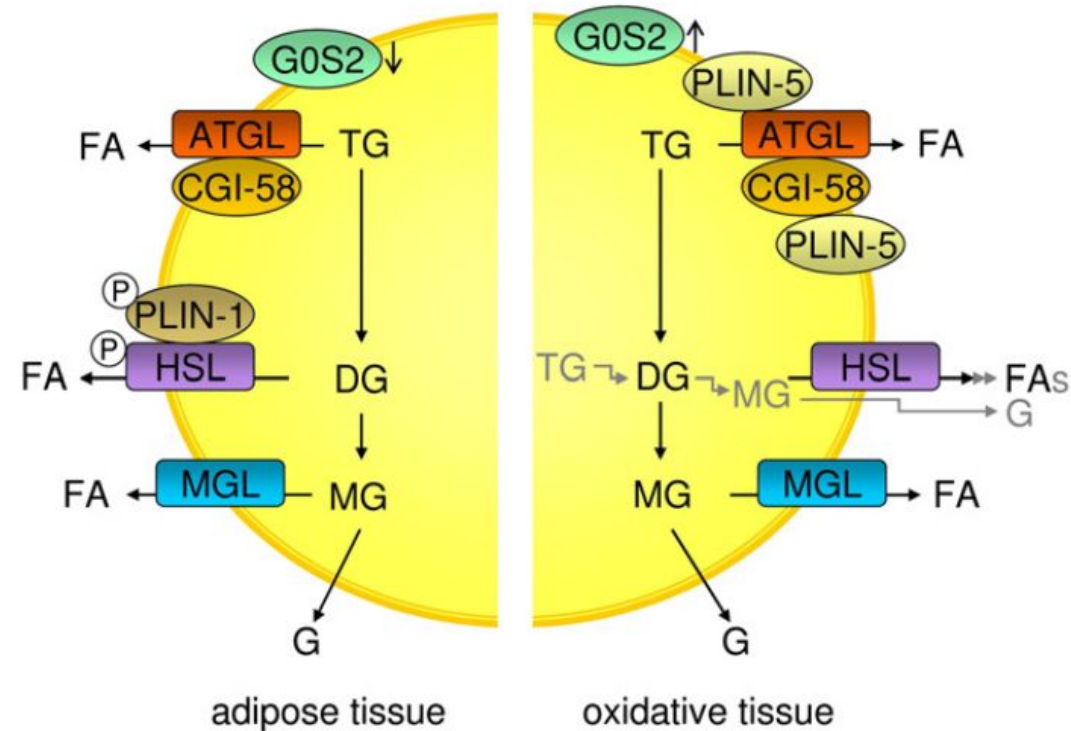
- Ekspimiran u gotovo svim tkivima, visoka ekspresija u koži
- Sinteza glicerofosfolipida → diferencijacija keranocita
- Mutacija u C-domeni preko koje asocira s lipidnim kapljicama → ihtioza (urođena bolest kože)



Razina ekspresije mRNA PNPLA1 različitim ljudskim tkivima.

# PNPLA2 (ATGL, *desnutrin*)

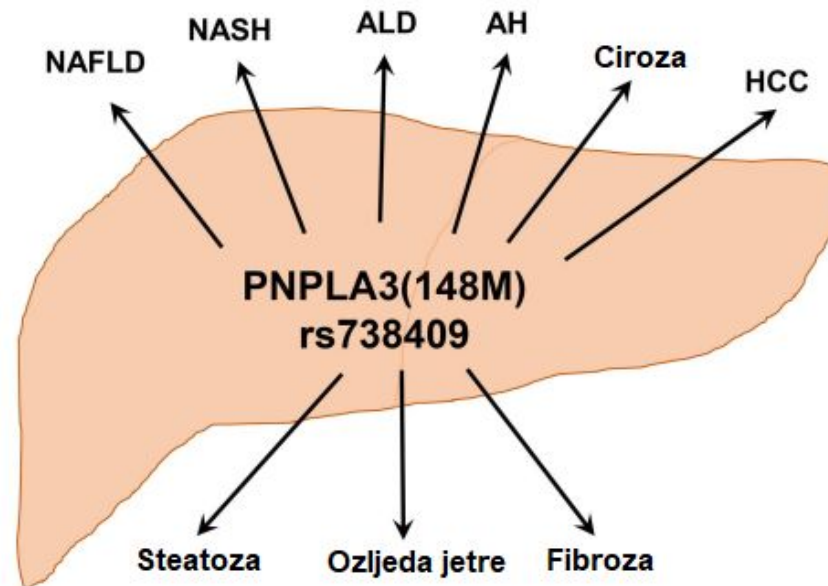
- Hidroliza triacilglicerida u lipolizi, fosfolipazna i transacilazna aktivnost
- mRNA PNPLA2 eksprimirana u gotovo svim tkivima, a najviše u masnom tkivu
- mRNA PNPLA2 visoko eksprimirana u stanju gladi
- CGI-58 (ABDH5) – aktivator PNPLA2
- Mutacije u genu koji kodira PNPLA2 → NLSD (engl. *neutral lipid storage disease*) uz miopatiju
- Mutacije u genu koji kodira CGI-58 → NLSD uz ihtiozu



Lipoliza u masnom tkivu i tkivima u kojima se odvija oksidacija masnih kiselina u stanju gladi. TG – triacilgliceridi, DG – triacilgliceridi, MG – monoaciltrigliceridi, G – glicerol, PLIN1 – perilipin-1, PLIN5 – perilipin-5.

# PNPLA3 (*adiponutrin*)

- Katalizira reakciju pretvorbe lizofosfatidilne kiseline u fosfatidilnu kiselinu
- Najviše eksprimiran u jetri, a u nižoj razini u masnom tkivu, mozgu, bubrezima i koži
- Mutirani oblik PNPLA3 u kojem je Ile zamijenjen u Met na poziciji 148 → rezistencija na ubikvitilaciju → povezanost s brojnim bolestima jetre



Povezanost mutiranog oblike PNPLA3 (148M) s različitim bolestima jetre. NAFLD – *non-alcoholic fatty liver disease*, NASH – *non-alcoholic steatohepatitis*, ALD – *alcoholic liver disease*, AH – *alcoholic hepatitis*, HCC – *hepatocellular carcinoma*.



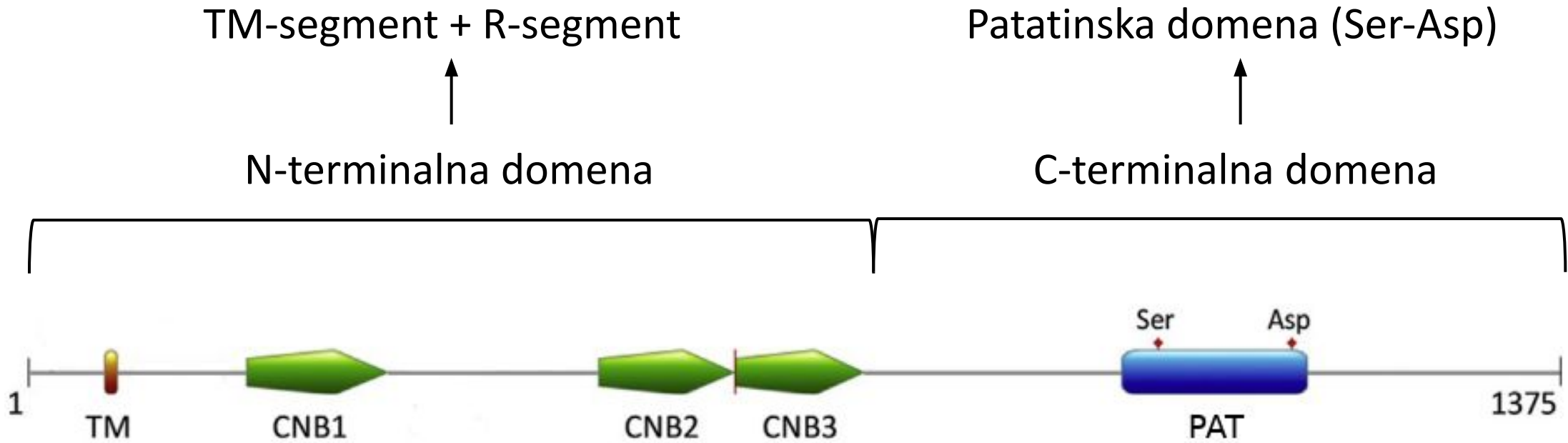
## **PNPLA4 (GS2)**

- Ekspimiran u gotovo svim tkivima
- Katalizira hidrolizu triacilglicerida i pokazuje retinol transacilaznu aktivnost
- Sudjeluje u metabolizmu retinoida (vitamin A i metaboliti) → hidrolizira retinolne estere u koži

## **PNPLA5 (GS2-like)**

- Ekspimiran u gotovo svim tkivima
- Kao i PNPLA3, niska razina ekspresije u stanju gladi
- Esencijalan za optimalnu inicijaciju autofagije → započinje nastajanjem fagofora koji se proširuje i zatvara u autofagosom (omeđen membranskim dvoslojem) → PNPLA5 asociran s LD (pohrana neutralnih lipida) → lipidne kapljice i neutralni lipidi doprinose nastajanju membranskog dvosloja autofagosoma putem PNPLA5
- Disfunkcionalna autofagija → povezanost sa starenjem, razvojem tumora, neurodegeneracije i upalnim procesima

# NTE-skupina (PNPLA6 i PNPLA7)

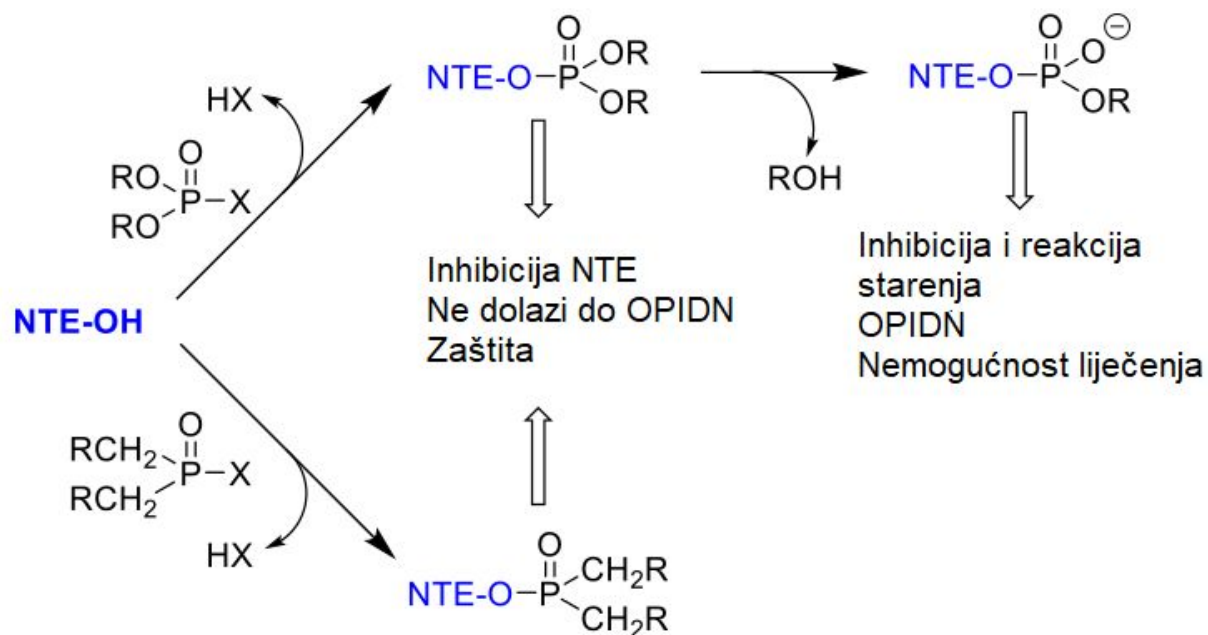


Pretpostavljena organizacija domena PNPLA6 i PNPLA7. TM – transmembranski segment, CNB1-3 – vezna mjesta za cikličke nukleotide (dio regulatornog (R) segmenta), PAT – patatinska domena.

- Membranski proteini → asocirani s endoplazmatskim retikulumom
- Sama C-terminalna domena pokazuje visoku afinitet za asocijaciju s lipidnim kapljicama

# PNPLA6 (NTE, engl. *neuropathy target esterase*)

- Najviše eksprimiran u mozgu i limfocitima, a u nižoj razini u leđnoj moždini, jetri, bubrezima, placenti, slezeni
- Katalizira hidrolizu acilnih lanaca s položaja *sn*-1 i *sn*-2 fosfolipida, preferentno fosfatidilkolin i lizofosfatidilkolin
- Meta organofosfatnih (OP) spojeva → OPIDN (engl. *Organophosphate-induced delayed neuropathy*), dolazi do degeneracije dugačkih aksona u leđnoj moždini i perifernom živčanom sustavu



Mehanizam inhibicije PNPLA6 OP spojevima.

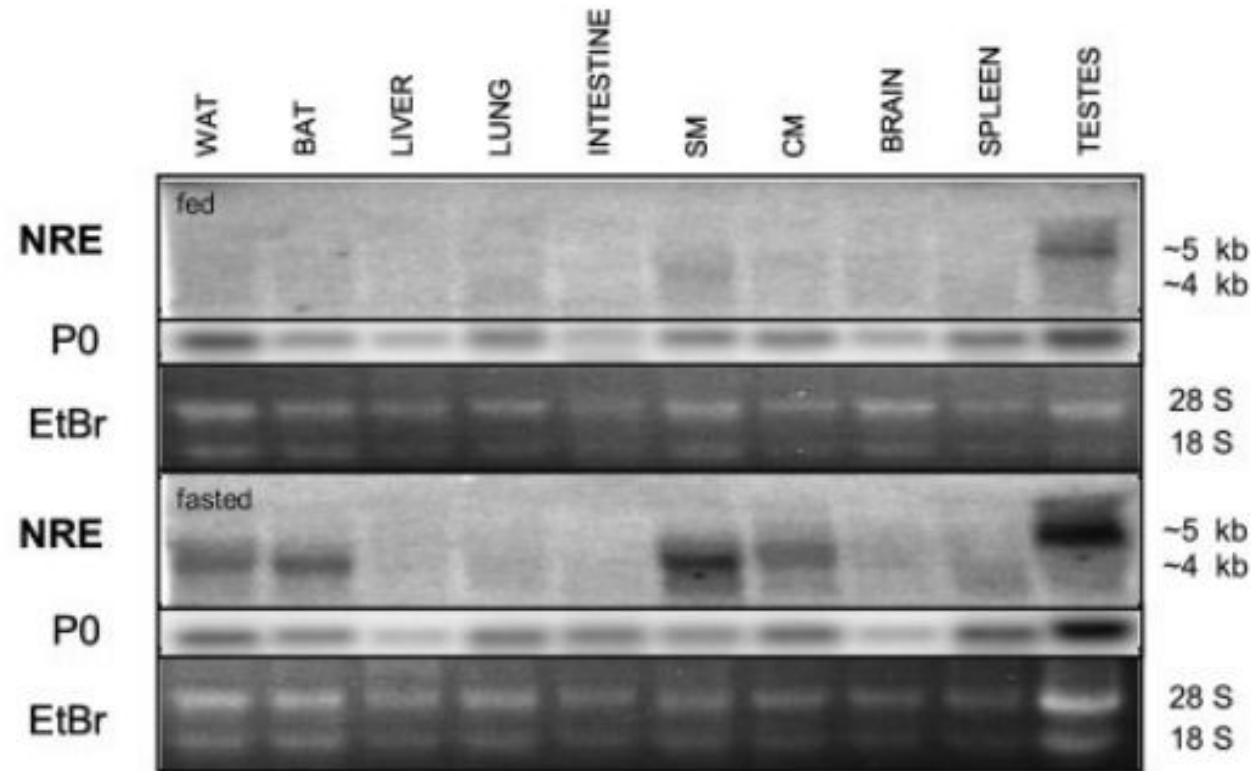
<p><b>TIP 1</b> Uzrokuju neuropatiju Podliježu reakciji starenja</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{X}-\text{P}-\text{O}-\text{R} \\ \diagdown \\ \text{O}-\text{R}' \end{array}$ <p>Fosfat</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{X}-\text{P}-\text{O}-\text{R} \\ \diagdown \\ \text{R}' \end{array}$ <p>Fosfonat</p>	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{O} \\ \parallel \\ \text{X}-\text{P}-\text{N}-\text{R}' \\   \\ \text{N}-\text{R}' \\   \\ \text{R} \end{array}$ <p>Fosforamidat</p>
<p><b>TIP 2</b> Ne uzrokuju neuropatiju Ne podliježu reakciji starenja</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{X}-\text{P}-\text{R} \\ \diagdown \\ \text{R}' \end{array}$ <p>Fosfinat</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{X}-\text{S}-\text{R} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ <p>Sulfonat</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{X}-\text{C}-\text{N}-\text{R}' \\ \diagdown \\ \text{R}' \end{array}$ <p>Karbamat</p>

Inhibitori PNPLA6.

- Knock-out PNPLA6 na miševima → letalan
- Smanjena ekspresija tijekom embrionalnog razvoja miševa ima negativan utjecaj na razvoj živčanog, krvožilnog i dišnog sustava
- "*loss-of-function*" mutacije povezane su s razvojem neuroloških bolesti (bolest motornih neurona, nasljedna spastična paraplegija 39, Boucher-Neuhäuser, Gordon-Holmes, Oliver-McFarlane i Laurence-Moon sindrom)

# PNPLA7 (*NTE-related esterase, NRE*)

- Najviša razina ekspresije u tkivima koja su meta inzulina, a ekspresija se smanjuje povećanjem koncentracije inzulina
- Katalizira hidrolizu lizofosfolipida, preferentno nezasićene vrste



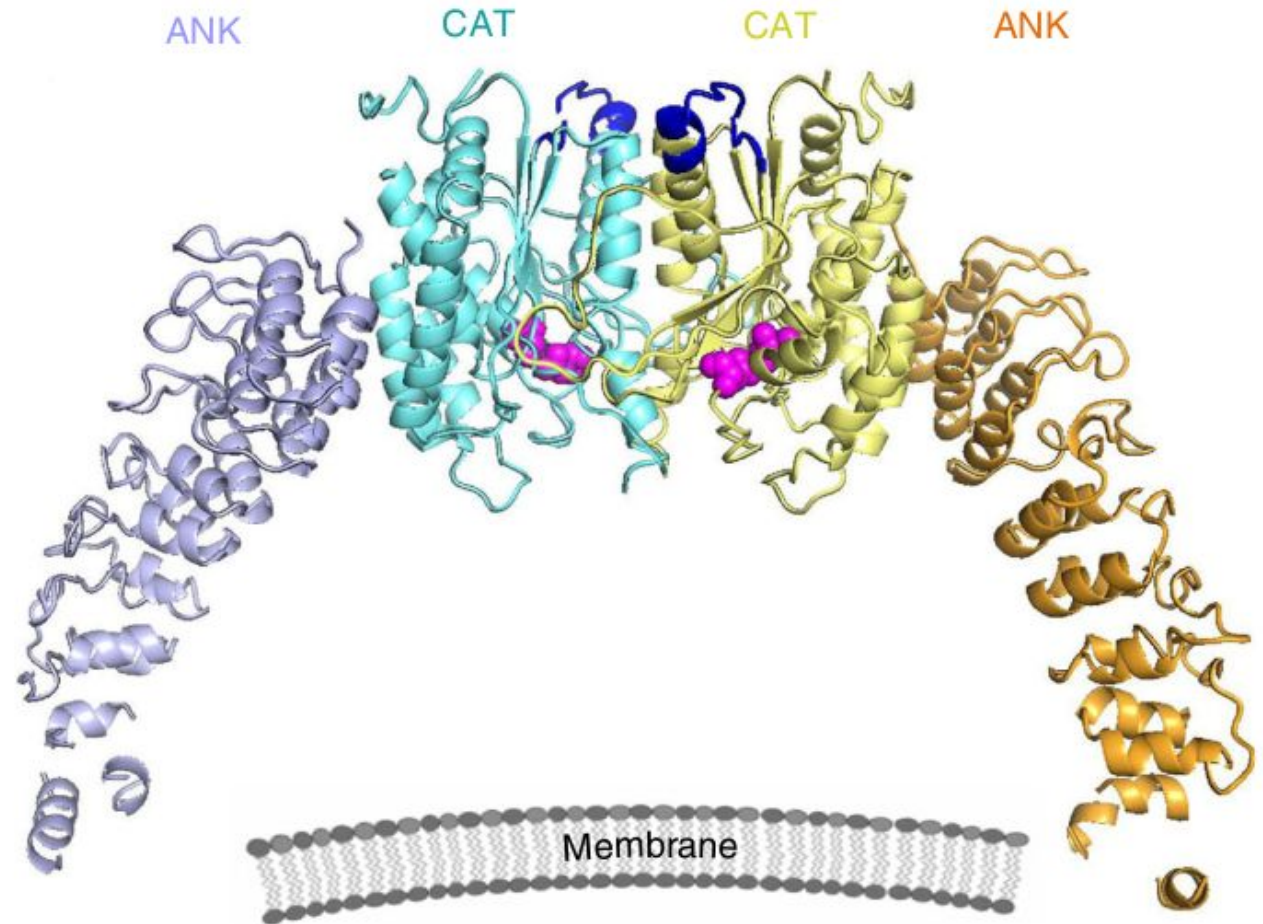
Ekspresija mRNA PNPLA7 u različitim ljudskim tkivima u stanju gladi i u stanju sitosti. WAT – *white adipose tissue*, BAT – *brown adipose tissue*, SM – *skeletal muscle*, CM – *cardiac muscle*.

# PNPLA8

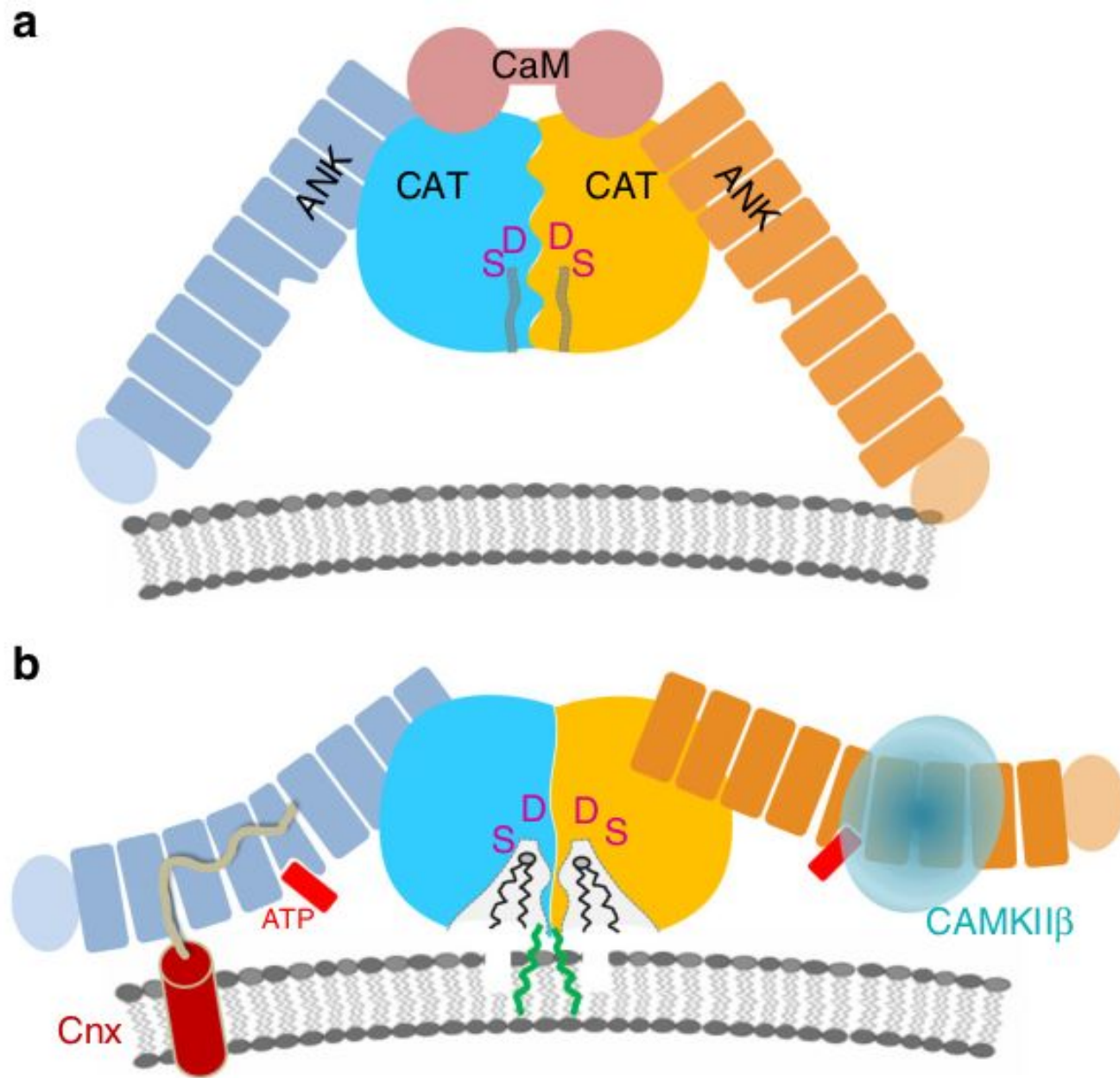
- C-terminalna (patatinska) domena + N-terminalna domena bogata Ser i Thr
- Može biti asociran s peroksisomom ili mitohondrijem
- Visoko eksprimiran u srcu, u nižoj razini eksprimiran u placenti, skeletnim mišićima, mozgu, jetri, gušterači i plućima
- Katalizira hidrolizu zasićenih masnih kiselina sa *sn*-1 ili *sn*-2 položaja diacil-fosfatidilkolinskih supstrata → produkt: 2-arahidonoil-lizofosfatidilkolin → metabolizira u bioaktivne molekule uključene u eikozanoidnu signalizaciju
- Uloga u održavanju homeostaze fosfolipida u srčanom mišiću, normalnoj funkciji mitohondrija i metabolizmu kardiolipina (fosfolipid isključivo zastupljen u membrani mitohondrija i neophodan je za normalnu funkciju mitohondrija)

# PNPLA9 (PLA2G6)

- Dimer (PDB: 6AUN)
- CAT – katalitička domena → katalitička dijada Ser-Asp (ružičasta boja)
- ANK – ankirinska ponavljanja (9)
- Vezno mjesto za CaM kinazu (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*) → tamnoplava boja
- CaM inhibira enzimsku aktivnost → interakcija slabi autoacilacijom (Cys651)
- Interakcija s ATP-om, kalneksinom (*chaperon*), CaM kinazom iz β-stanica gušterače



Konfiguracija dimera PNPLA9 u kristalnoj strukturi



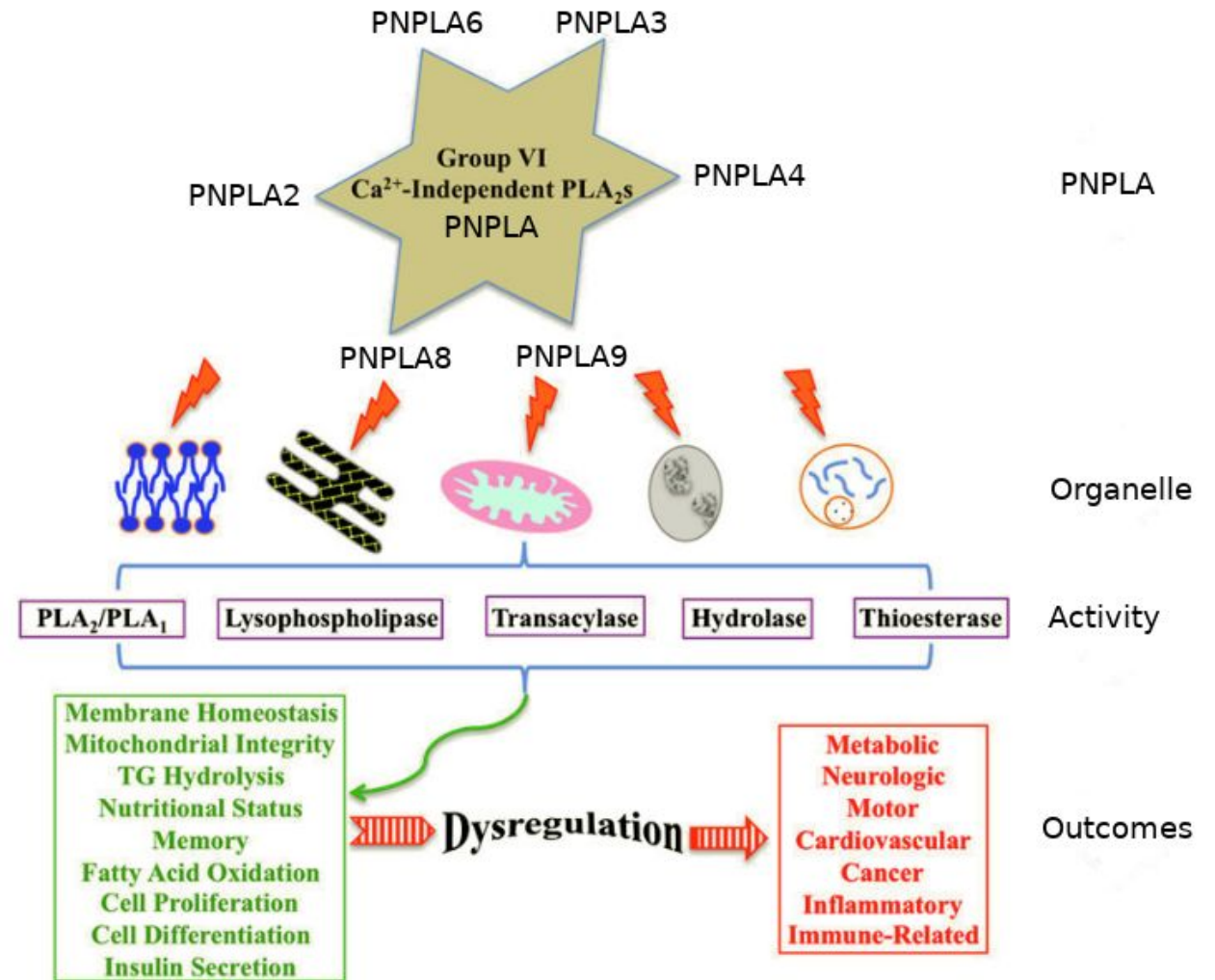
Pretpostavljeni mehanizam regulacije aktivnosti PNPLA9: a) zatvorena konformacija, b) otvorena konformacija.



- Eksprimiran u gotovo svim tkivima
- U bazalnim uvjetima lokaliziran u citoplazmi, stimulacijom može asocirati sa staničnom membranom, mitohondrijem, endoplazmatskim retikulumom, Golgijevim aparatom, jezgrinom ovojnicom
- Katalizira hidrolizu masnih kiselina s položaja *sn*-2 glicerofosfolipida → plazmalogeni fosfolipidi s arahidonskom kiselinom na položaju *sn*-2
- Transacilazna i tioesterazna aktivnost
- Uključen u niz bioloških procesa → stanični rast, modeliranje stanične membrane, autofagija, sekrecija inzulina, apoptoza
- Gubitak i smanjena aktivnost PNPLA9 povezana s neurodegenerativnim bolestima → Parkinsonova i Alzheimerova bolest, Karakov sindrom, INAD (engl. *infantile neuroaxonal dystrophy*) i NBIA (engl. *neurodegeneration with brain iron accumulation*)

# Zaključak

- Patatinska domena i katalitička dijada Ser-Asp
- Regulatorne domene koje imaju utjecaj na lokalizaciju u stanici
- Remodeliranje lipida → triacilgliceridi, fosfolipidi, retinolni esteri
- Važna uloga u brojnim biološkim procesima
- Povezanost mutacija i nepravilne enzimske aktivnost s razvojem različitih bolesti



Hvala na pažnji!