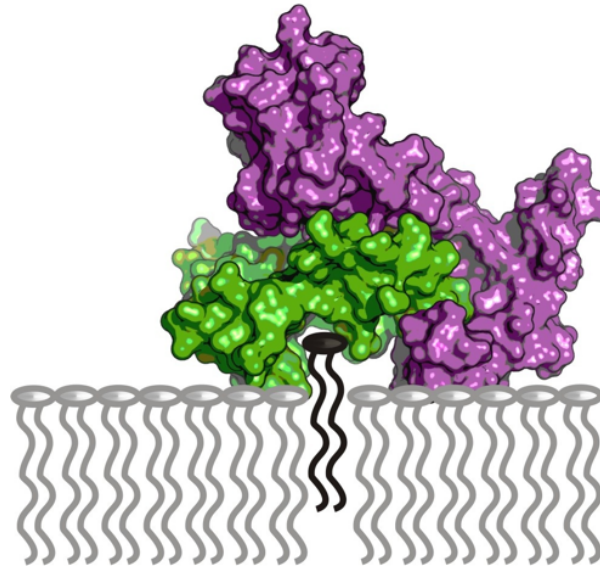


Encimi na membranski površini: fosfolipaze A_2 kot paradigma za medfazno encimatiko

Toni Petan

*Jožef Stefan Institute
Ljubljana, Slovenia*

toni.petan@ijs.si

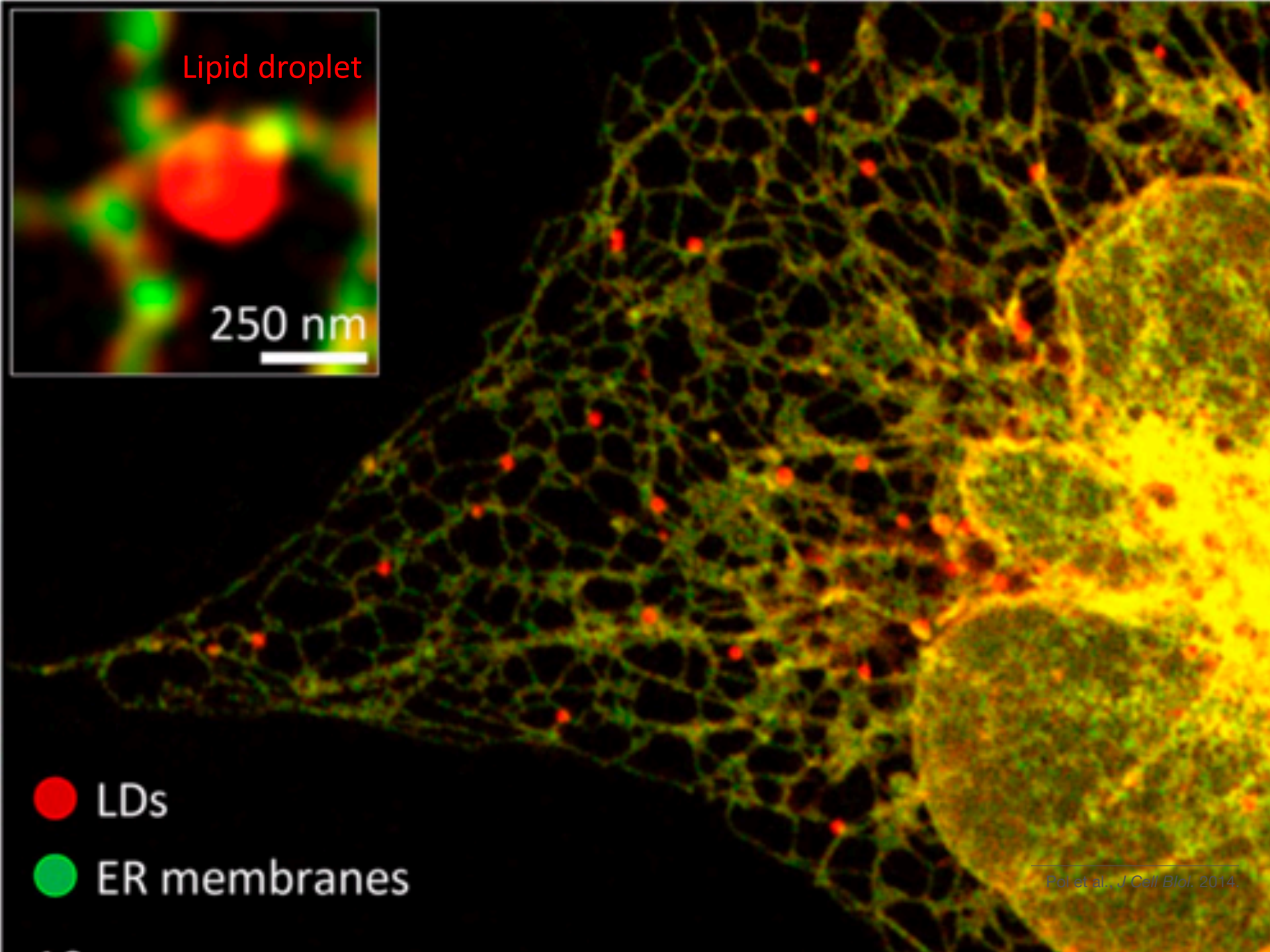


Lipid droplet

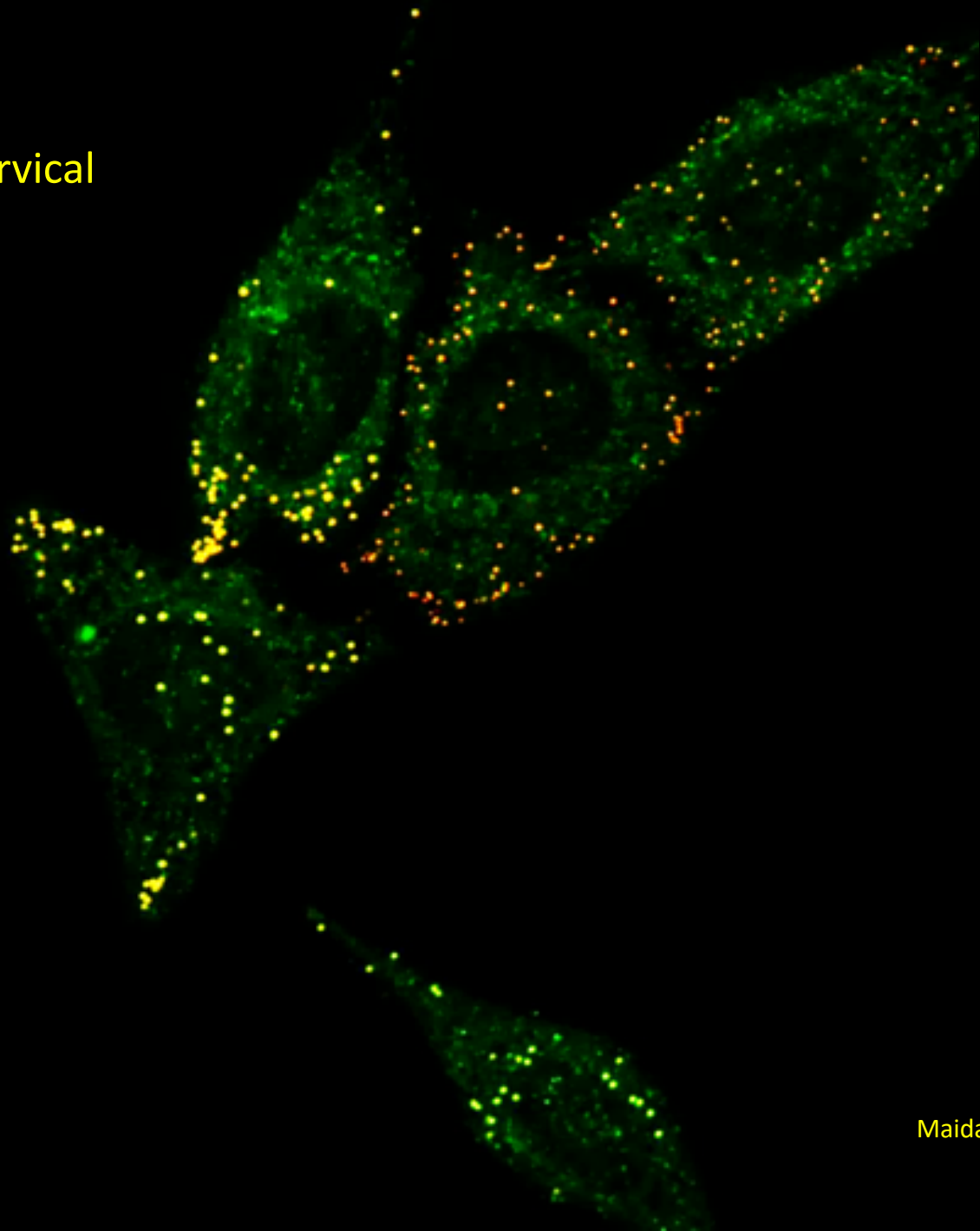
250 nm

● LDs

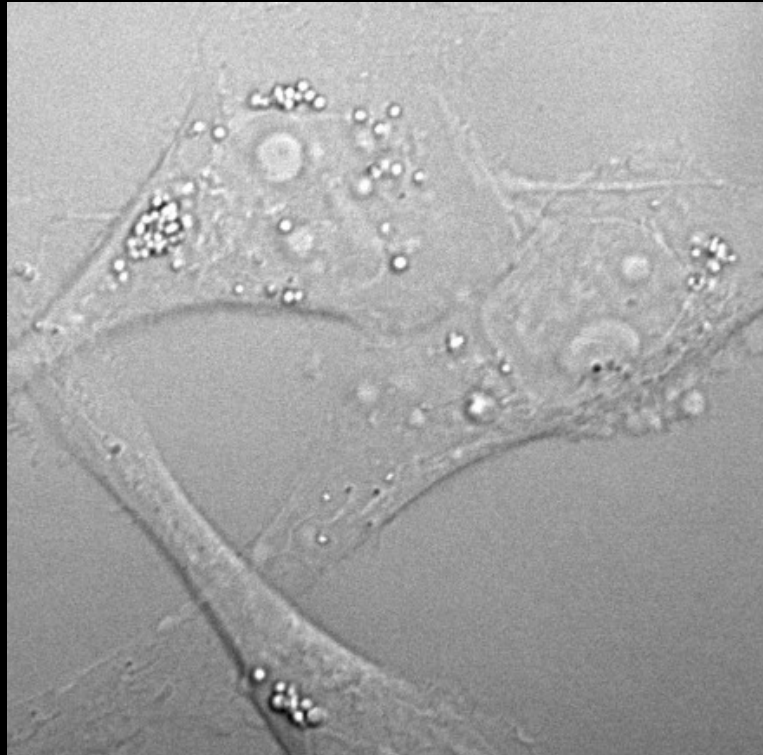
● ER membranes



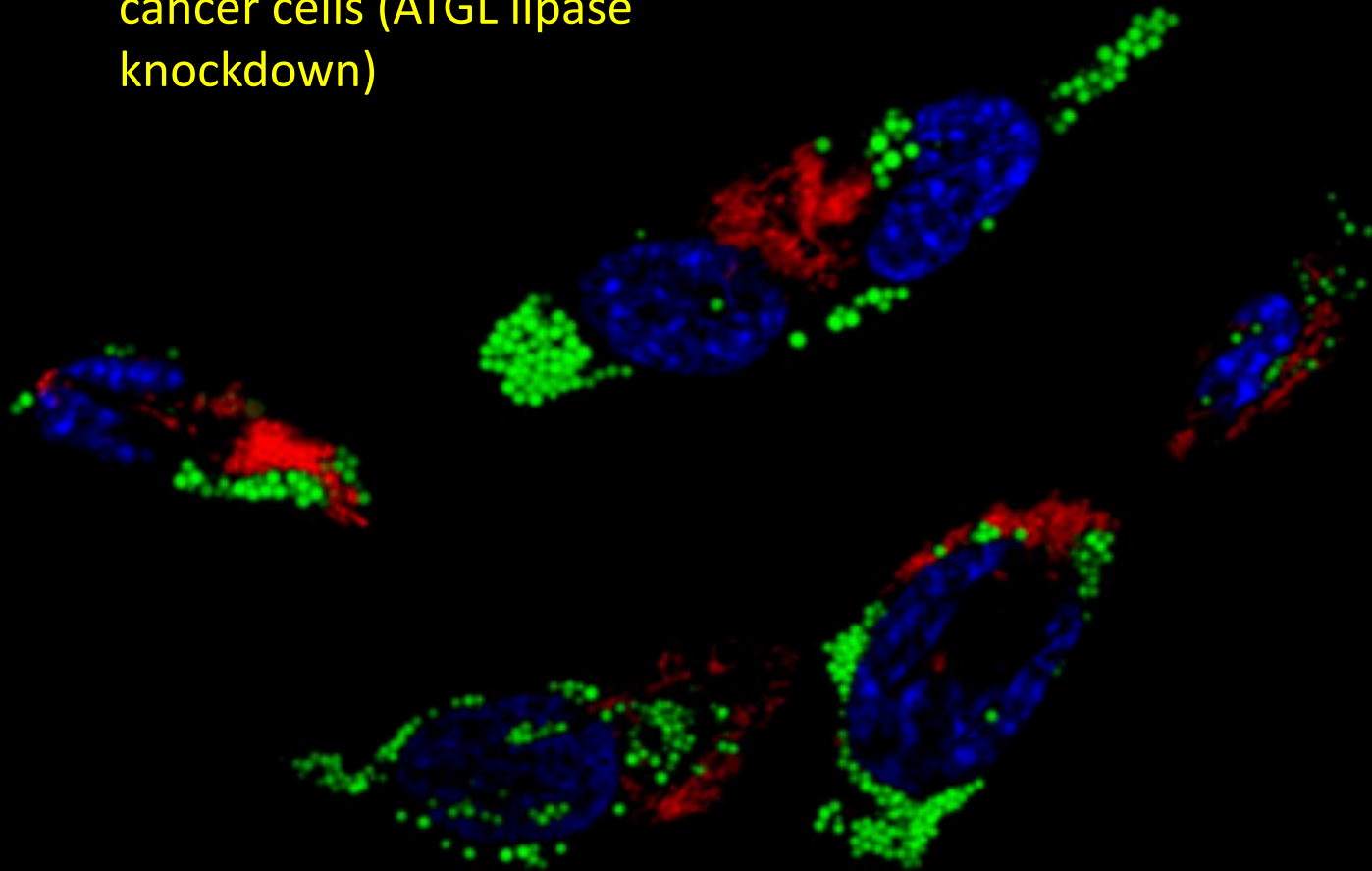
Lipid droplets in cervical
cancer cells



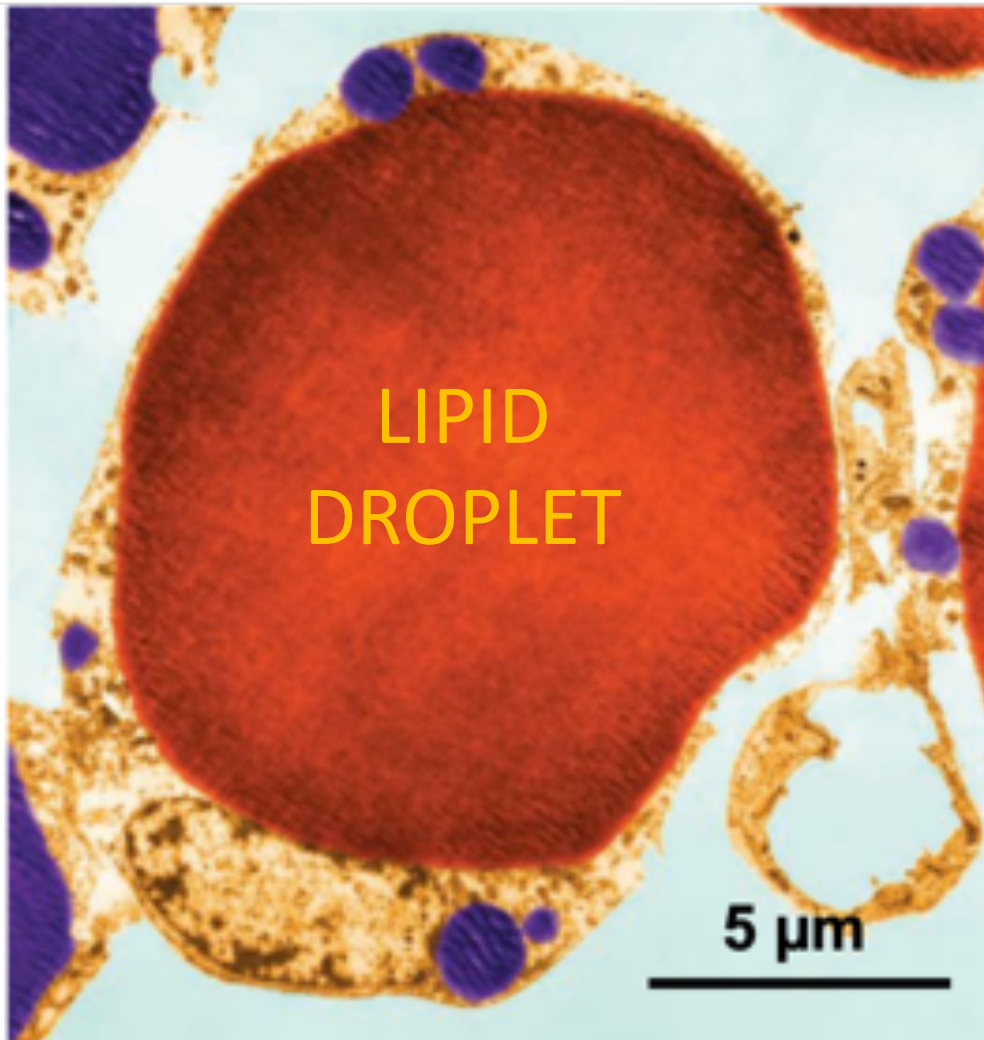
Lipid droplets in cervical cancer cells



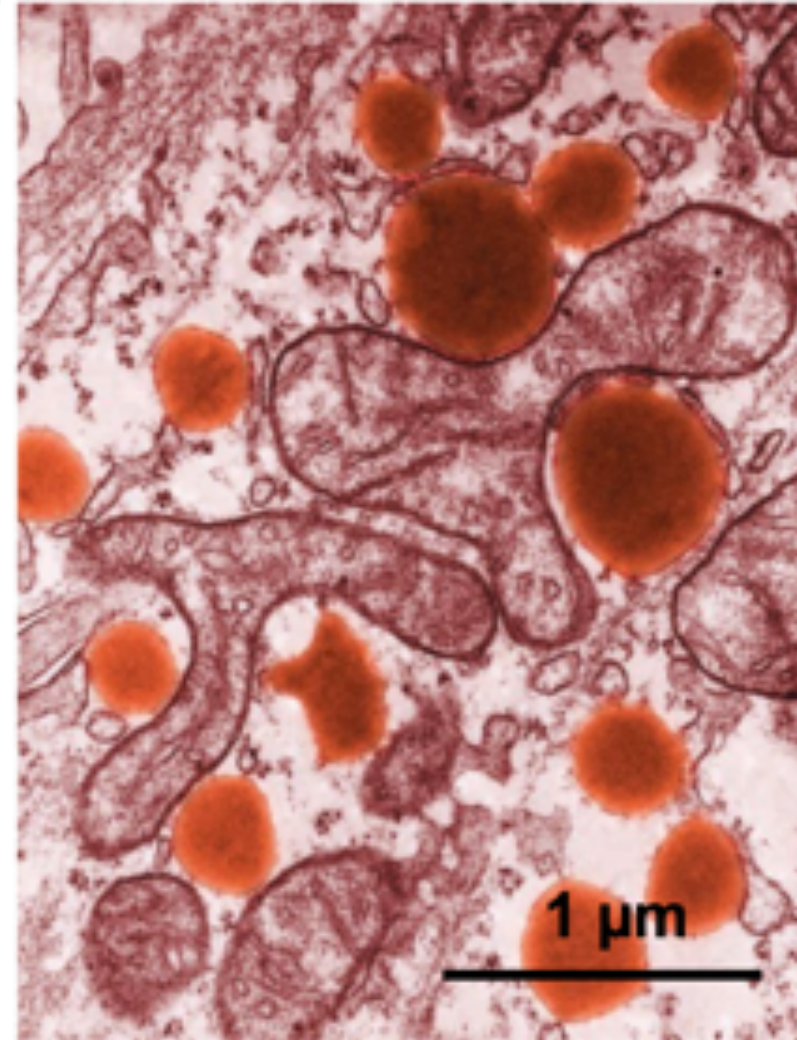
Lipid droplets in invasive breast cancer cells (ATGL lipase knockdown)



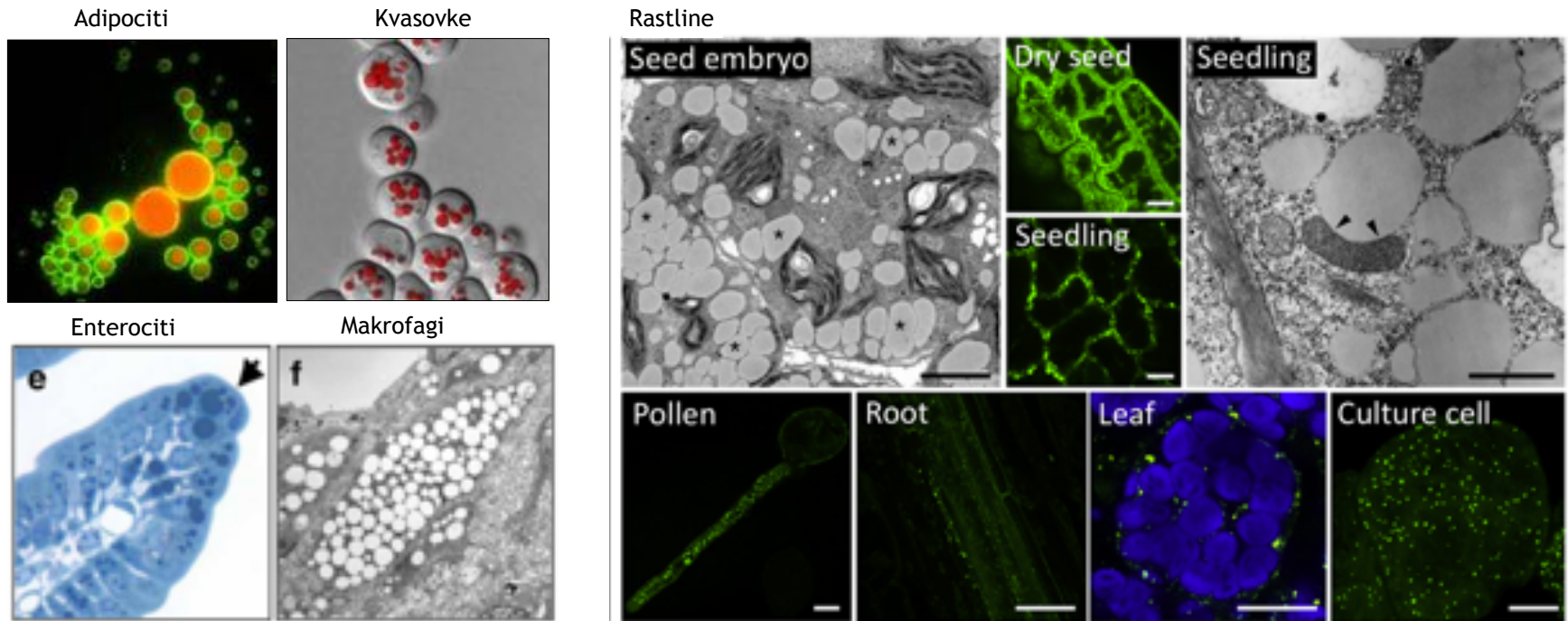
Adipocitna celica



Epitelijska celica

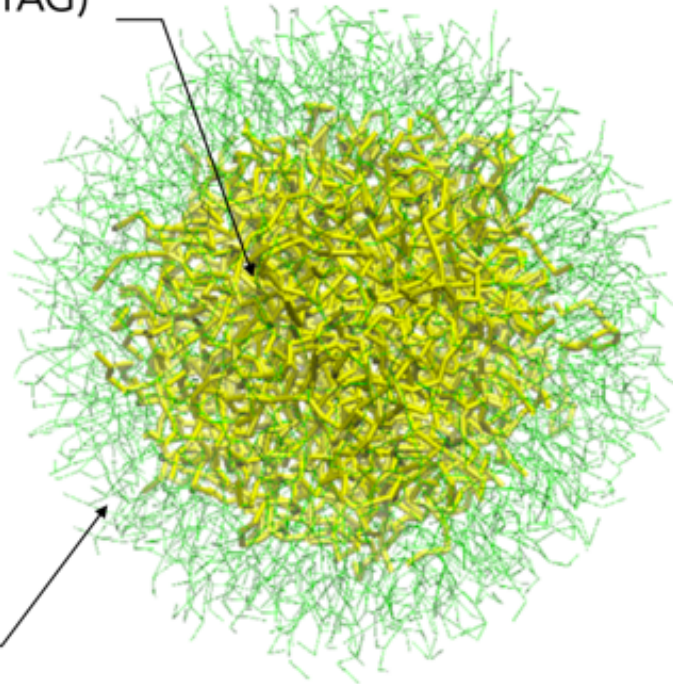


Lipidne kapljice so organeli prisotni v vseh evkariontih

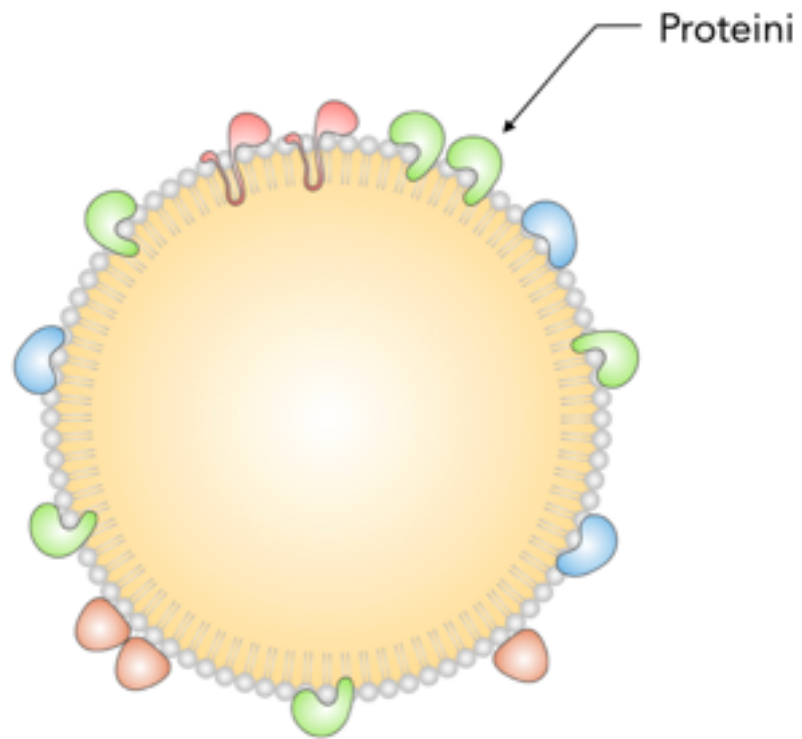


Triacilgliceroli (TAG)

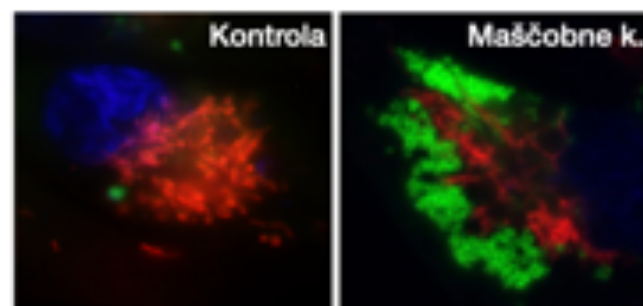
Sterolni estri



Fosfolipidi



Presežek hranil

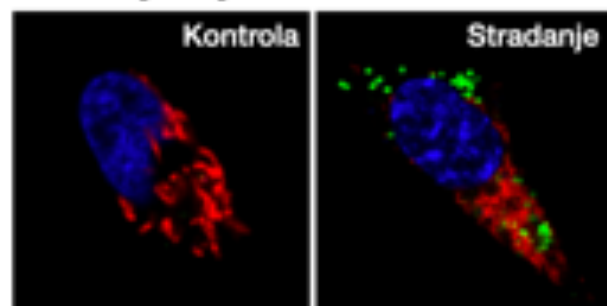


Celice raka dojke

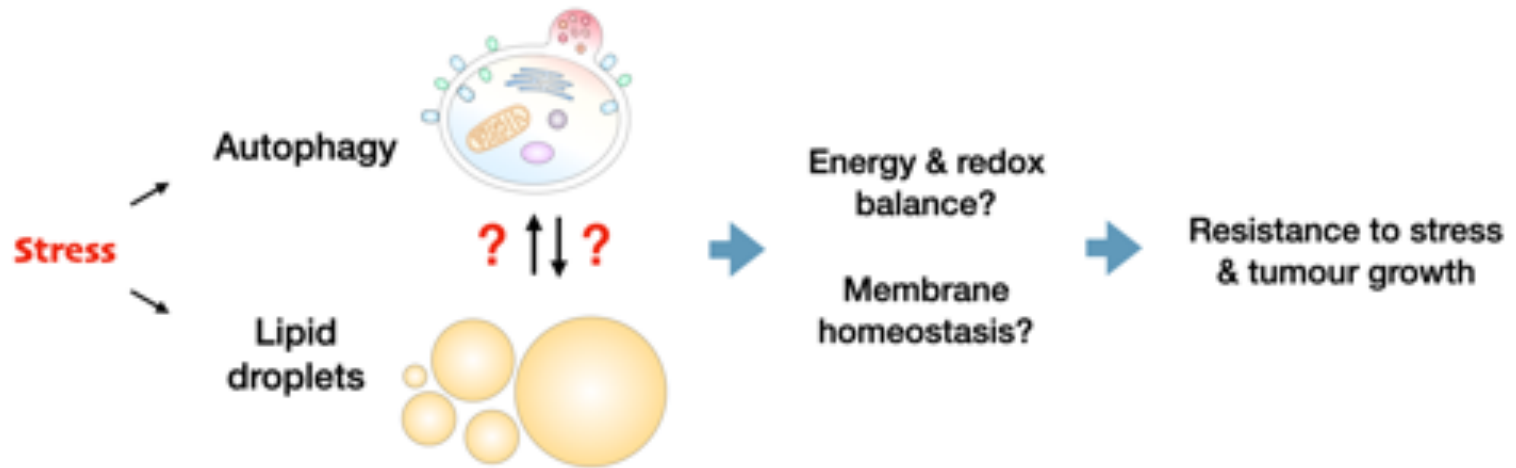
Mitochondria = RED

Lipid droplets = GREEN

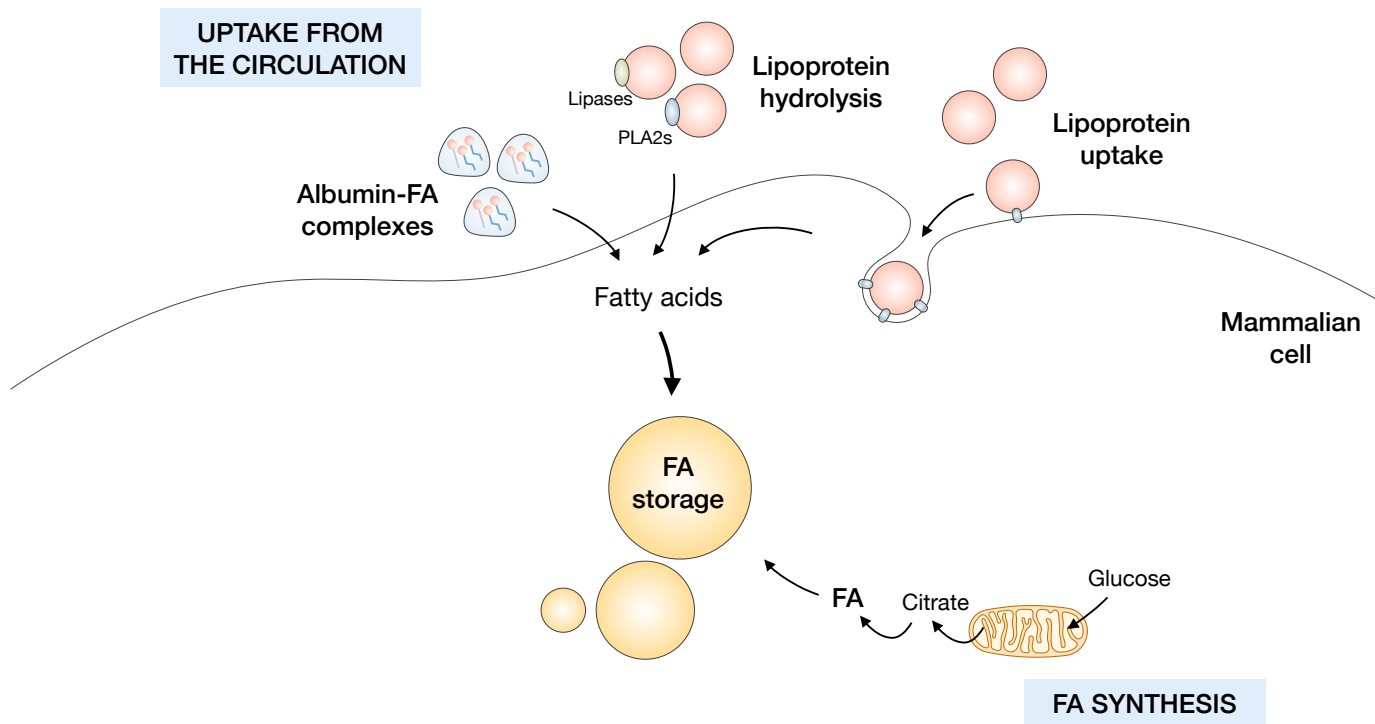
Pomanjkanje hranil



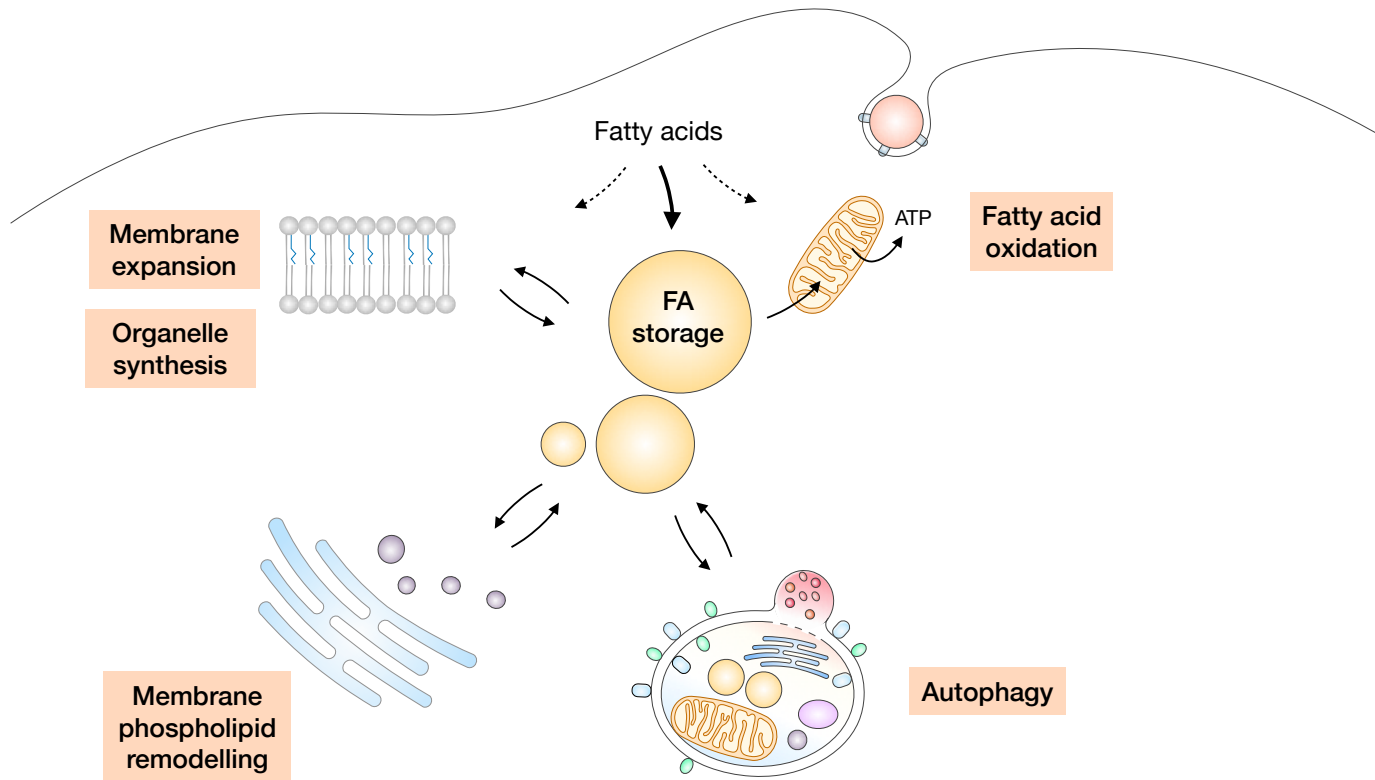
Celice raka dojke, akutno stradanje *in vitro*



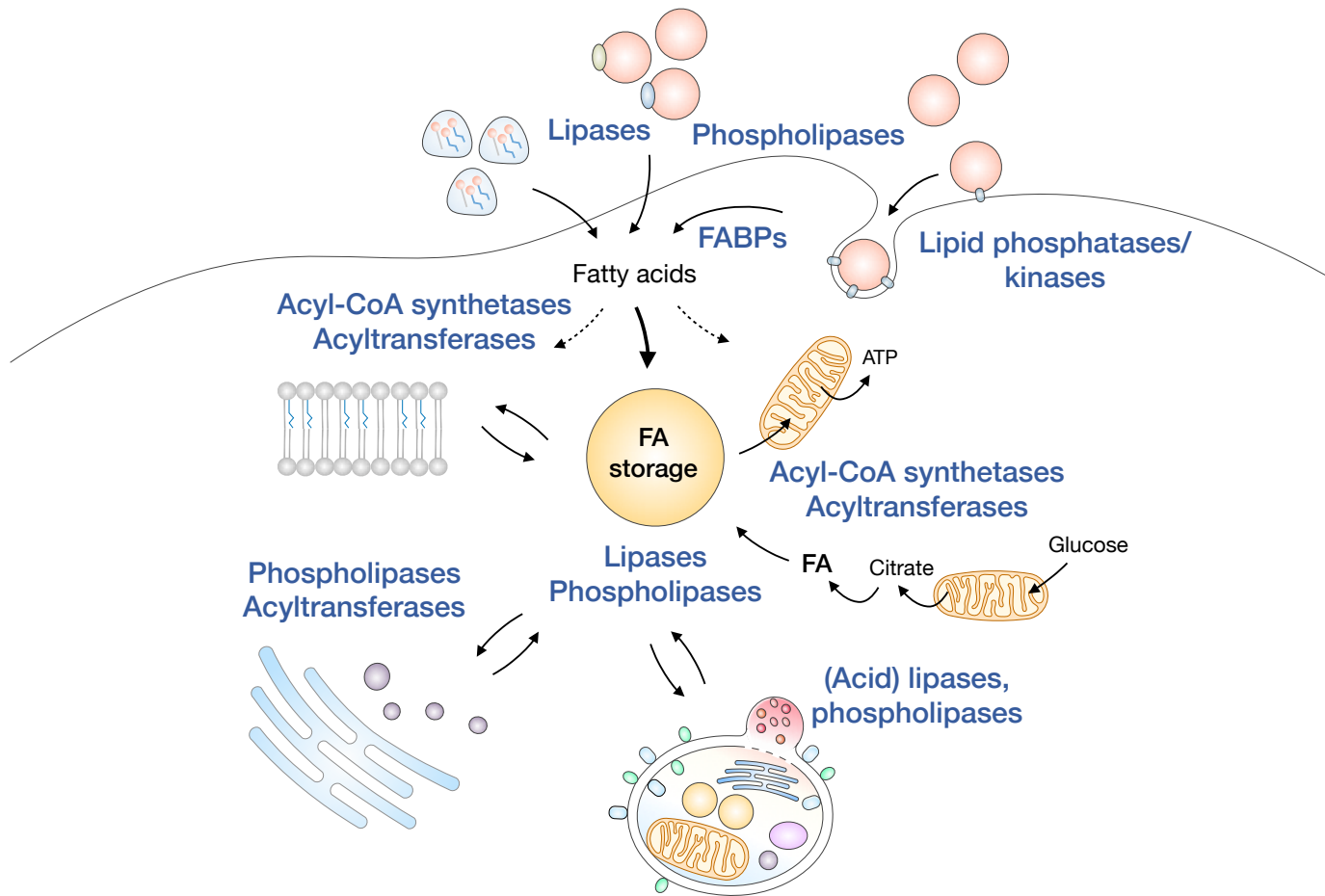
Življenska pot tipične maščobne kisline



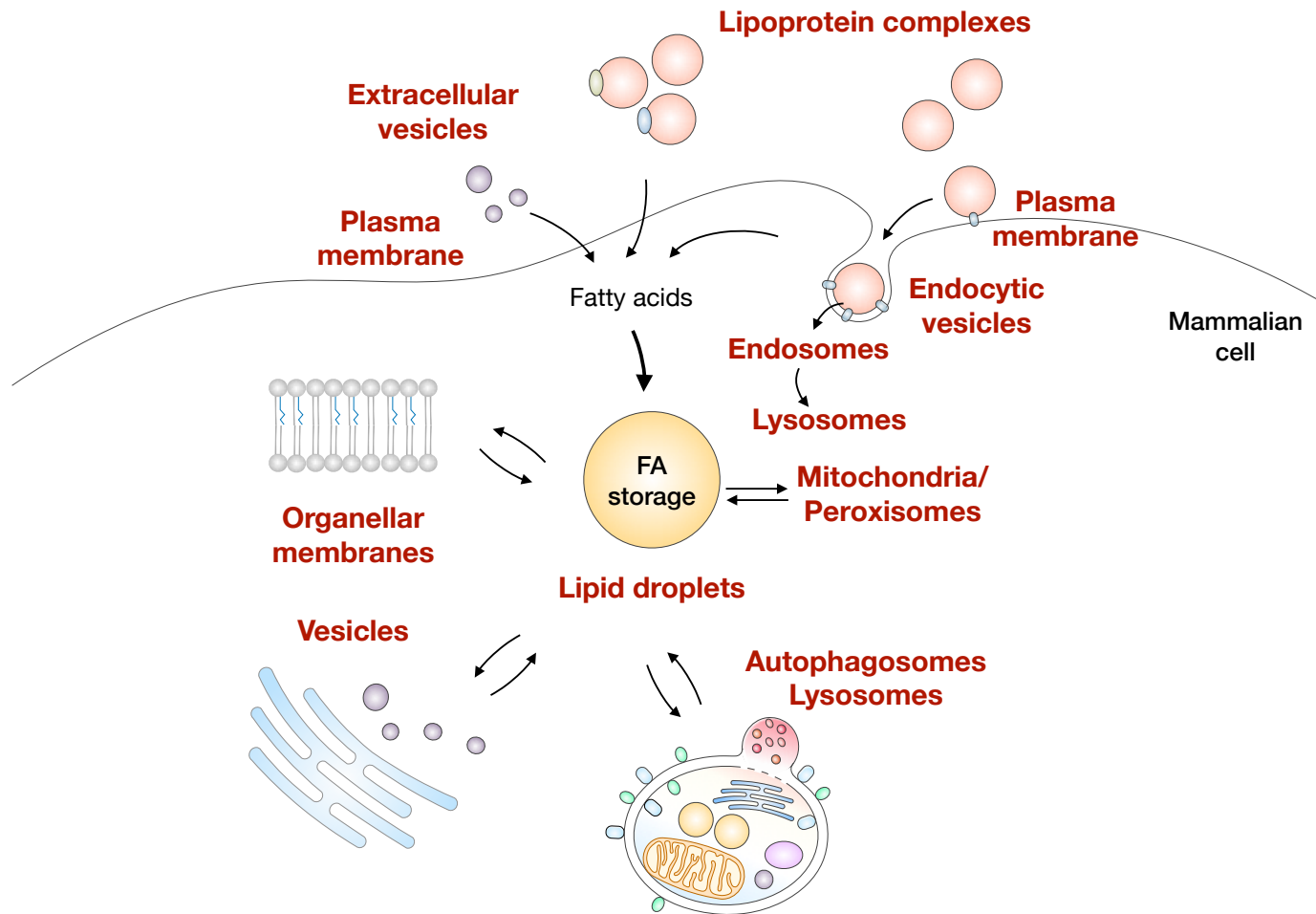
Življenska pot tipične maščobne kisline



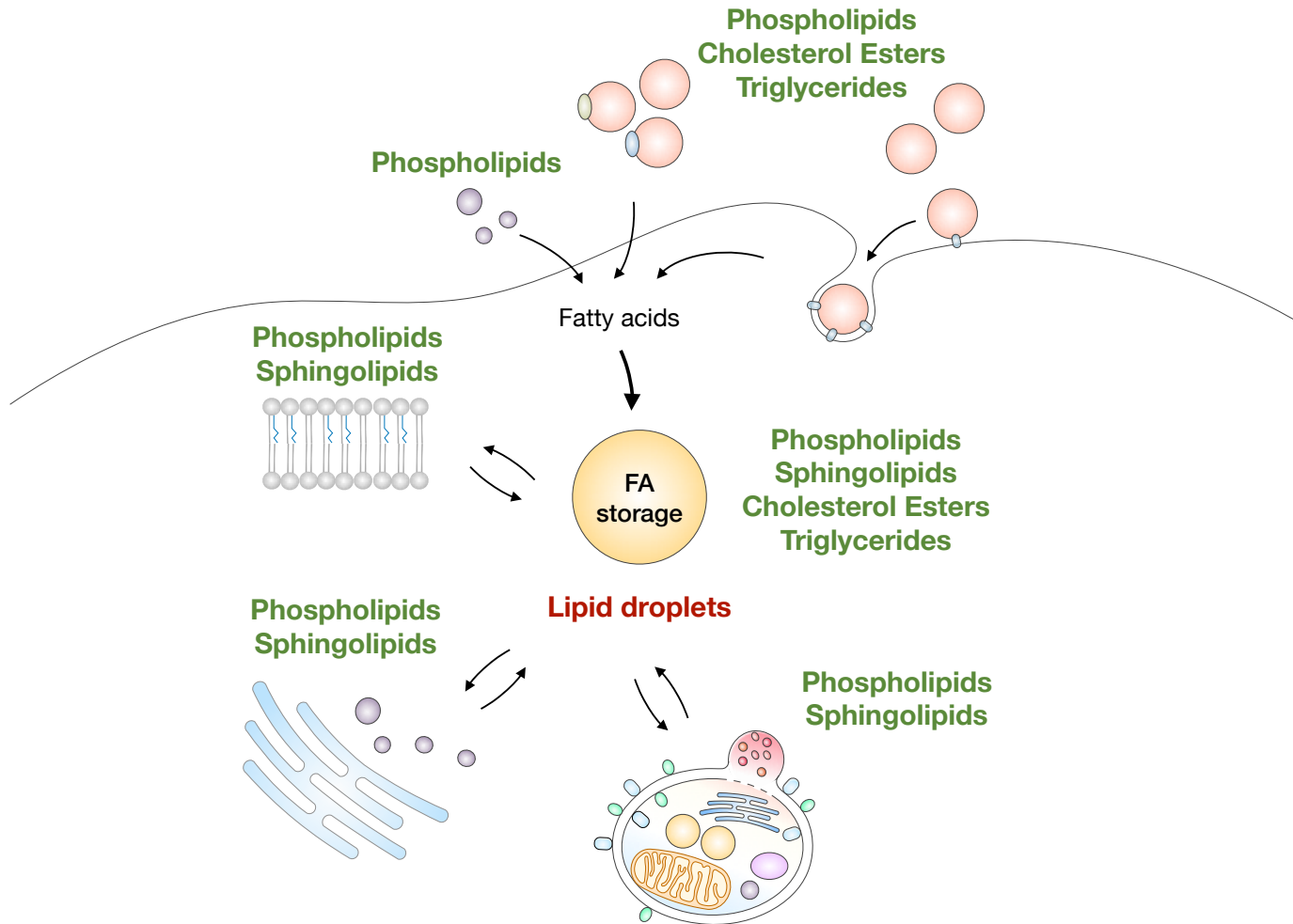
Življenska pot tipične maščobne kisline – ENCI MI



Življenska pot tipične maščobne kisline – STRUKTURE

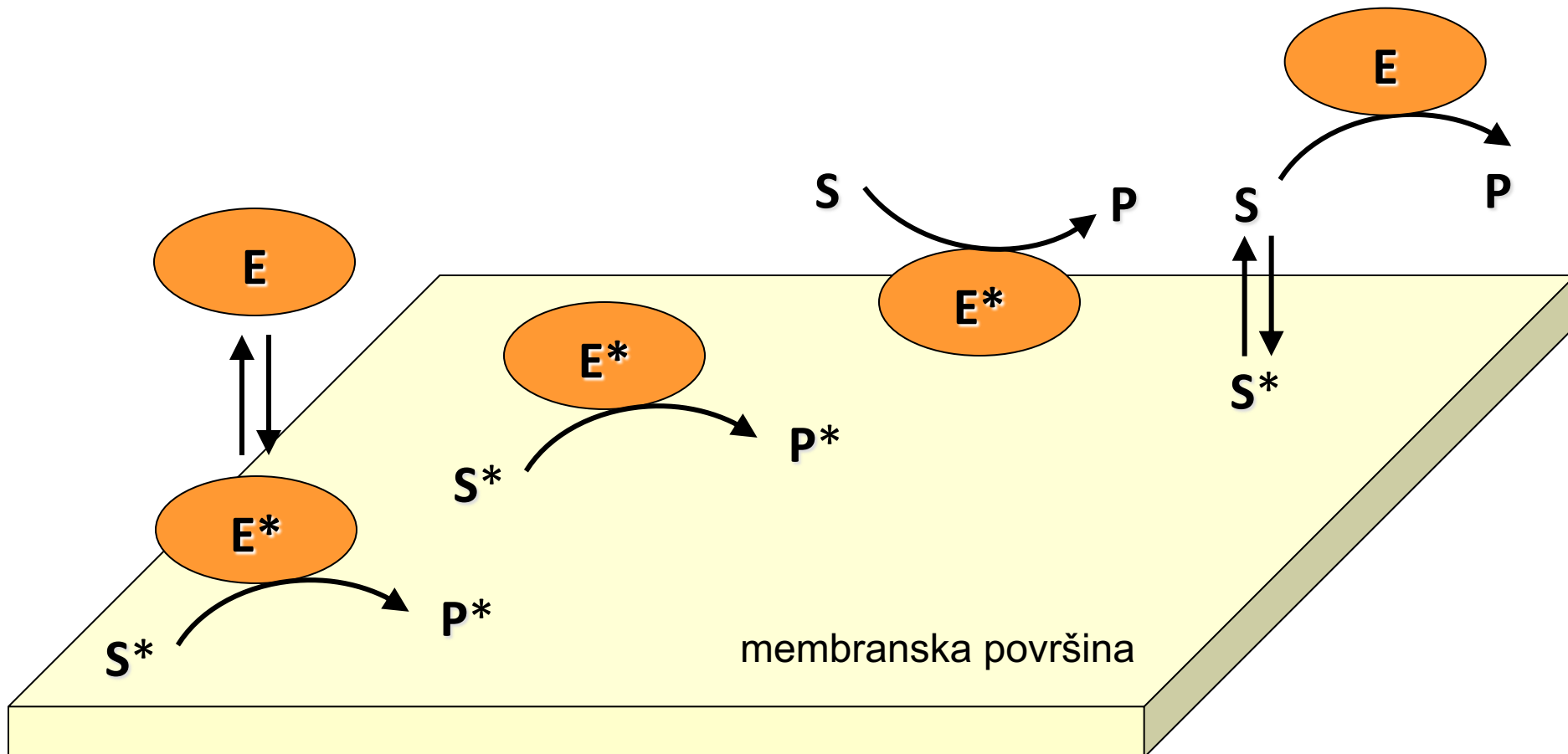


Življenska pot tipične maščobne kisline – VRSTE LIPIDOV

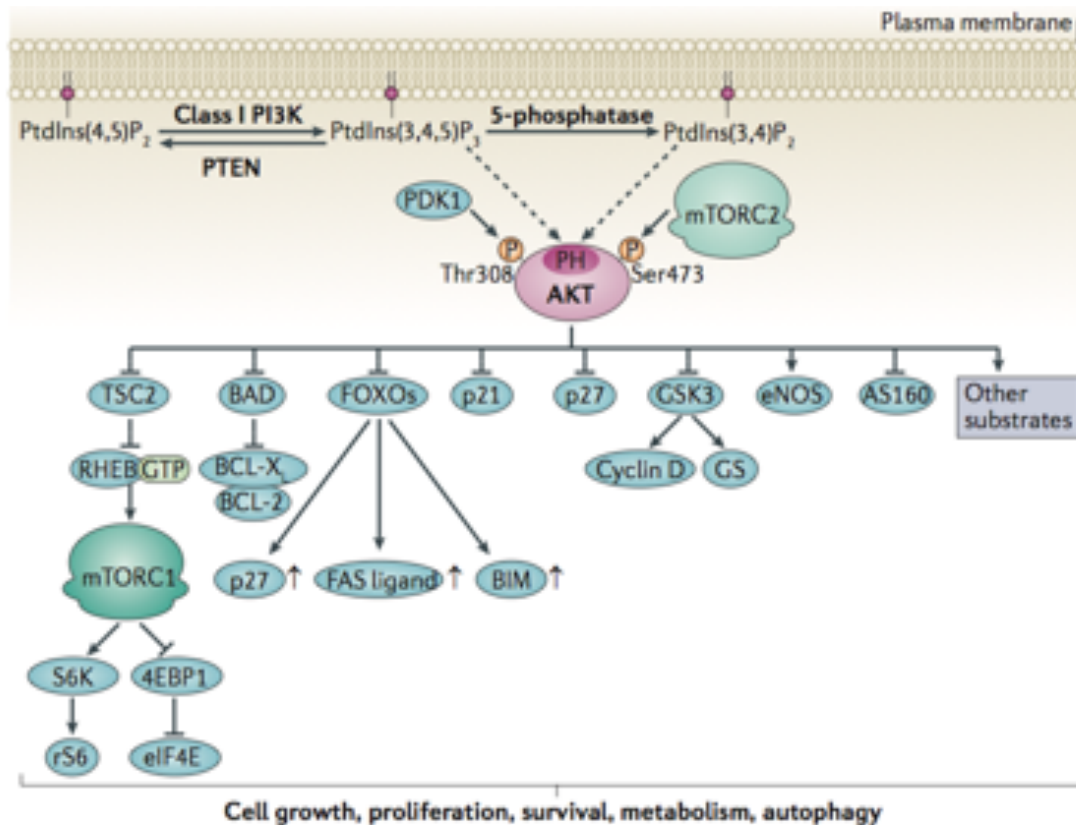


Predmet medfazne encimatike ("Interfacial Enzymology")

Encimi, ki delujejo na membranah (in drugih agregiranih substratih) dostopajo do substrata **na fazni meji** med vodnim in lipidnim okoljem

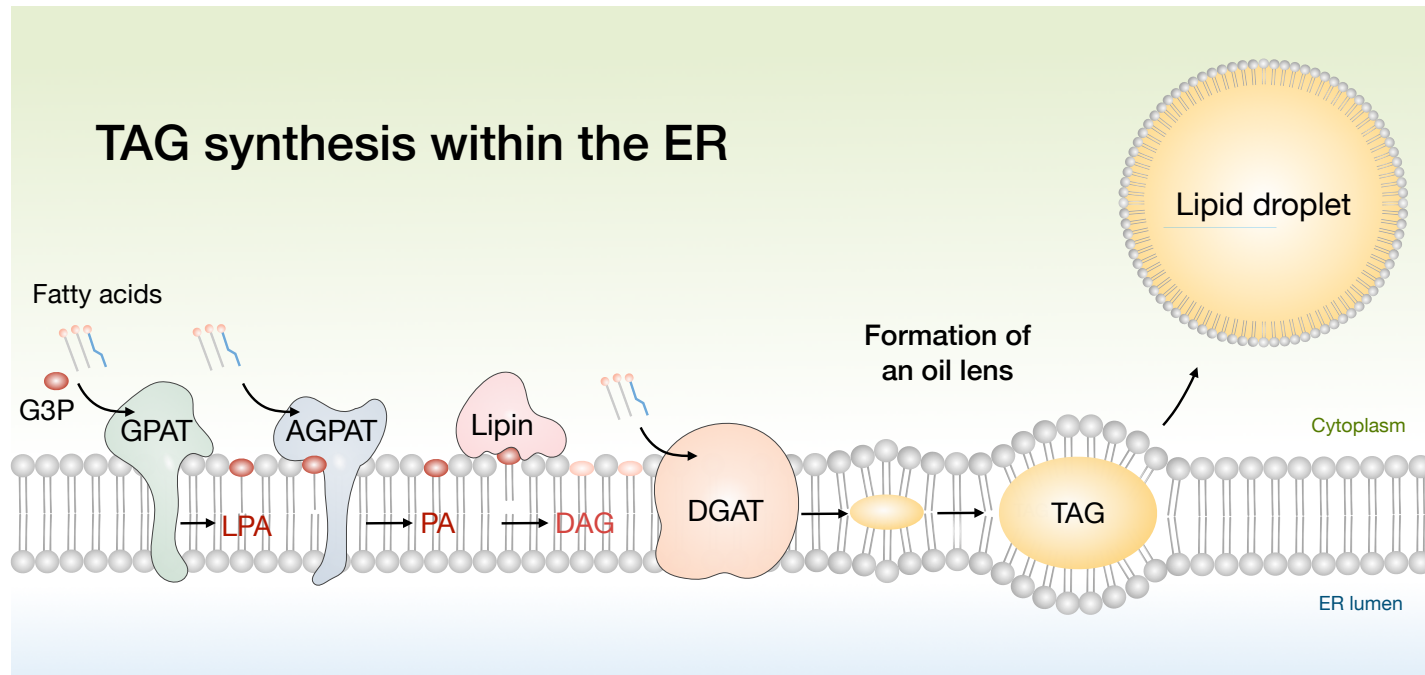


Medfazni encimi so vpleteni v lipidni metabolizem in celično signalizacijo



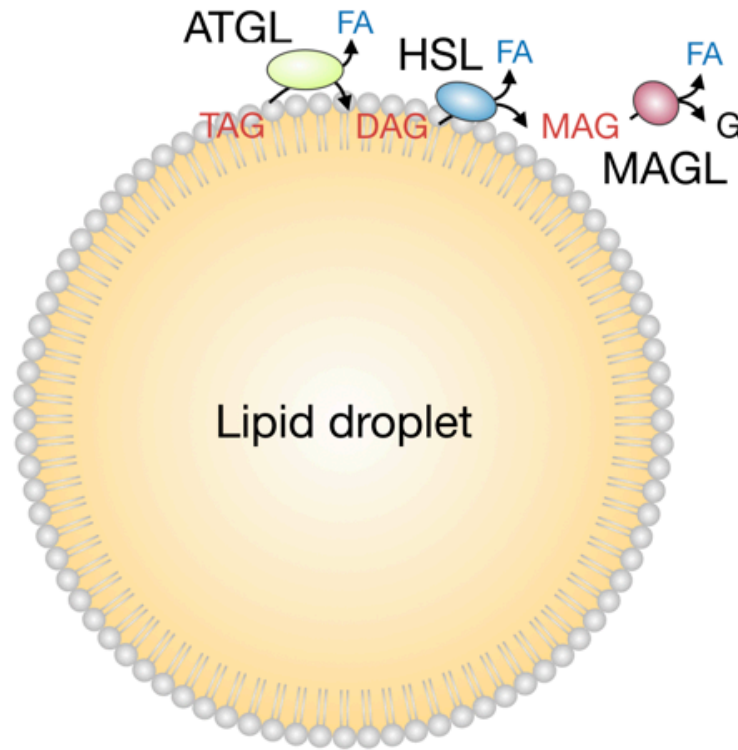
PI3-kinaze

Medfazni encimi so vpleteni v lipidni metabolizem in celično signalizacijo



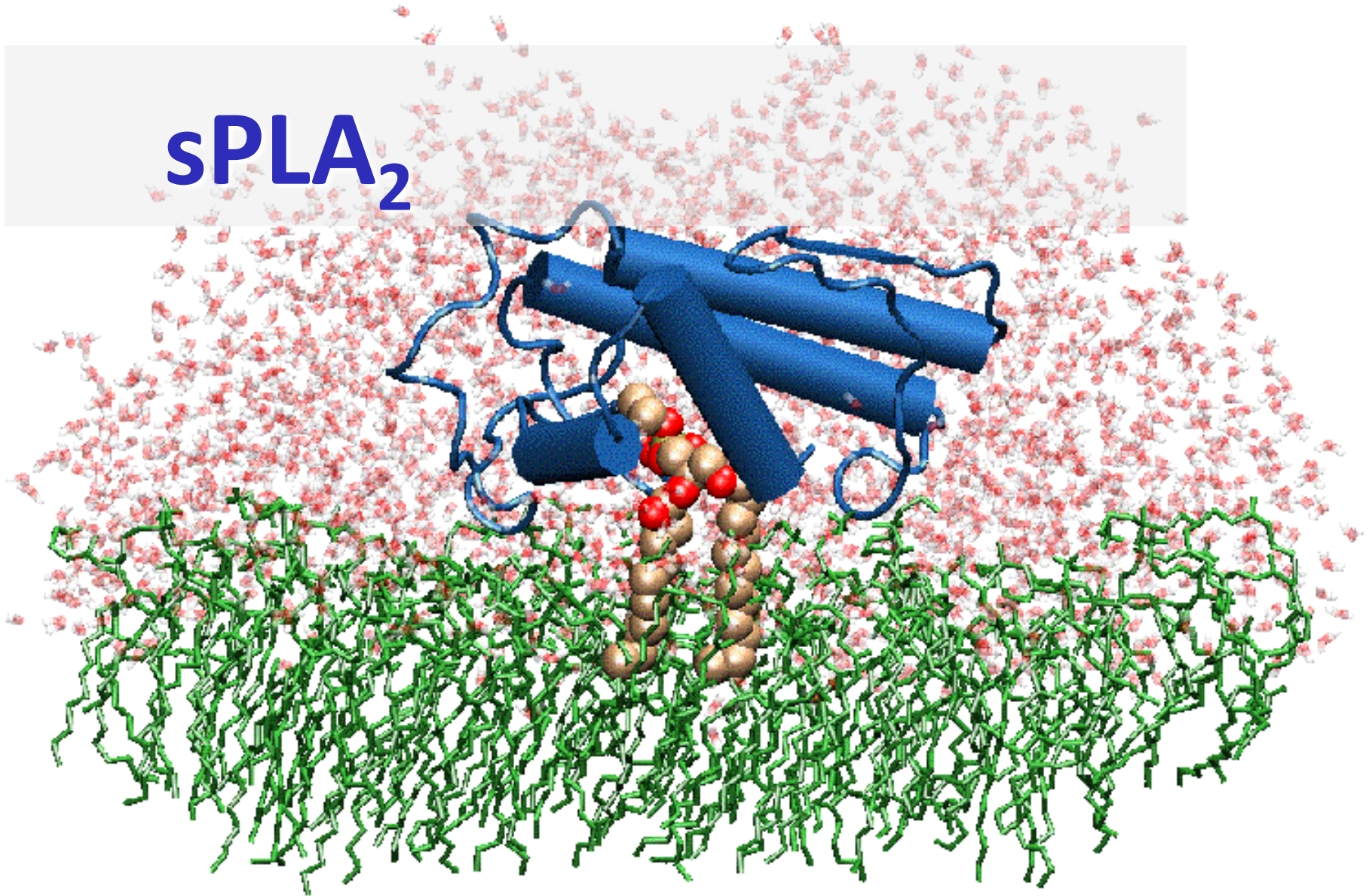
G3P, glicerol-3-fosfat; GPAT, glicerol-3-fosfat aciltransferaza; fosfatidat-fosfataza oz. lipin, DGAT1, diacilglicerol aciltransferaza 1; TAG, triacilglicerol

Medfazni encimi so vpleteni v lipidni metabolizem in celično signalizacijo

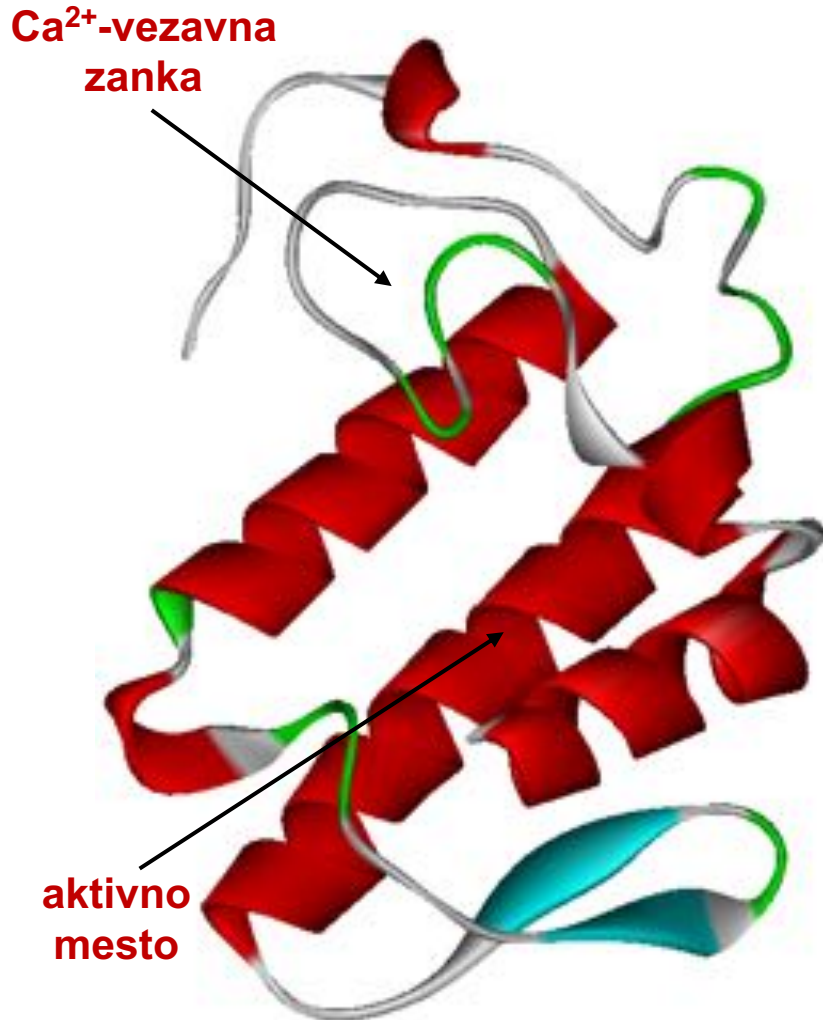


Lipaze (ATGL, HSL), ne pa tudi MAGL

sPLA₂



Zakaj so sekretorne fosfolipaze A₂ (sPLA₂) najbolj raziskani medfazni encimi?

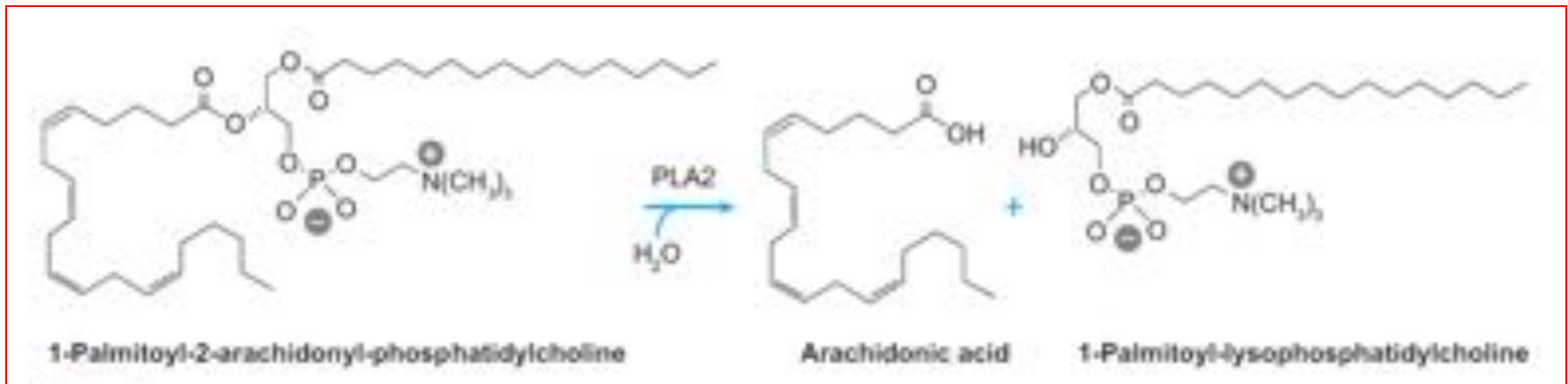


Aktivno mesto vsebuje diado Asp–His.
Ca²⁺ je nujen za encimsko aktivnost.

- majhni: 13–18 kDa
- stabilni: 5–8 disulfidnih mostičkov
- lahka dostopnost (izolacija iz kačjih in čebeljih strupov, prebavnih in vnetnih tekočin)
- majhna molekula, ogromno funkcij – zanimivi so!

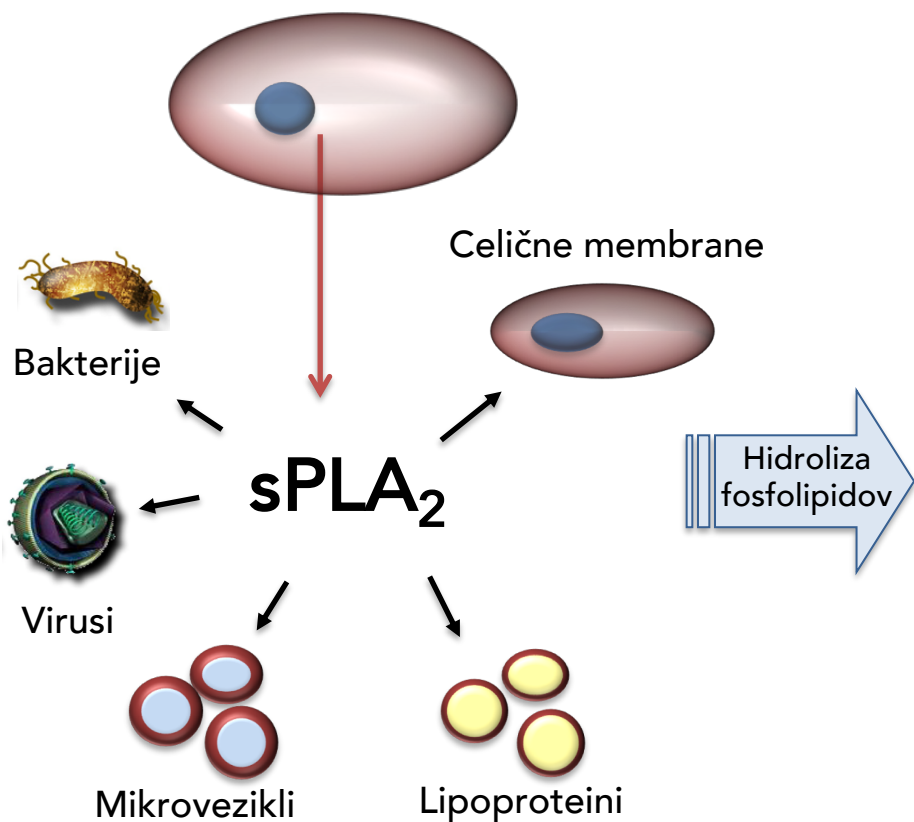
Zakaj so sPLA₂ najbolj raziskani medfazni encimi?

FOSFOLIPID → MAŠČOBNA KISLINA + LIZOFOSFOLIPID



Vloga sPLA₂ pri človeku

VELIKA IZBIRA SUBSTRATOV



ŠTEVILNI PRODUKTI

Maščobne kisline

arahidonska
oleinska, linolejska
 ω -3 polinenasičene
 ω -6 polinenasičene

Lizofosfolipidi

LPC, LPE, LPS, ...
⇒ LPA

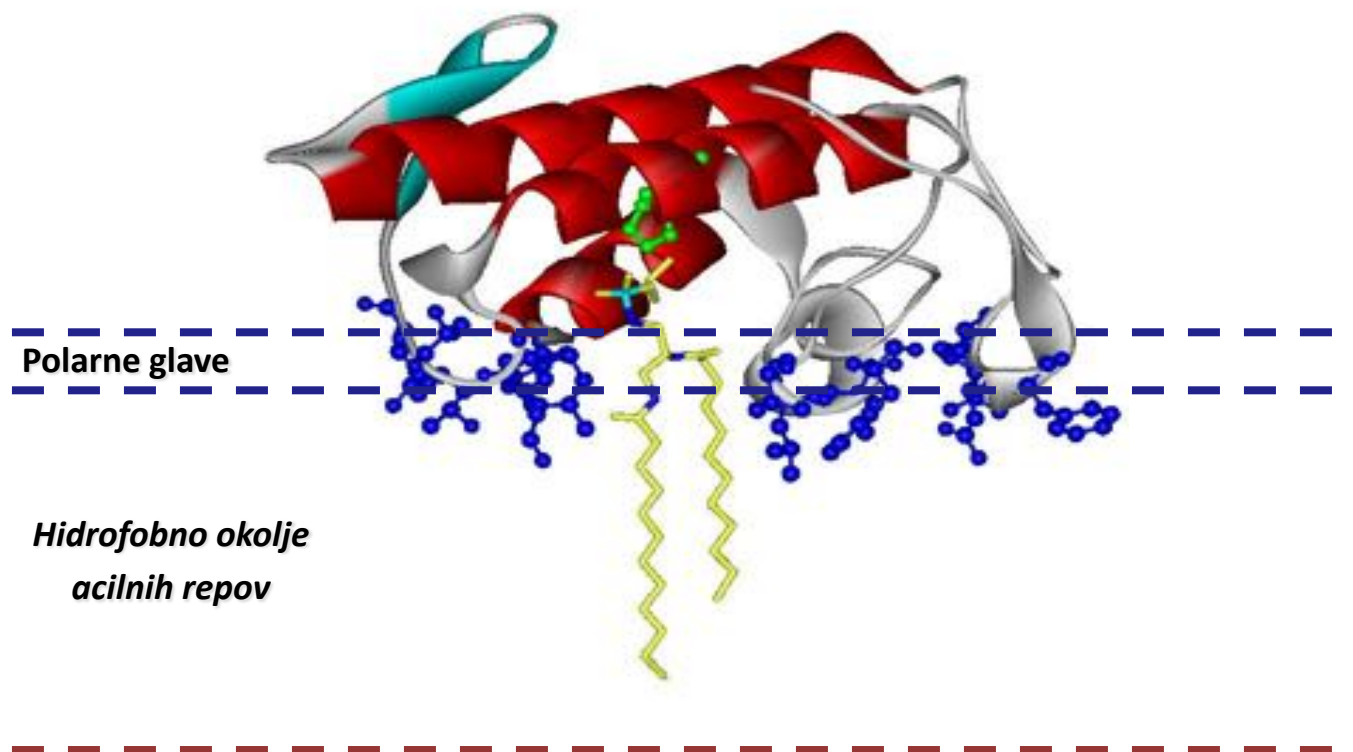
RAZLIČNE VLOGE

Imunski sistem
Vnetje
Astma
Ateroskleroza
Transport lipidov
Reprodukcija
Rak

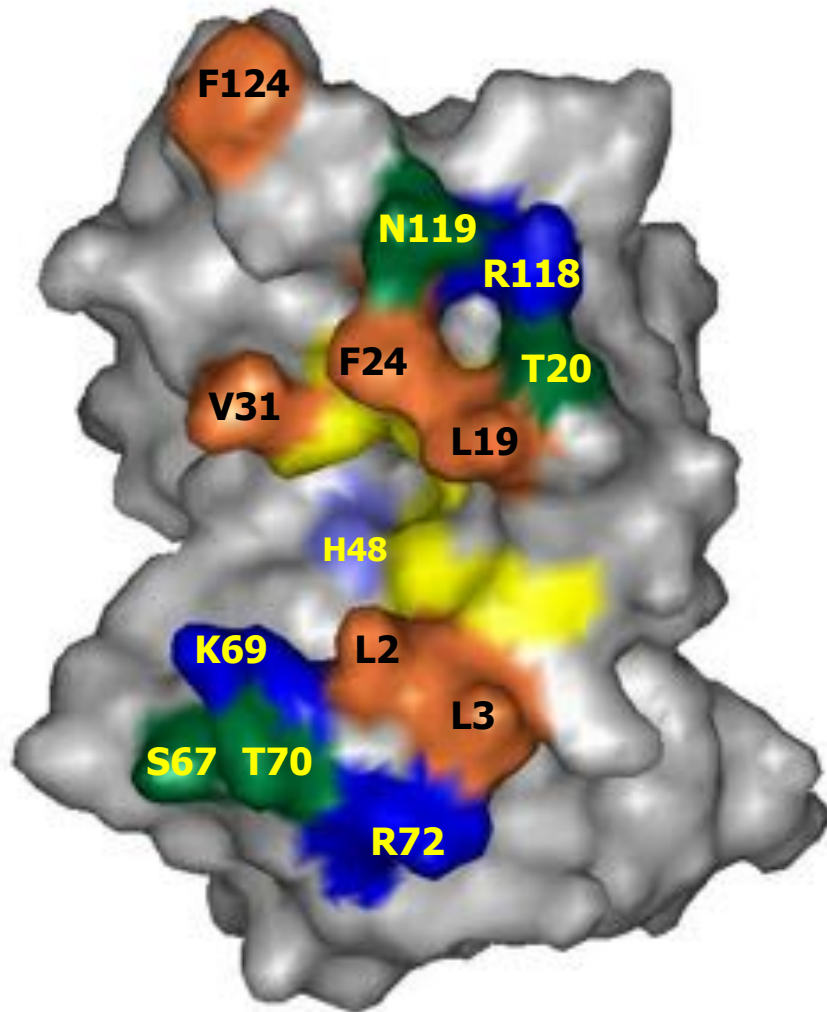
Stična vezavna površina (“Interfacial Binding Surface”, IBS)

Skupina ostankov, ki interagira z membrano in odloča o “specifičnosti” ali afiniteti za vezavo na membrano

- ujemanje med fizikalno-kemijskimi lastnostmi **membranske površine** in zgradbo **IBS-a**
- večina sPLA₂ se zelo dobro veže na negativno nabite (PG, PS, PM), a veliko slabše na zwitterionske (elektronevtralne) membranske površine (PC, PE)

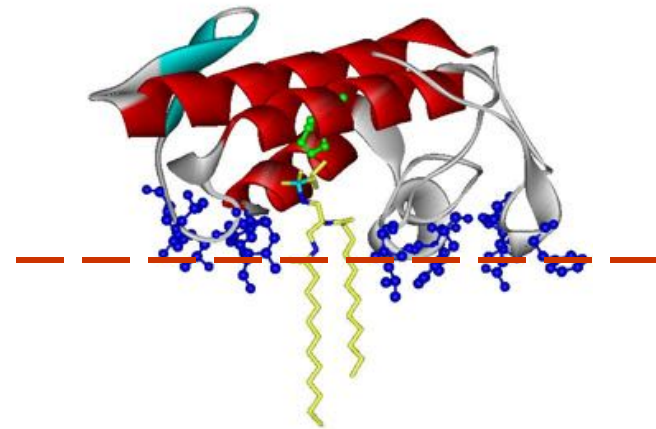


Različne sPLA₂ imajo različno zgradbo IBS-ja in s tem različno afiniteto do membran

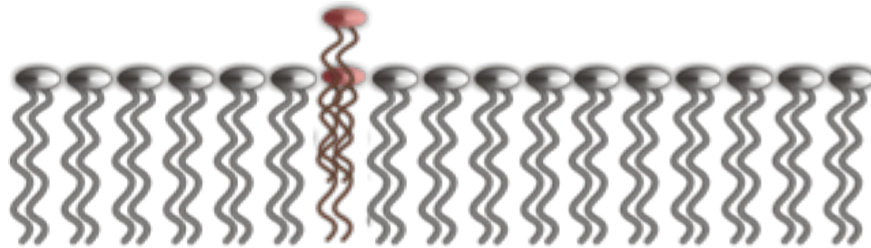
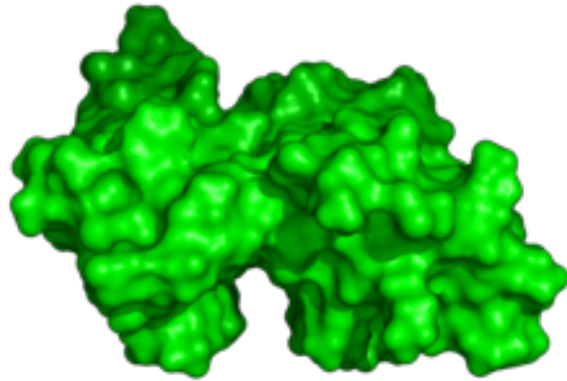


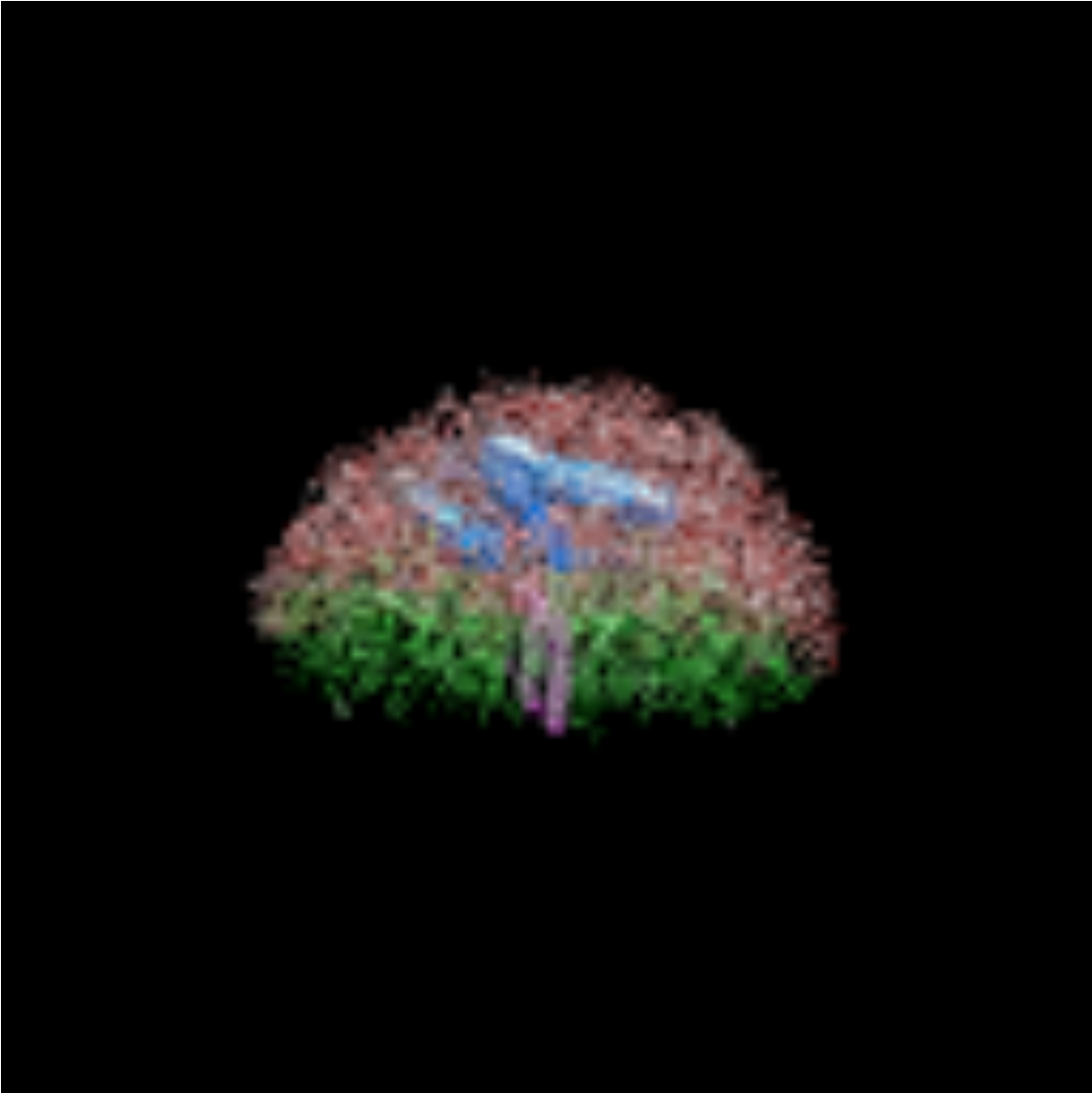
Interakcije z membrano omogoča:

- centralni obroč hidrofobnih in aromatskih ostankov
- polarni, bazični, redkeje kisli ostanki na robovih

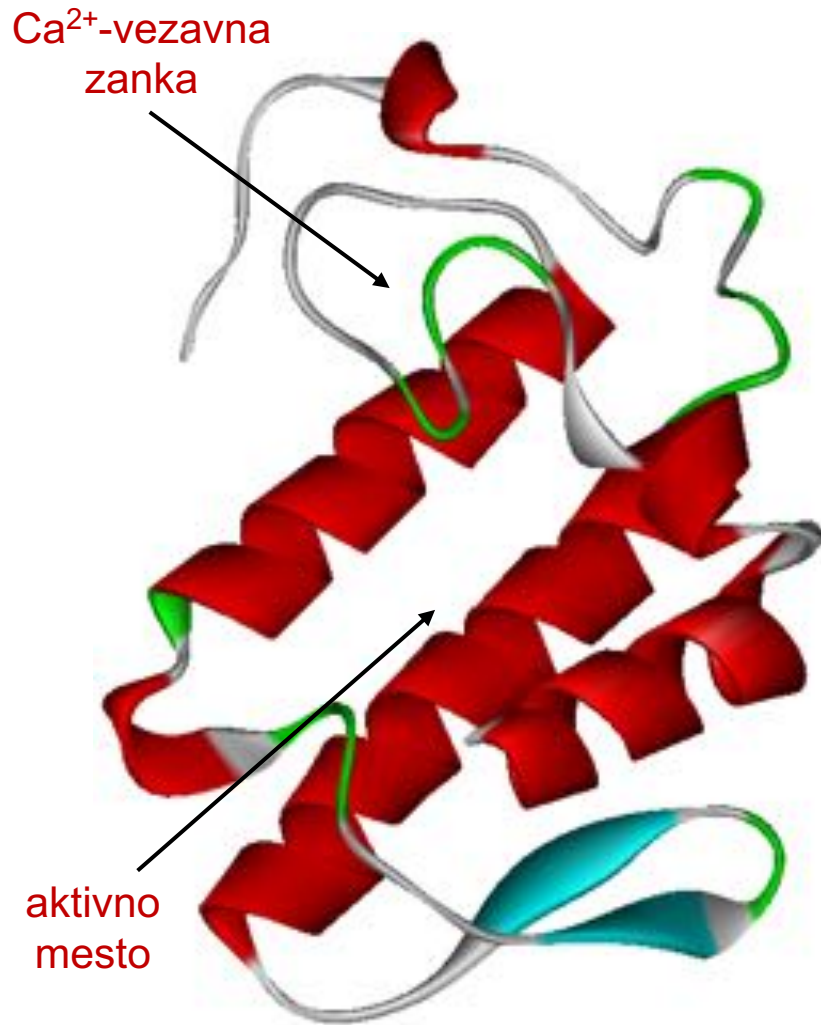


Vezava na površino je ločen proces od vezave
substratne molekule v aktivno mesto

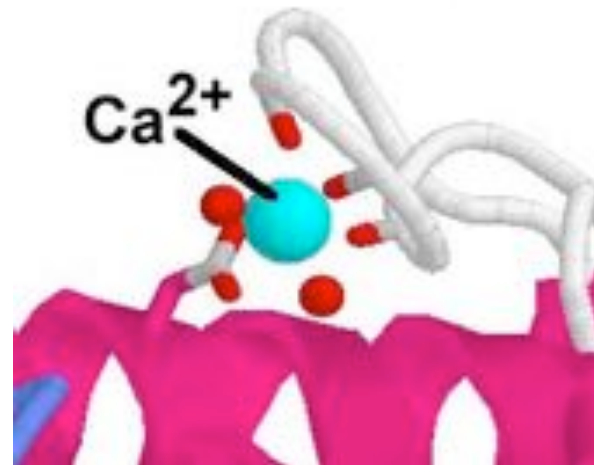




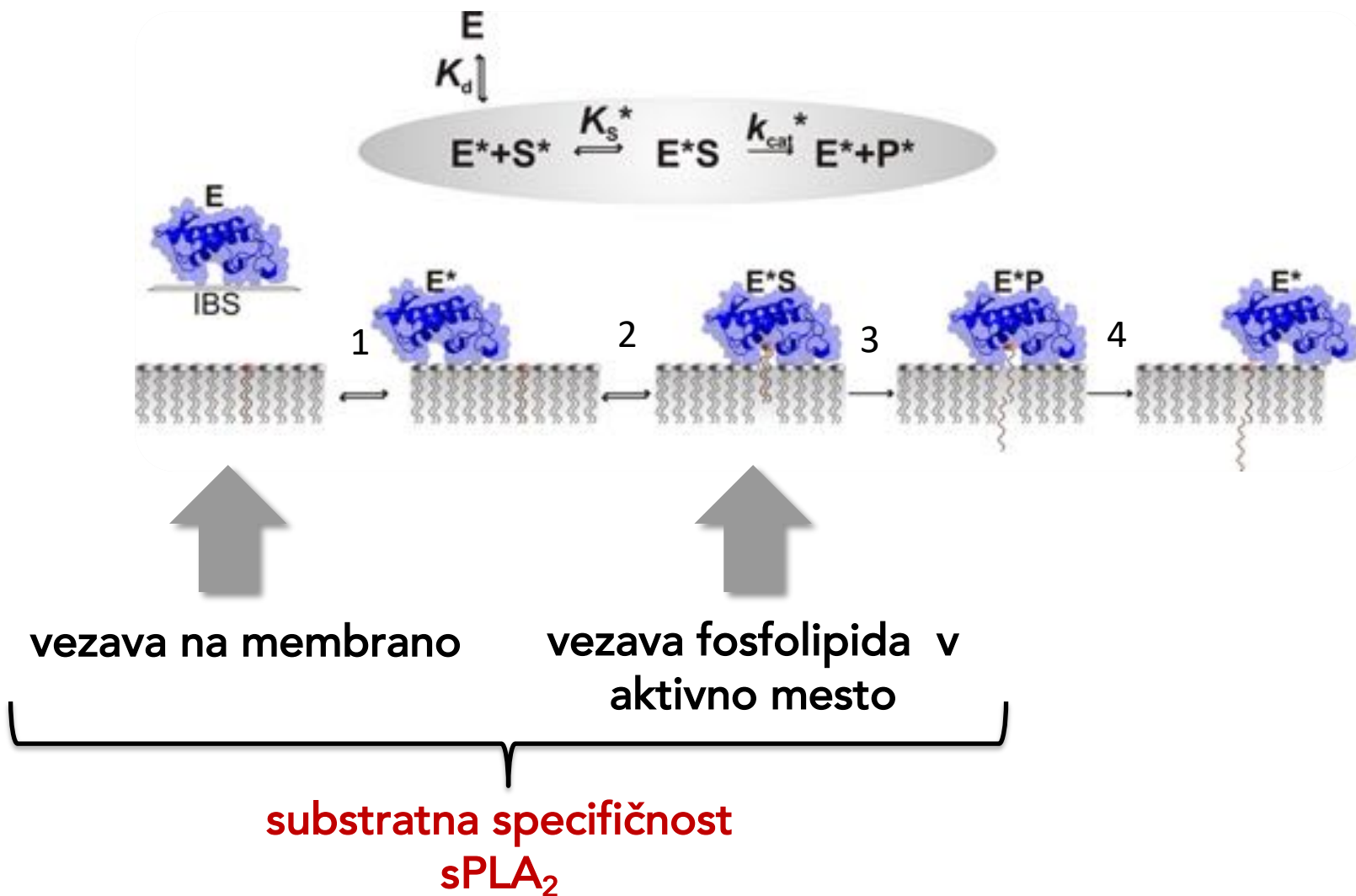
Ca²⁺-ion ni potreben za vezavo sPLA₂ na membrano



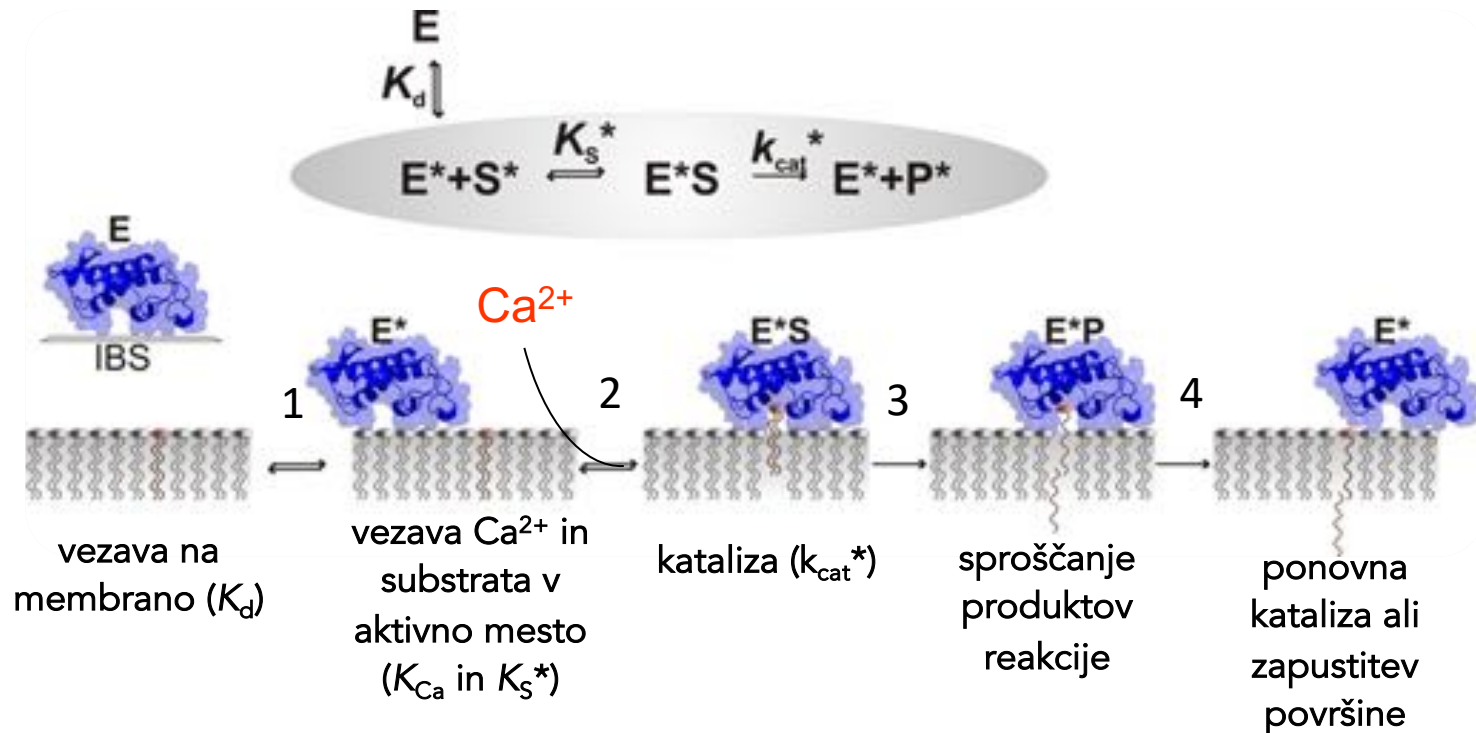
- Kalcijev ion je nujno potreben za:
- vezavo fosfolipidne molekule v aktivno mesto
 - katalitsko reakcijo



IBS in aktivno mesto sPLA₂ sta strukturno in funkcionalno ločena



Pogoji za encimsko delovanje sPLA₂



Shematski prikaz poenostavljenega kinetskega modela, ki opisuje delovanje sPLA₂ (in v principu tudi drugih medfaznih encimov) na membranski površini.

Fiziološka vloga posamezne sPLA₂ je določena z njeno afiniteto za vezavo na membrane

Encima sPLA₂ iz skupin X (hGX) in IIA (hGIIA) sta strukturno zelo podobna

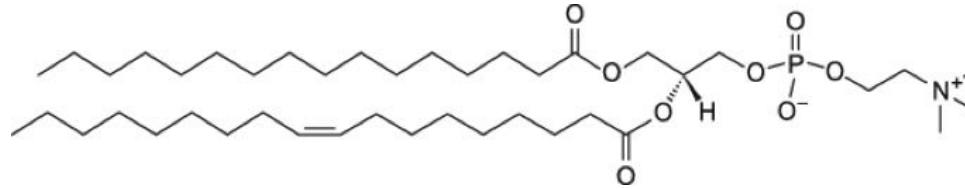
Oba encima imata visoko encimsko aktivnost *in vitro*

hGX deluje na sesalske celice v kulturi, hGIIA pa ne

hGIIA pobije bakterijske celice, hGX pa ne

Kako to, da imata različne celične in (pato)fiziološke vloge?

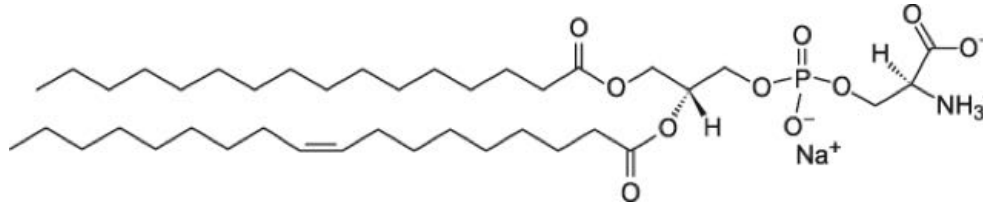
POPC
(zwitterionski)
(+/-)



1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin

16:0-18:1 PC

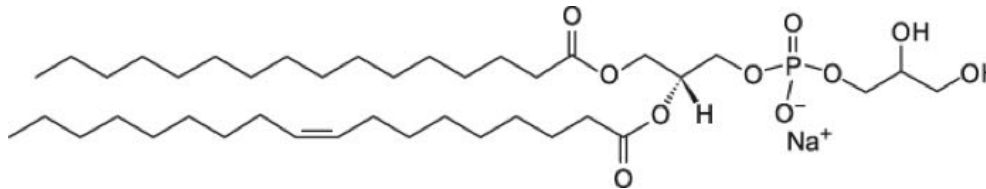
POPS
(anionski)
(-)



1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoserin

16:0-18:1 PS

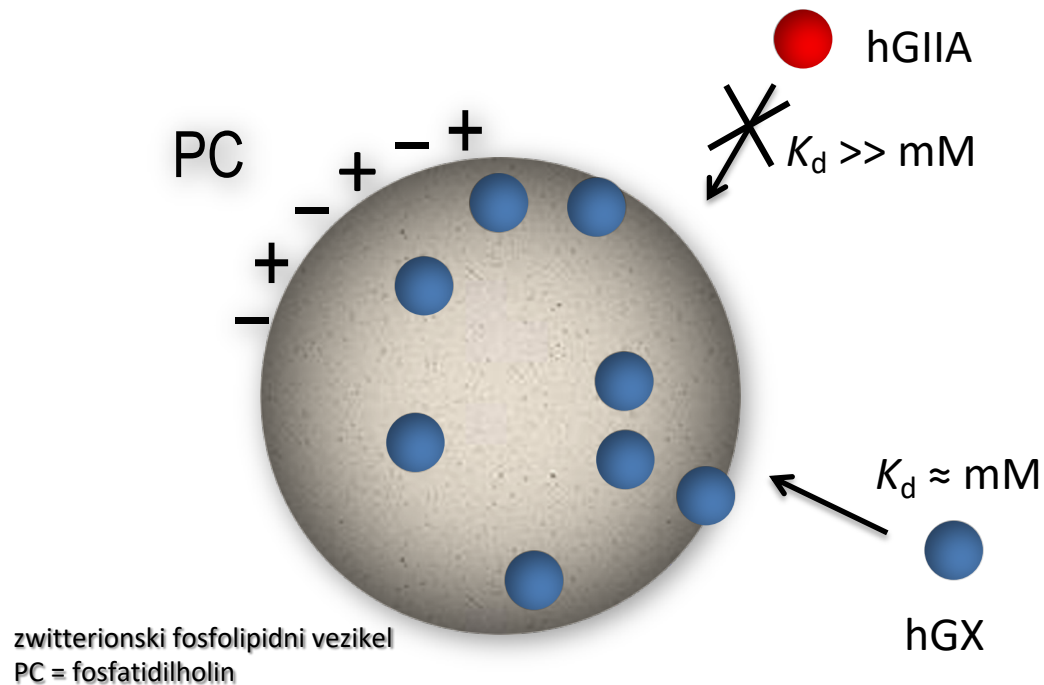
POPG
(anionski)
(-)



1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol

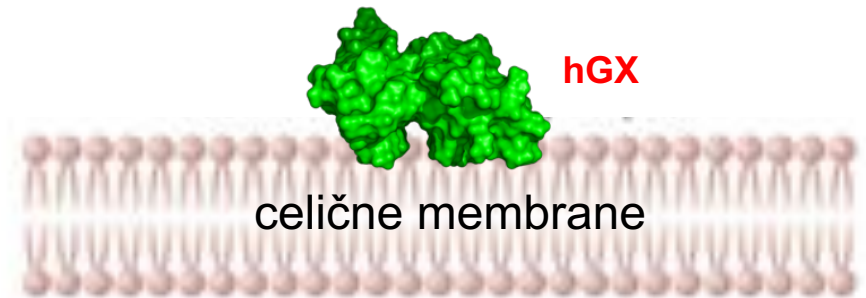
16:0-18:1 PG

hGX se veže in učinkovito deluje na veziklih PC in na plazemski membrani evkariontskih celic



hGX sproža signalizacijo preko metabolitov arahidonske kisline – eikozanoidov

- hGX sPLA₂ ima visoko afiniteto do zwitterionskih membran
- hGX lahko hidrolizira plazemsko membrano celic in sprošča velike količine arahidonske kisline (AK)



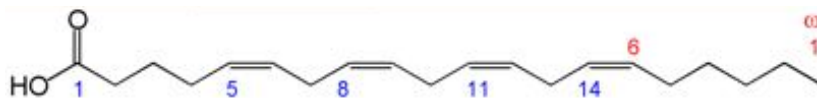
↓
ARAHIDONSKA KISLINA



EIKOZANOIDI

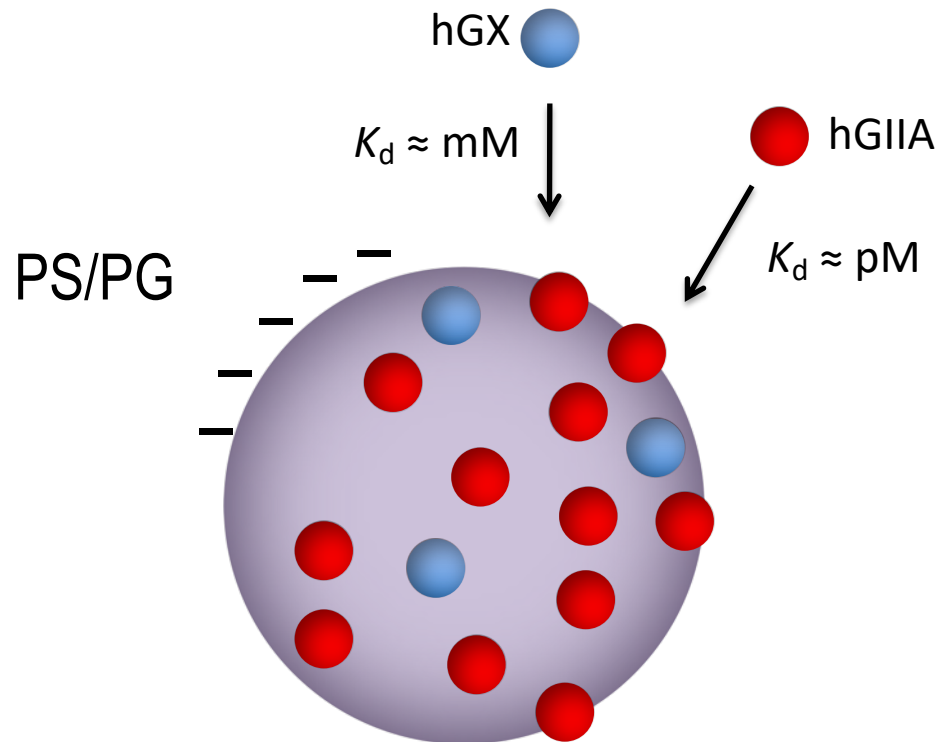


Vnetja
Alergije
Avtoimunske bolezni
Rak



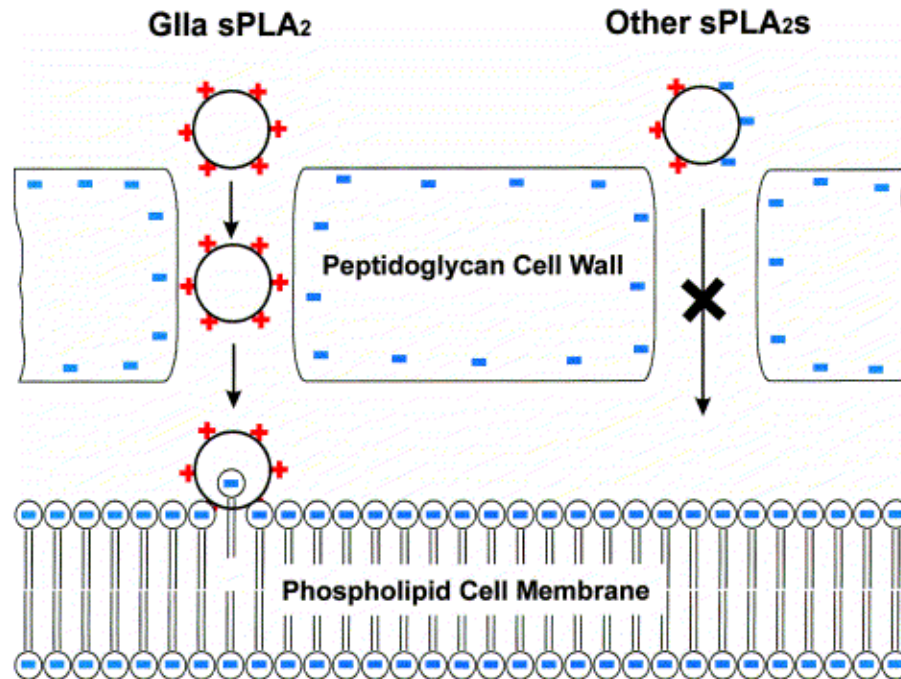
arahidonska kislina (AK)

hGIIA sPLA₂ se zelo dobro veže in hidrolizira anionske membranske površine



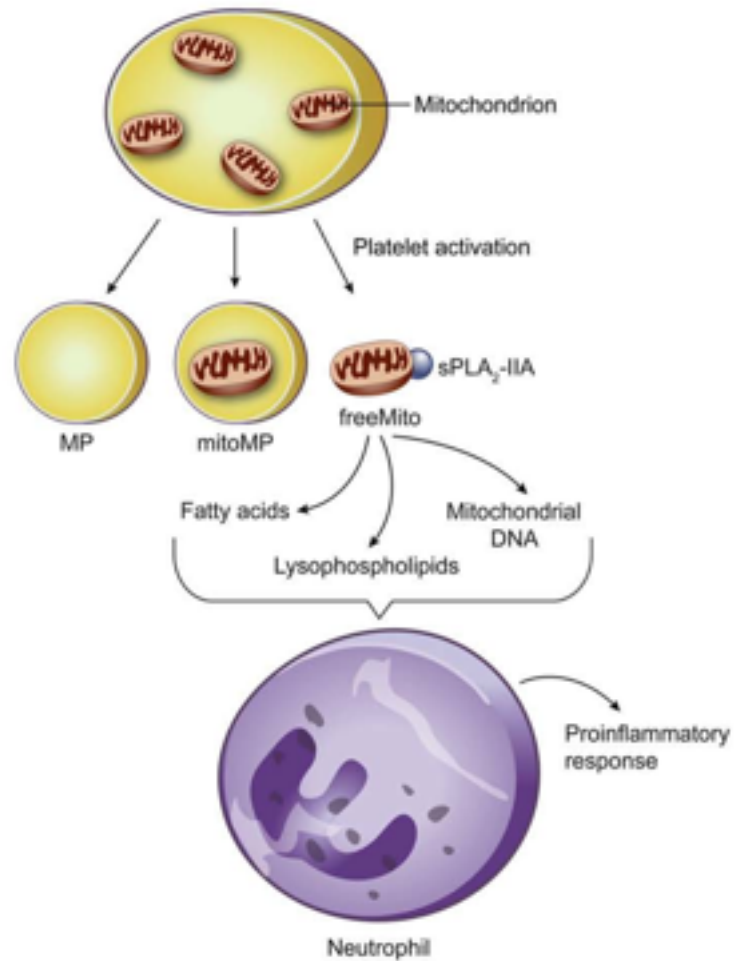
negativno nabiti fosfolipidni vezikel
PS/PG = fosfatidilserin/glicerol

hGIIA sPLA₂ se ne veže na površino evkariontskih celic,
zelo dobro pa razgrajuje bakterijske membrane



Antibakterijsko delovanje sPLA₂ iz skupine IIA!

...in membrane mitochondrijev

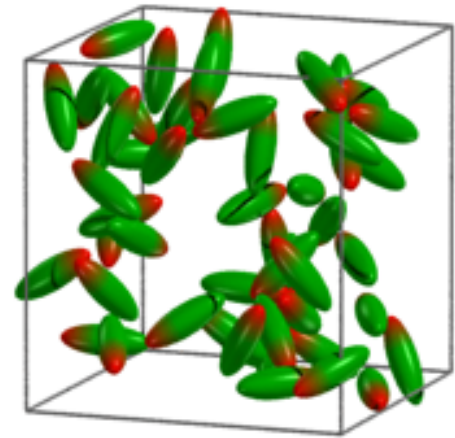


A 3D molecular model showing a large, complex protein structure (the enzyme) interacting with a lipid bilayer. The protein is composed of numerous atoms represented by spheres in various colors (grey, red, blue, green). The lipid bilayer is shown as a layer of purple spheres. The text is overlaid on a semi-transparent blue box in the upper left quadrant of the image.

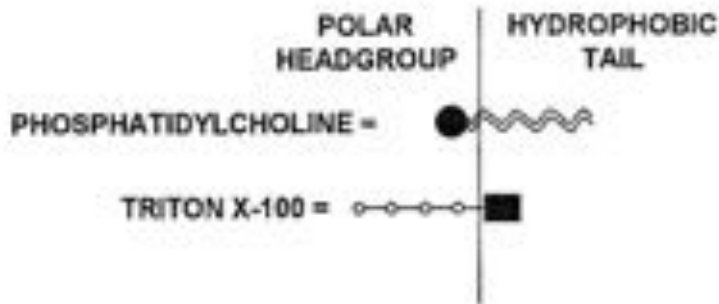
Kako so raziskovalci prišli do ugotovitev o encimskem mehanizmu sPLA₂?

Strukture lipidnih agregatov *in vitro*

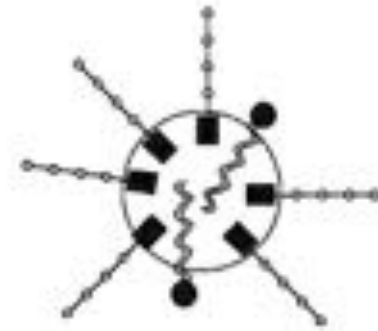
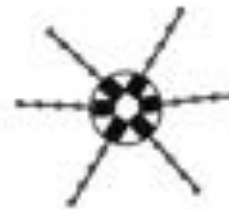
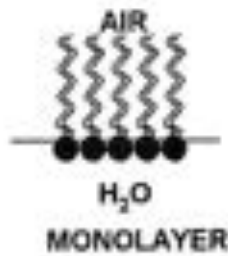
- Amfipatske molekule => specifična organizacija/agregacija molekul v vodnem okolju
- Na strukturo agregatov vplivajo:
 - Dolžina in (ne)nasičenost verig CH
 - Struktura polarne glave
 - Metoda disperzije
 - Koncentracija soli
 - Temperatura
 - Prisotnost drugih amfipatskih molekul



Strukture (fosfo)lipidnih agregatov v vodi – membranski modeli *in vitro*



Detergenti, **mašč. kisline**, **lizofosfolipidi** tvorijo micele nad svojo CMC (v μM območju)



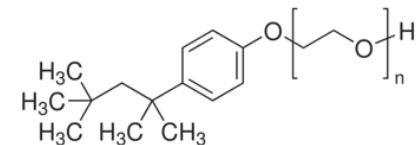
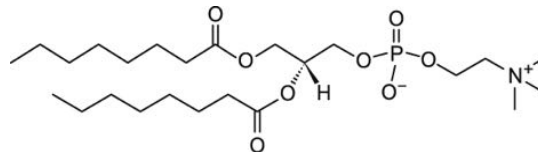
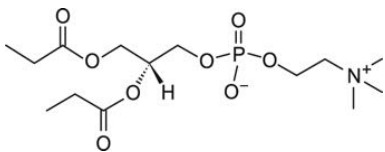
> 60 Å

~ 100 Å

~ 100 Å

< 4 CH₂-skupin

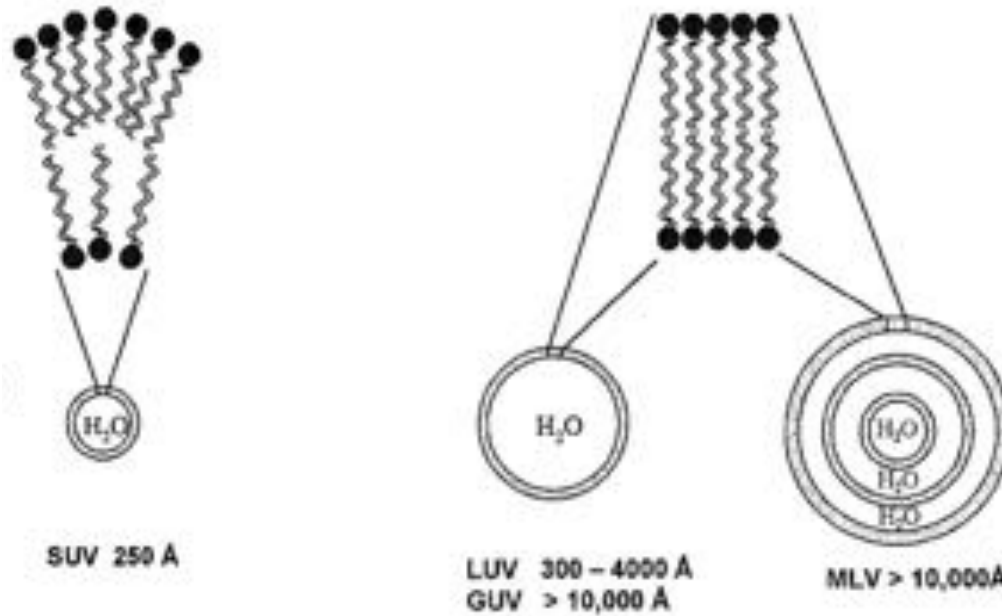
< 10 CH₂-skupin



Triton X-100

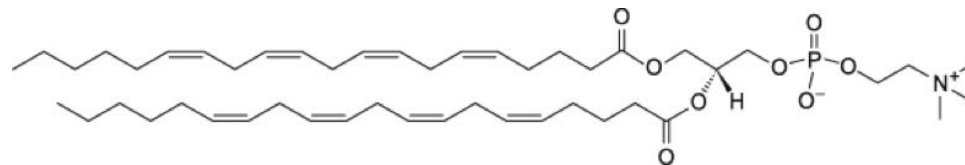
Vezikli (liposomi)

- SUV, LUV, GUV – "Small/Large/Giant unilamellar vesicles" (enolamelarni vezikli)
- MLV – multilamelarni vezikli

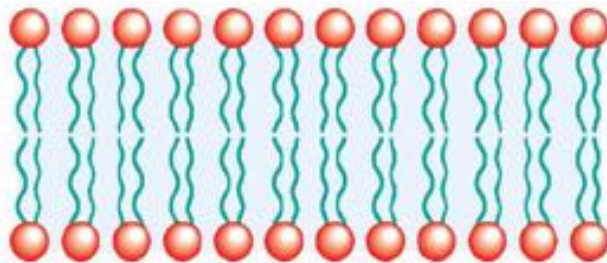


CMC < 1 pM!

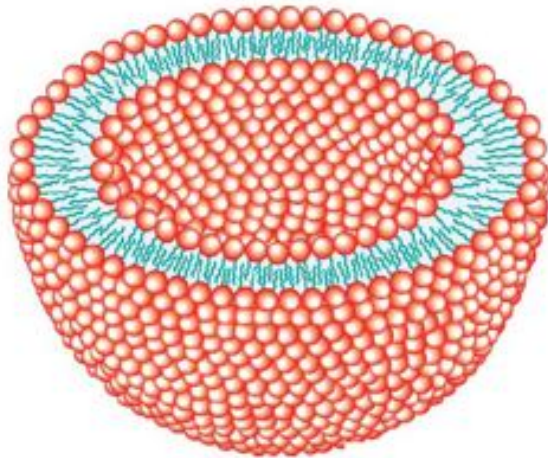
> 10 CH₂-skupin



Samopopravljanje membran in tvorba veziklov



(a)



(b)

ENERGETICALLY UNFAVORABLE



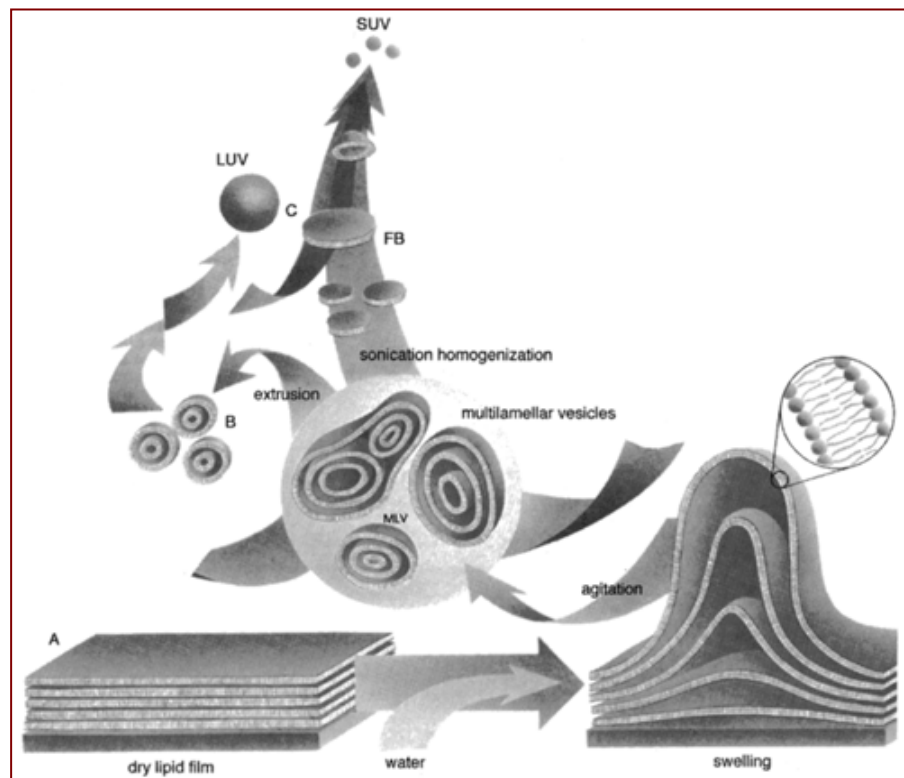
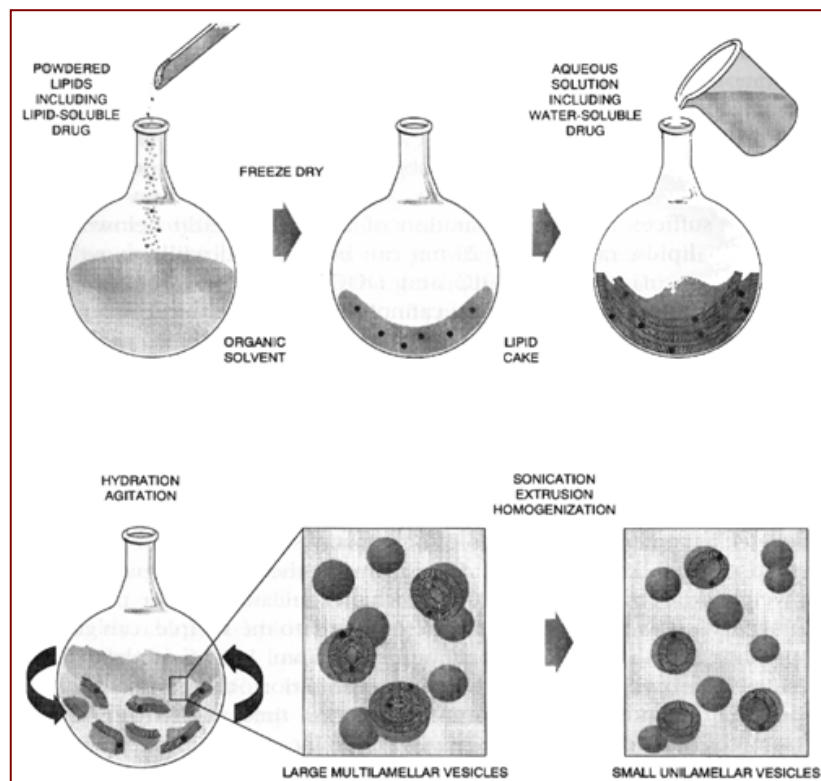
planar phospholipid bilayer
with edges exposed to water



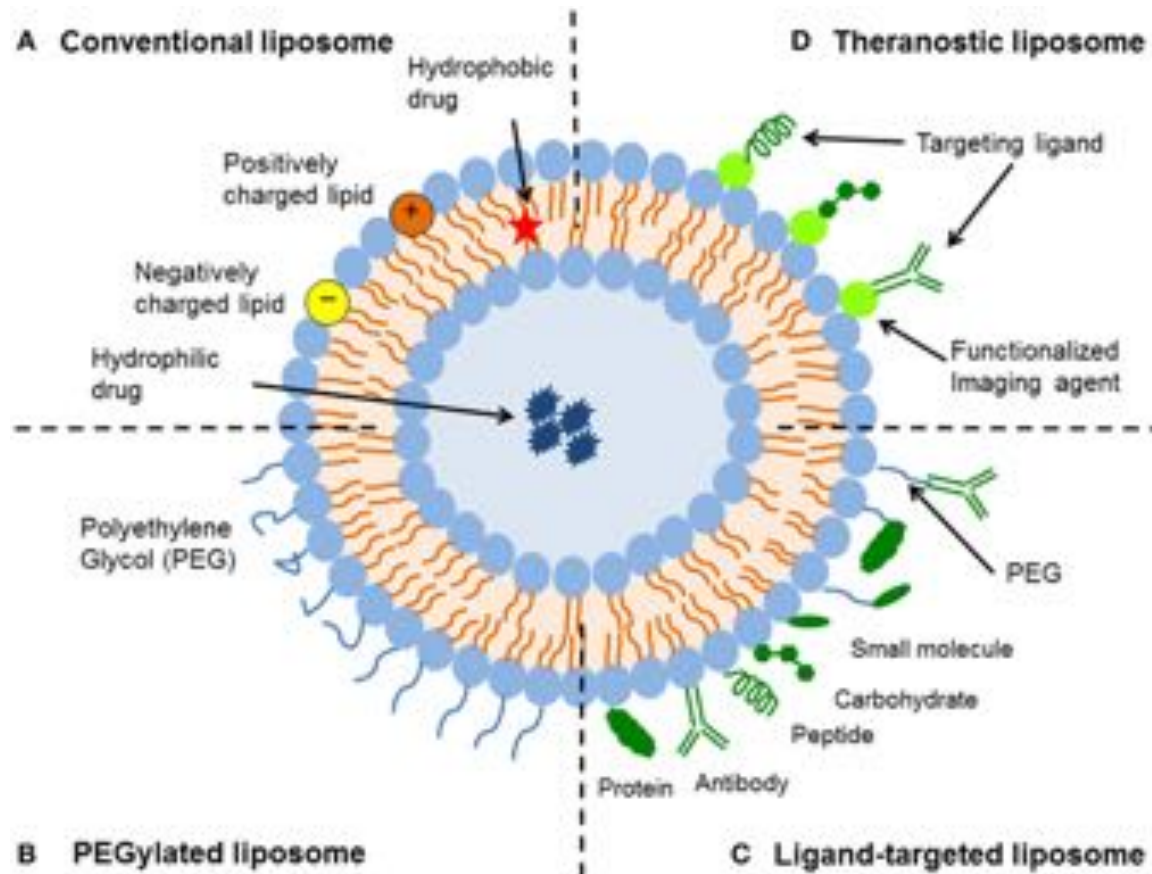
sealed compartment
formed by phospholipid
bilayer

ENERGETICALLY FAVORABLE

Priprava fosfolipidnih veziklov



Vezikli kot sistemi za dostavo zdravil



Ekstruder za pripravo veziklov



LipoFast Extruder, Avestin, Canada

MLV potiskamo skozi polikarbonatne filtre z izbranim premerom por (10–1000 nm, tipično 100 nm)

Zakaj je medfazna encimatika (bolj) zapletena?

Klasična Michaelis-Mentenova 3D kinetika temelji na:

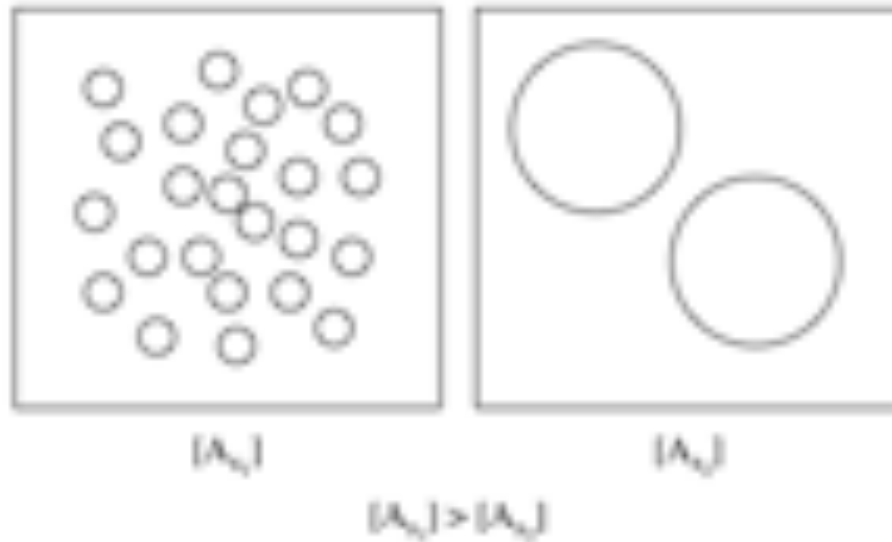
1. V vsakem trenutku so **vse molekule substrata** in produkta **enako dostopne** posamezni encimski molekuli
2. **Vse molekule encima** se v danem trenutku nahajajo v **enakem (mikro)okolju** = vsaka molekula **“vidi”** enako

Zagotovitev teh pogojev pri medfazni encimatiki ni trivialna!

Omejitev dostopnosti substrata na 2D

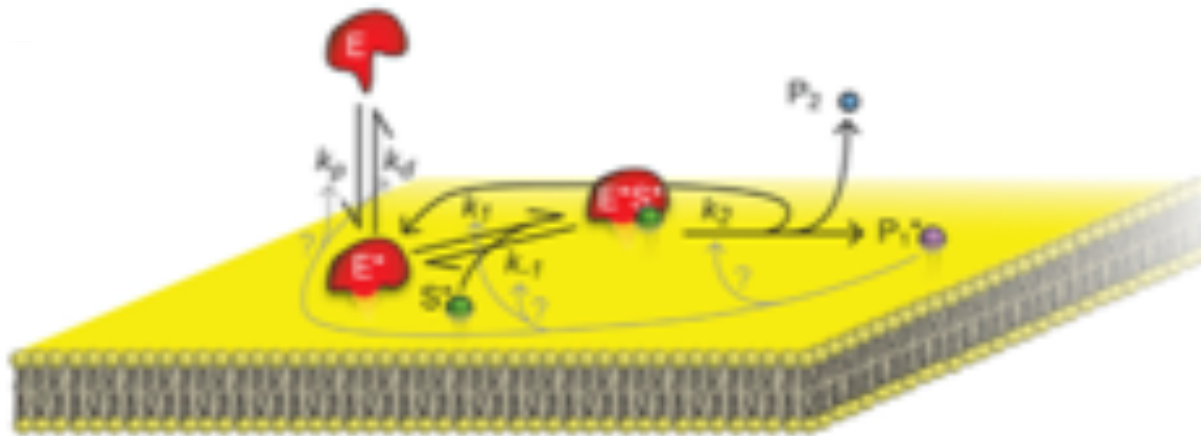
1. Encim se veže na površino v odvisnosti od **koncentracije dostopne vezavne površine (mol/m^2)**, ki jo določa:

- celotna koncentracija substrata
- število, velikost, vrsta (struktura) in dinamika agregatov



Omejitev dostopnosti substrata na 2D

2. Aktivnost **vezanega E*** je odvisna **od površinske koncentracije substrata** in ne od celotne koncentracije **ostalih lipidov na površini** (npr. sfingomielin ni substrat za PLA₂)



Omejitev dostopnosti substrata na 2D

3. **Kakovost agregata** (fizikalno-kemijske lastnosti) vpliva na vse aspekte medfazne kinetike:

Konformacija substrata lahko pospeši ali inhibira vezavo

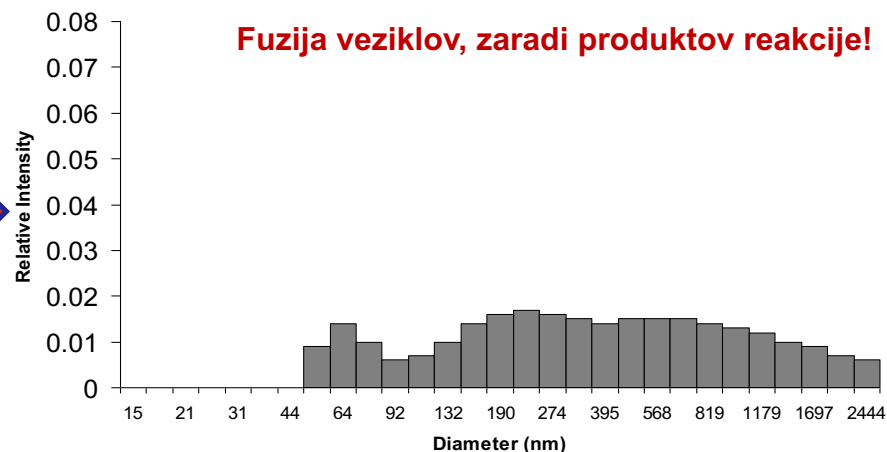
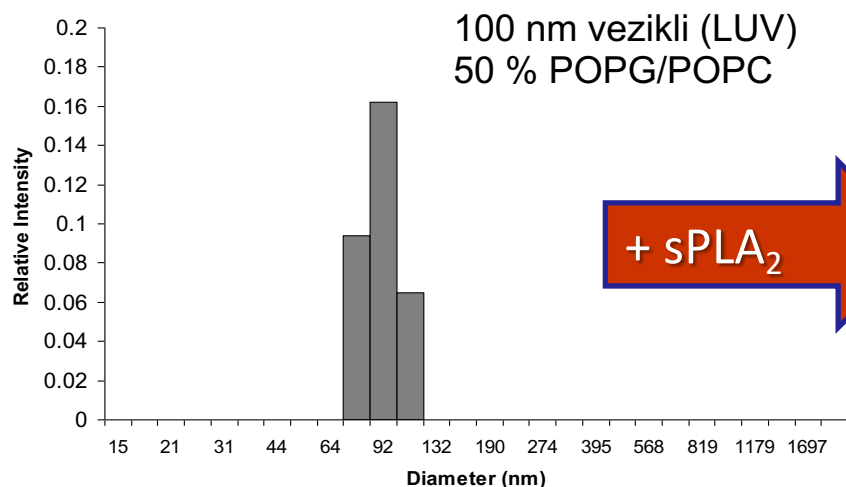
Sosednje molekule lahko **sterično ovirajo** vezavo E^* in S^*

Fazne razlike/prehodi in lateralne domene substratov, produktov, inhibitorjev...

Poškodbe površine

Kopičenje produktov vpliva na strukturo, afiniteto vezave, aktivnost

Struktura in sestava substrata se lahko tekom reakcije spreminjata!



Bistvo razumevanja medfazne kinetike se skriva v poznavanju narave in dinamike agregiranih substratov

Že najbolj enostavni eksperimentalni modeli za sPLA₂ (npr. suspenzija fosfatidilholinskih liposomov v vodi) so zelo kompleksni za kinetsko analizo

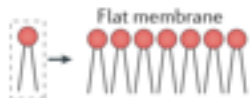
Lipidna sestava vpliva na strukturo membran in biološke procese

a Membrane curvature

Lipid species and spontaneous membrane curvature

Cylindrical

- Phosphatidylcholine
- Phosphatidylserine



Flat membrane

Conical

- Phosphatidylethanolamine
- Phosphatidic acid



Negative curvature

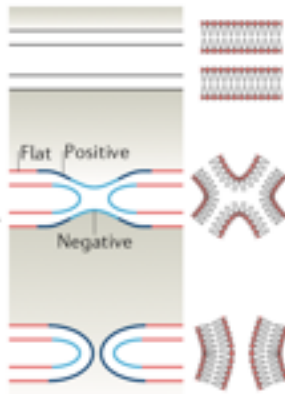
Inverted-conical

- Lyso-GPLs
- Phosphoinositides



Positive curvature

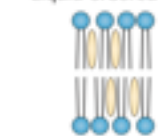
Membrane curvature and fission



b Fluidity and/or phase behaviour

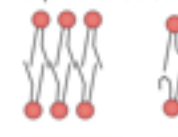
Model membranes

Liquid-ordered



- Saturated lipids
- Cholesterol

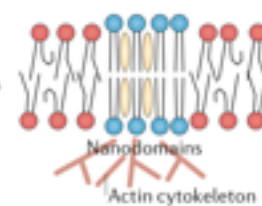
Liquid-disordered



- Mono-unsaturated lipids
- Poly-unsaturated lipids

Cells

- Lateral heterogeneity
- Initiated by proteins and stabilized by lipids
- Driven by lipid immiscibility and phase separation?



c Lipid-lipid interactions

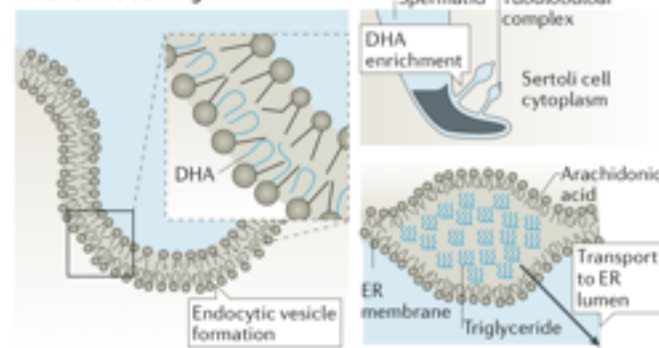
Sphingolipid-cholesterol interaction



C18-saturated PtdSer-cholesterol interaction



d Membrane bending



Zakaj je medfazna encimatika (bolj) zapletena?

Klasična Michaelis-Mentenova 3D kinetika temelji na:

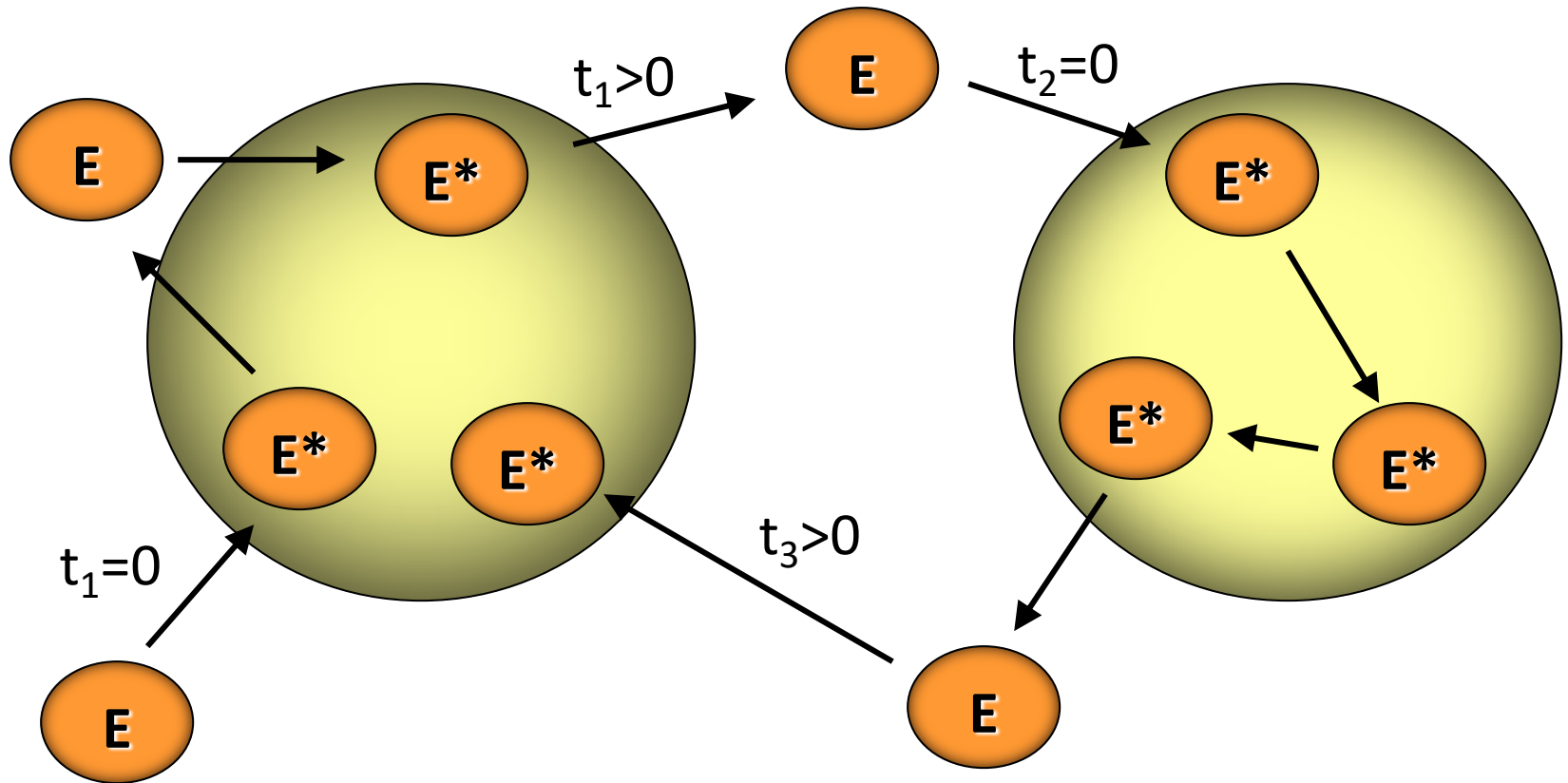
1. V vsakem trenutku so **vse molekule substrata** in produkta **enako dostopne** posamezni encimski molekuli

2. **Vse molekule encima** se v danem trenutku nahajajo v **enakem (mikro)okolju** = vsaka molekula **“vidi”** enako

Zagotovitev teh pogojev pri medfazni encimatiki ni trivialna!

“What you see is what you get!”

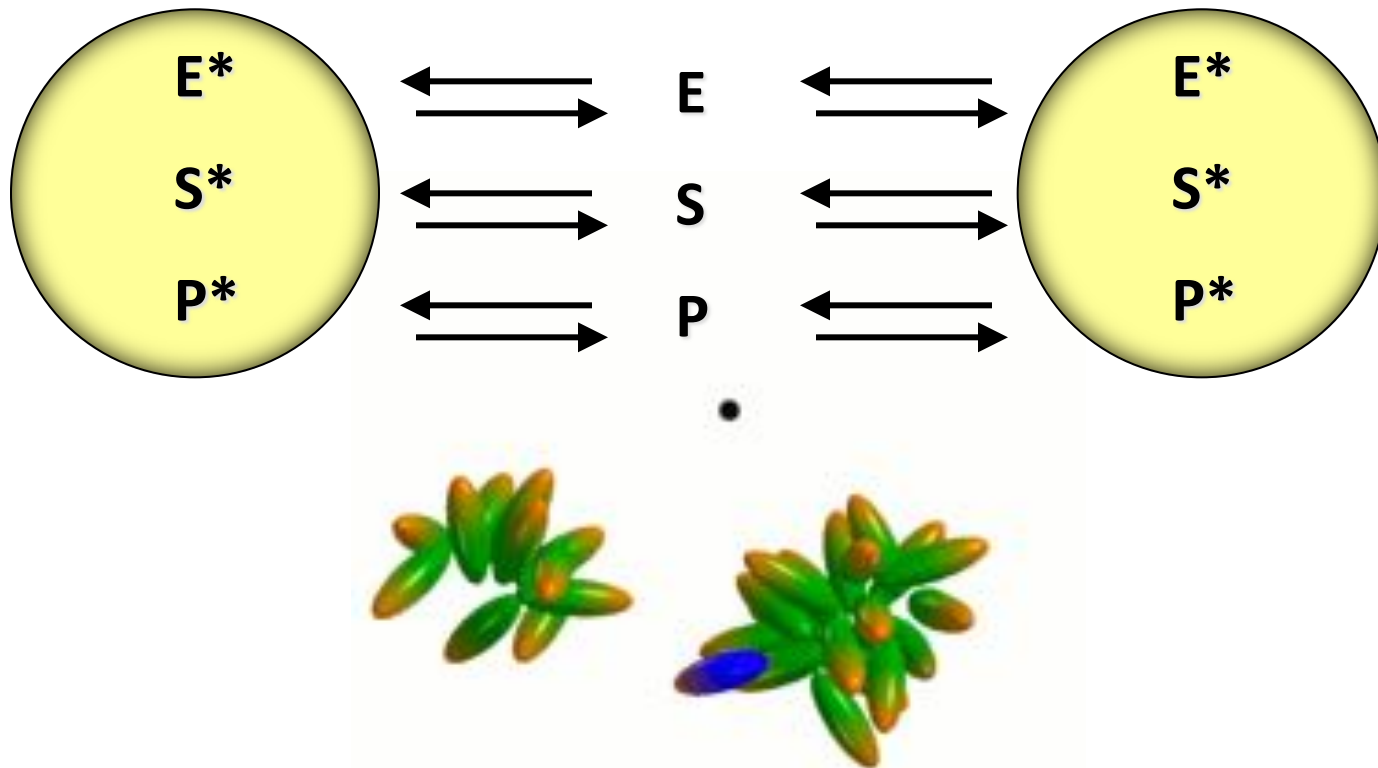
Pri delovanju sPLA₂ na veziklih PC (afiniteta ni visoka, encim lahko skače z vezikla na vezikel) – “*time scrambling* in hopping mode”



=> v vsakem trenutku vsaka molekula encima “vidi” drugačno okolje!

“What you see is what you get!”

Tudi S in P se lahko izmenjujejo med agregati



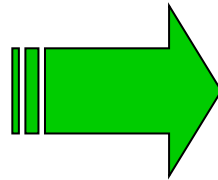
Pasti neoptimalne hitrosti izmenjave S in P

Hitrosti prehajanja S in P med agregati vplivajo na makroskopsko stanje sistema, ki ga eksperimentalno zasledujemo:

Zelo počasna izmenjava molekul:

fosfolipidi v **veziklih** \approx nekaj **h, dni**

kataliza sPLA₂ \approx nekaj **ms**



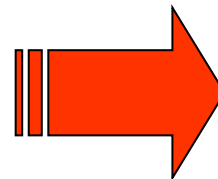
MERITVE ODRAŽAJO HITROST
KATALITSKE REAKCIJE

Hitra izmenjava molekul:

detergent v **micelah** \approx nekaj **ms**

fosfolipidi v mešanih **micelah** \approx **s**

kataliza sPLA₂ \approx nekaj **ms**

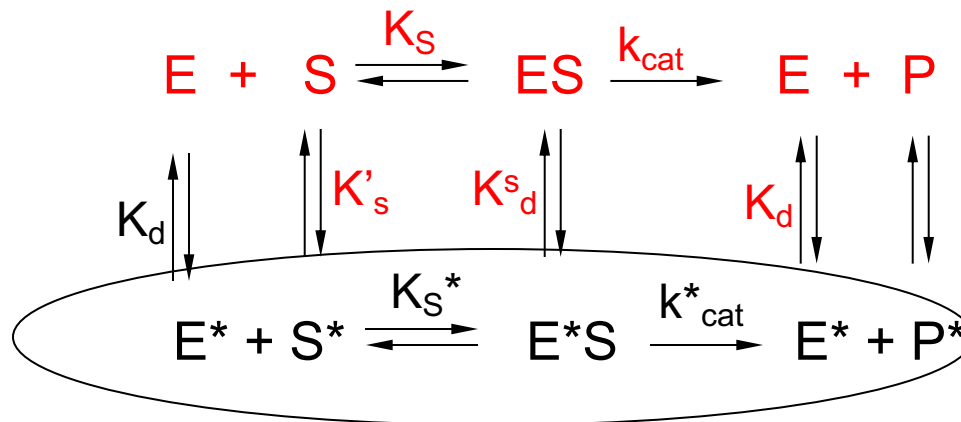


MERITVE ODRAŽAJO HITROST
PREHAJANJA S IN P

Različna (mikro)okolja encimskih molekul

- **Procesivnost** katalitske reakcije
- **Dinamika izmenjave** S, P in E in **kakovost površine**
- **Zasedenost vezavnih mest** (“crowding”)

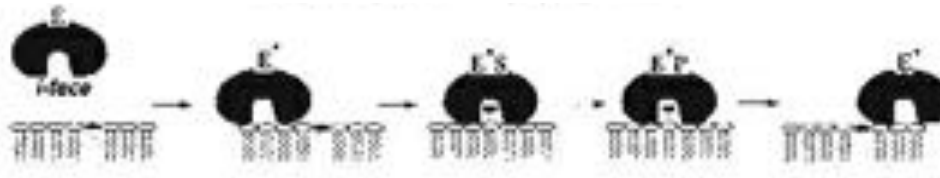
=> možne so številne nedefinirane kinetske poti



Definirane kinetske poti so prava rešitev

- Vsaka molekula encima mora videti enako!
- Povprečje mikroskopskih dogodkov = makroskopsko stanje sistema

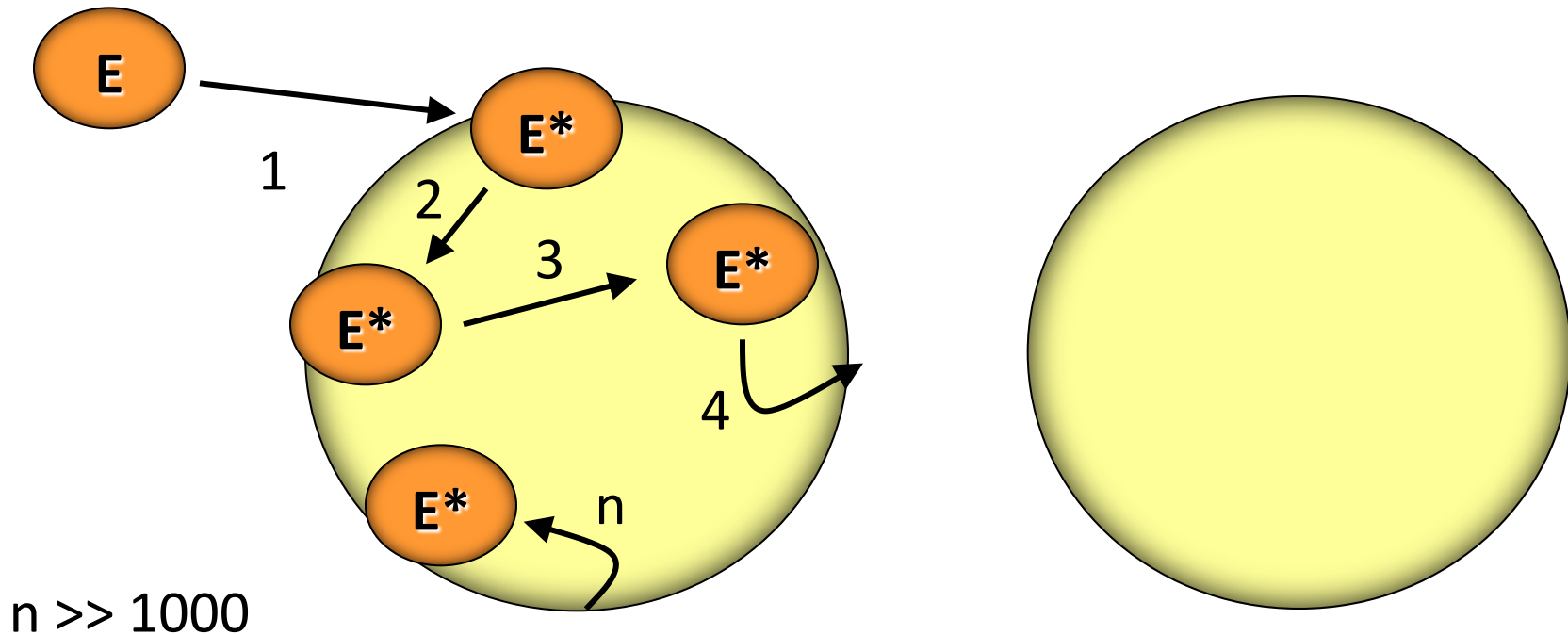
1. “Scooting” – drseča/procesivna kataliza, *ni izmenjave E, S ali P* med agregati



2. “Quasi-scooting” – *zelo hitra izmenjava E, S, P* med agregati (hitrejša od katalitske reakcije)

Kataliza v drsečem načinu

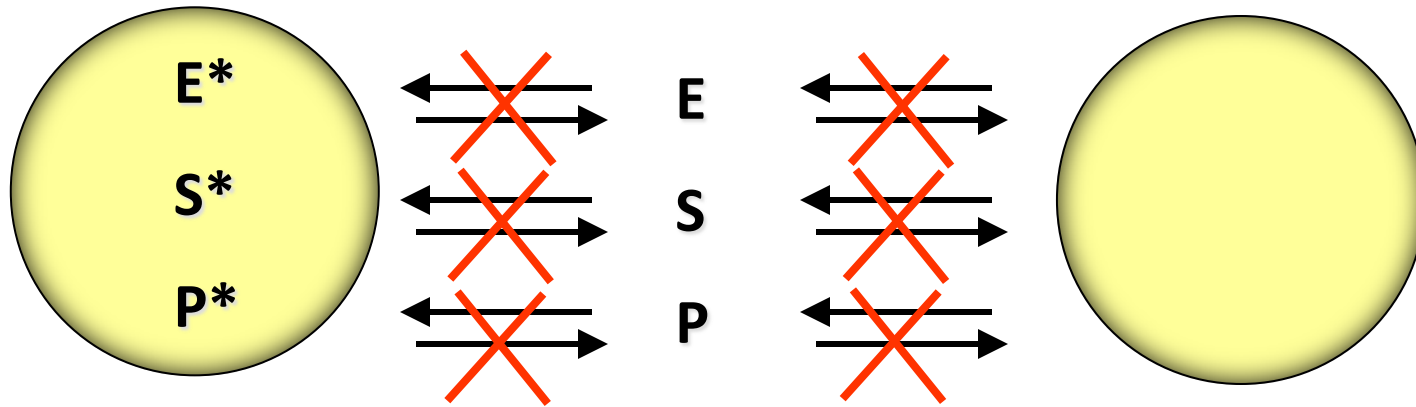
E^* izvaja **procesivno katalizo** do popolne hidrolize zunanje plasti vezikla!



“scooting mode”

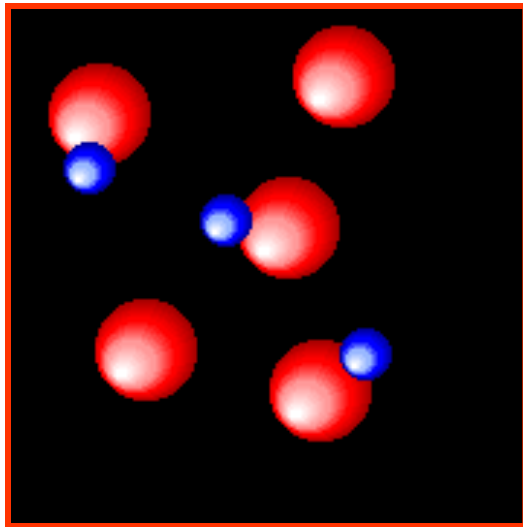
Kataliza v drsečem načinu

Ni izmenjave E, S ali P med vezikli (V)



Kataliza v drsečem načinu

$[E] / [V] < 0,15 \Rightarrow$ največ ena molekula E je vezana na vsak V, ki vsebuje E!



V povprečju se bodo vsi vezikli, ki vsebujejo E, obnašali enako s časom

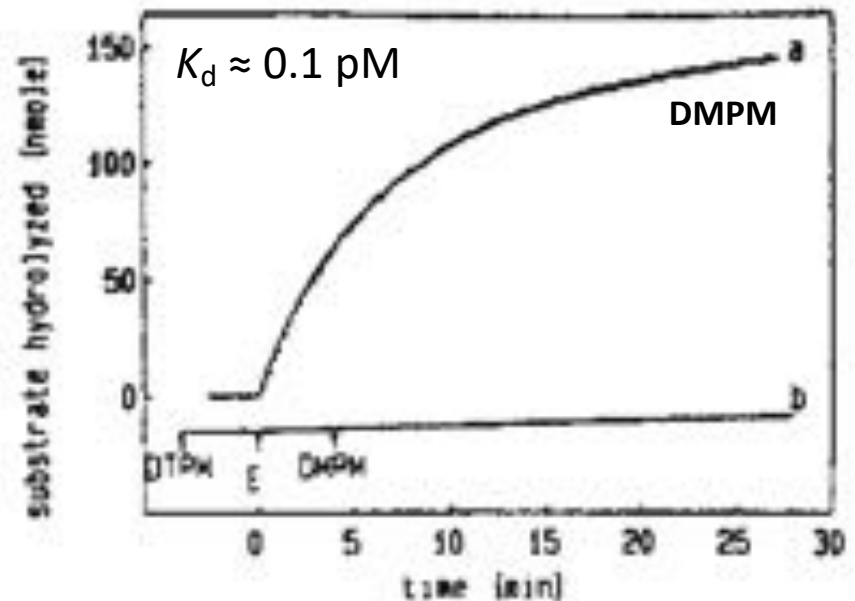
Kataliza v drsečem načinu

- ⇒ merjenje nastajanja produkta v časovni enoti bo vsota produktov, ki nastajajo na vsakem veziklu, ki vsebuje encim.
- ⇒ lahko povežemo mikroskopske dogodke na posameznem veziklu z makroskopskim obnašanjem sistema

“Scooting” analiza sPLA₂

- pH-stat metoda
- anionski vezikli DMPM (SUV)
=> zelo visoka afiniteta sPLA₂, ireverzibilna vezava
- hidrolizira se le del veziklov, a na vsakem so reakcijski pogoji enaki

Vezava E*V je res ireverzibilna!



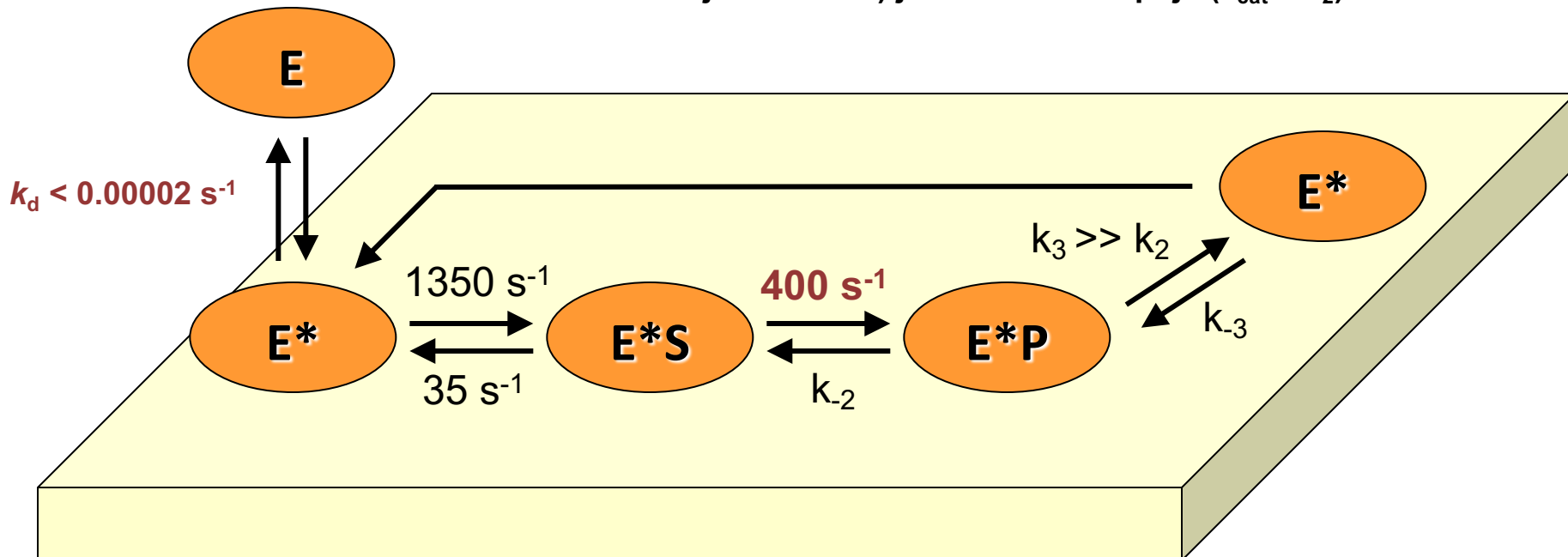
DTPM – nehidrolizabilni dietrski fosfolipidi

Nekatere konstante za delovanje sPLA₂ na negativno nabite vezikle DMPM

$$K_d = k_d/k_a \approx 10^{-13} \text{ M}$$

Vezava sPLA₂ na vezikle DMPM je ireverzibilna!

Najpočasnejša stopnja reakcije (tista, ki določa njeno hitrost) je katalitska stopnja ($k_{\text{cat}} = k_2$).



Hvala lepa za pozornost!

