

## DEGRADÁCIA FOSFOLIPIDOV: TVORBA NOVÉHO ZO STARÉHO

MÁRIA ŠIMOČKOVÁ A PETER GRIAC

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika  
 Maria.Simockova@savba.sk

Došlo 30.7.07, prepracované 23.3.09, prijaté 2.4.09

Kľúčové slová: degradácia lipidov, fosfolipázy, fosfolipidy

### Obsah

1. Úvod
2. Degradáčn e enzýmy – fosfolipázy
  - 2.1. Fosfolipáza A<sub>1</sub> a A<sub>2</sub>
  - 2.2. Fosfolipáza B
  - 2.3. Fosfolipáza C
  - 2.4. Fosfolipáza D
3. Využitie fosfolipáz v priemysle
4. Záver

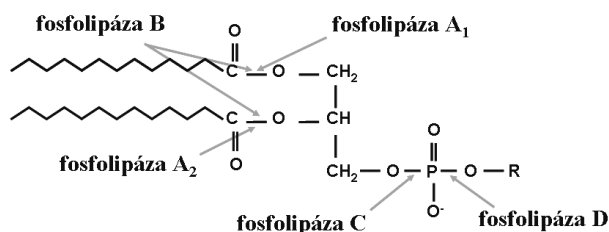
### 1. Úvod

Biologické membrány tvoria prirodzenú bariéru medzi vnútorným a vonkajším prostredím bunky. Podobne ako samotná bunka sú i bunkové organely ohraničené špecifickými intracelulárnymi membránami, ktorých chemická rôznorodosť naznačuje rozmanitú funkciu jednotlivých organel. Biologické membrány sú zložené zo stoviek rozdielnych proteínov a lipidov. Vychádzajúc z ich spoločných fyzikálnych vlastností, lipidy udržiavajú optimálnu permeabilitu (priepustnosť) membrán a slúžia ako podporný matrix pre proteíny ukotvené v membránach. O lipidoch sa však neuvažuje len ako o pasívnych komponentoch tvoriacich nepriepustnú bariéru. Čím ďalej tým viac sa o nich uvažuje ako o dynamických regulátoroch celej rady bunkových procesov. Okrem toho je známe, že bunkové membrány obsahujú oveľa viac druhov lipidov, ako je potrebné pre tvorbu lipidovej dvojvrstvy<sup>1</sup>. Určité špecifické lipidové zloženie biologických membrán je potrebné pre správne fungovanie všetkých membránovo viazaných bunkových procesov. Zmeny v zložení a organizácii membránových lipidov majú výrazný vplyv na také životne dôležité procesy, ako sú prenos signálu a vnútrobunková výmena materiálu<sup>2</sup>. Aby bolo možné zabezpečiť špecifické rozloženie lipidov v membránach, celý proces lipidovej homeostázy je komplexný. Významným procesom v udržiavaní

homeostázy membránových lipidov je okrem ich biosyntézy, transportu a prestavby aj ich degradácia. Degradáčn e proteíny zúčastňujúce sa hydrolyzy fosfolipidov sú fosfolipázy. Pre svoje hydrolytické vlastnosti majú fosfolipázy v procese prestavby membrán nezastupiteľnú úlohu. Väčšinu degradáčnych produktov bunka znovu využije na syntézu nových molekúl. Mnohé ďalšie degradáčn e produkty fosfolipidov majú v eukaryotických bunkách dôležitú signálnu a regulačnú úlohu. Ako príklad môžu slúžiť fosforylované formy fosfatidylinozitolu a z neho derivované molekuly – inozitolfosfáty, ktoré zohrávajú významnú funkciu vo vnútrobunkovej signalizácii. Fosfolipázy sú ďalej esenciálne pri štiepení živín, raste bunky, sekrécii, respirácii, bunkovom cykle, diferenciácii a v odpovedi na bunkový stres. V poslednej dobe sa venuje fosfolipázam zvýšená pozornosť v potravinárskom a farmaceutickom priemysle, kde sa náhradou prírodných enzýmov za chemické činidlá získavajú kvalitnejšie a ekologickjšie produkty. Tejt o problematike je venovaná posledná kapitola tohto krátkeho prehľadu.

### 2. Degradáčn e enzýmy – fosfolipázy

Štyri hlavné skupiny fosfolipáz sa klasifikujú podľa rôzneho miesta účinku na molekule fosfolipidu (obr. 1). Fosfolipázy A (PLA) sú acylhydrolázy a odštiepujú acylovú skupinu buď v polohe *sn*-1 (PLA<sub>1</sub>, EC 3.1.1.32) alebo v polohe *sn*-2 (PLA<sub>2</sub>, EC 3.1.1.4). Enzýmy, ktoré sú schopné uvoľňovať obe acylové skupiny, sa nazývajú fosfolipázy B (PLB, EC 3.1.1.5). Medzi fosfodiesterázy patrí fosfolipáza C (PLC, EC 3.1.4.3), ktorá štiepi molekulu fosfolipidu za vzniku diacylglycerolu a fosforylovaného alkoholu a fosfolipáza D (PLD, EC 3.1.4.4), ktorej účinkom vzniká kyselina fosfatidová (diacylglycerolfosfát) a alkohol.



Obr. 1. Miesta hydrolytického účinku rôznych fosfolipáz na molekule fosfolipidu; fosfolipázy A<sub>1</sub>, fosfolipázy A<sub>2</sub> a fosfolipázy B sa vyznačujú aktivitou, ktorá odštiepuje acylovú skupinu fosfolipidov. Fosfolipázy C a fosfolipázy D hydrolyzujú fosfodiesterovú väzbu substrátu

2.1. Fosfolipáza A<sub>1</sub> a A<sub>2</sub>

Fosfolipázy A<sub>1</sub> sú enzýmy hydrolyzujúce esterovú väzbu fosfolipidu v pozícii *sn*-1 za vzniku 2-acylyzofosfolipidu a mastnej kyseliny. Tieto enzýmy sa vyznačujú širokou substrátovou špecifitou a okrem fosfolipidov hydrolyzujú triacylglyceroly a galaktolipidy. Niektoré cicavčie PLA<sub>1</sub> sú však selektívne iba k špecifickému substrátu, ktorým je napríklad fosfatidylserín a kyselina fosfatidová. Pravdepodobnou funkciou týchto fosfolipáz A<sub>1</sub> je produkcia špecifických bioaktívnych lyzofosfolipidov, lyzofosfatidylserínu a kyseliny lyzofosfatidovej<sup>3</sup>. Aktivita PLA<sub>1</sub> bola pozorovaná v mnohých bunkách a tkanivách u rôznych organizmov<sup>4,5</sup>. U cicavcov je známych deväť PLA<sub>1</sub>, pričom šesť z nich sú extracelulárne enzýmy a zvyšné tri proteíny sú intracelulárne. Intracelulárne a extracelulárne PLA<sub>1</sub> nezdediajú sekvenčnú homológiu a očividne majú aj odlišné funkcie. Na rozdiel od fosfolipáz A<sub>2</sub>, C a D ostáva fyziologická funkcia PLA<sub>1</sub> z veľkej časti neznáma.

Fosfolipázy A<sub>2</sub> boli prvými popísanými fosfolipázami. Ich aktivita bola pozorovaná už pred viac ako storočím (1877-1878). Bokay vtedy v pankreatickej šťave sledoval degradáciu fosfatidylcholínu neznámou zložkou nazvanou ako pankreatická PLA<sub>2</sub>. Neskôr na prelome storočia bola v jede kobry odhalená hemolytická aktivita zodpovedná za lýzu membrán erytrocytov. Lytická zlúčenina produkovaná venómovou fosfolipázou bola však identifikovaná až o dekádu neskôr a označená ako lyzocitín (lyzolecitín). K dnešnému dňu bolo popísané veľké množstvo najrôznejších fosfolipáz A<sub>2</sub>. PLA<sub>2</sub> sú všeobecne charakterizované ako enzýmy stereospecificky katalyzujúce hydrolyzu centrálnu (*sn*-2) acylesterovej väzby fosfolipidu za vzniku voľnej mastnej kyseliny a lyzofosfolipidu. Lyzofosfolipidy sa v membránach nachádzajú vo veľmi nízkych koncentráciách, pričom zvýšenie ich hladiny vedie k zmene fyzikálno-chemických vlastností biologických membrán a v extrémnych prípadoch k ich lýze. V nízkych koncentráciách sú lyzofosfolipidy, najmä lyzofosfatidylcholínu a kyselina lyzofosfatidová považované za signálne molekuly<sup>6</sup>. Lyzofosfolipidy sú taktiež dôležitým medziproduktom pri prestavbe (remodelingu) fosfolipidov<sup>7</sup>. Mastné kyseliny, uvoľnené pôsobením PLA<sub>2</sub>, akými sú kyselina arachidónová a kyselina olejová môžu byť použité ako zdroj energie. Dôležitejšou úlohou kyseliny arachidónovej je však jej funkcia sekundárneho posla a prekursora eikozanoidov, ktoré sa uplatňujú v iniciácii zápalového procesu, bolesti a horúčky<sup>8</sup>. Viaceré sekretované fosfolipázy A<sub>2</sub> majú ochranné antimikrobiálne účinky<sup>9</sup>. Medzi dôležité enzýmy, ktoré vykazujú aktivitu typu fosfolipázy A<sub>2</sub>, patria aj hepatitická lipáza a lipáza degradujúca lipoproteíny, ktoré sú zodpovedné za degradáciu neutrálnych lipidov v chylomikrónoch a lipoproteínoch.

V roku 2000 boli PLA<sub>2</sub> klasifikované Six a Dennisom do dvoch hlavných typov založených na báze katalytického mechanizmu<sup>10</sup>. V jednej skupine boli tie enzýmy, ktoré využívajú katalytický histidín (His) ako primárny katalytický zvyšok, kým druhá skupina vyžadovala katalytický

serín (Ser) a acyl-serínový medziprodukt. Čím sa rodina fosfolipáz A<sub>2</sub> viac rozširuje, tým sa zvyšuje aj obtiažnosť zovšeobecnenia vlastností týchto proteínov. Zvyšujúce sa množstvo známych PLA<sub>2</sub> bolo nedávno znovu prerozdelené do pätnástich skupín, ktoré sú zahrnuté v piatich hlavných kategóriách či typoch: sekrečné PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), cytozolické PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), PLA<sub>2</sub> nezávislé od vápnika (iPLA<sub>2</sub>), acetylhydrolázy štiepiace aktivujúci faktor krvných doštičiek (PAF-PLA<sub>2</sub>; PAF - platelet-activating factor) a lyzozomálne PLA<sub>2</sub> (cit.<sup>11,12</sup>).

Všeobecne sekrečné PLA<sub>2</sub> (skupiny IA, IB, IIA-F, III, V, IX, X, XIA-B, XII, XIII, XIV) majú nízku molekulovú hmotnosť (13-19 kDa), obsahujú 5 až 8 disulfidových väzieb a k svojej aktivite potrebujú milimolárne koncentrácie Ca<sup>2+</sup> (cit.<sup>13</sup>). Všetky sPLA<sub>2</sub> katalyzujú hydrolyzu mastnej kyseliny rovnakým mechanizmom pomocou histidínu, ktorý je umiestnený v katalytickom centre proteínu. Hydrolyza substrátu prebieha cez aktiváciu a orientáciu molekuly vody pomocou vodíkových väzieb histidínu. Ďalším dôležitým aminokyselinovým zvyškom je konzervovaná kyselina asparágová (Asp), ktorá susedí s histidínom a tvorí s ním takzvanú His/Asp dyádu. Asp je ligandom pre Ca<sup>2+</sup>, ktorý vytvára pozitívne nabitú oxyaniónovú diery stabilizujúcu negatívny náboj prechodného stavu reakcie<sup>14</sup>. Cytozolické fosfolipázy A<sub>2</sub> (skupina IV so svojimi podskupinami) majú vyššiu molekulovú hmotnosť (> 60 kDa), vyžadujú mikromolárne koncentrácie iónov vápnika a sú známe tým, že preferenčne hydrolyzujú fosfolipidy s kyselinou arachidónovou<sup>15</sup>. Na rozdiel od sPLA<sub>2</sub> k hydrolyze acylovej skupiny vyžadujú katalytický serín, ktorý spolu s kyselinou asparágovou tvorí Ser/Asp dyádu. Zo štruktúry cytozolických PLA<sub>2</sub> je známe, že sú zložené z C2 domény, ktorá je schopná viazať dva vápnikové ióny a má afinitu k fosfolipidovým membránam a z katalytickej  $\alpha/\beta$  hydrolázovej domény. Obe tieto domény sú potrebné pre úplnú enzymatickú aktivitu cPLA<sub>2</sub> (cit.<sup>16</sup>). Skupinou, ktorá pre svoju aktivitu nepotrebuje vápnik, je iPLA<sub>2</sub> (skupina VI). Tieto fosfolipázy sa vyznačujú vysokou molekulovou hmotnosťou (okolo 85 kDa) a ich katalytický mechanizmus je podobný so skupinou IV (cPLA<sub>2</sub>), ktorá využíva serín k štiepeniu *sn*-2 esterovej väzby, avšak s tým rozdielom, že iPLA<sub>2</sub> nie sú špecifické pre fosfolipidy obsahujúce arachidonát<sup>11</sup>. Ďalším členom PLA<sub>2</sub> sú PAF acetylhydrolázy, ktoré zahŕňajú skupinu VII a VIII. Tieto enzýmy boli pomenované na základe ich schopnosti hydrolyzovať acetyllové skupiny z pozície *sn*-2 z aktivačného faktora krvnej doštičky<sup>17</sup>. Aktívne miesto PAF-PLA<sub>2</sub> je zložené z aminokyselinových zvyškov serínu, histidínu a kyseliny asparágovej, ktoré spolu tvoria katalytickú triádu a nie dyádu ako bolo pozorované u ostatných PLA<sub>2</sub> (cit.<sup>18</sup>). Katalytická triáda bola pozorovaná aj v poslednej skupine XV, ktorá je zaradená do typu lyzozomálnych PLA<sub>2</sub>. Lyzozomálne fosfolipázy A<sub>2</sub> zamieňajú hydroxylovú skupinu ceramidu v pozícii C-1 za acylovú skupinu, pričom ako donor využívajú mastnú kyselinu fosfolipidu<sup>19</sup>. Objavom nových členov rodín fosfolipáz A<sub>2</sub>, ich štruktúrnou charakterizáciou a určením ich bunkových funkcií sa fosfolipázy A<sub>2</sub> stávajú významným terčom účinku mnohých lie-

čiv pri viacerých závažných ochoreniach<sup>20</sup> (hematologické, kardiovaskulárne, neurodegeneratívne ochorenia).

## 2.2. Fosfolipáza B

Fosfolipázy B sú heterogénna skupina enzýmov, ktoré odstraňujú masné kyseliny fosfolipidu z polohy *sn*-1 a *sn*-2 a tým vykazujú aktivitu fosfolipázy i lyzofosfolipázy<sup>21</sup>. Niektoré fosfolipázy B sa vyznačujú i transacylázovou aktivitou, sú schopné katalyzovať opačnú reakciu, tvorbu fosfolipidu z lyzofosfolipidu a masnej kyseliny. U cicavcov bola fosfolipáza B prvýkrát popísaná v črevách<sup>22</sup>. Neskôr bola prítomnosť enzýmu zistená aj na vnútornom povrchu kefkového lemu maturovaných enterocytov, kde je PLB potrebná k štiepeniu lipidov prijatých potravou<sup>23</sup> a v bunkách neutrofilov, kde pravdepodobne zohráva úlohu v obrane proti inváznym mikroorganizmom a v tvorbe lipidových molekúl iniciujúcich zápalovú reakciu<sup>24</sup>. Niektoré huby a baktérie sú schopné sekretovať fosfolipázy do vonkajšieho prostredia. Kvasinková a bakteriálna extracelulárna aktivita PLB môže byť spojená s virulenciou poškodzujúcou hostiteľskú bunku. Táto aktivita pravdepodobne spôsobuje poškodenie hostiteľskej bunkovej membrány a tým uľahčí preniknutie mikroorganizmov do tkanív<sup>25</sup>.

Veľmi zaujímavou fosfolipázou B sa javí enzým, ktorý bol nazvaný NTE (neuroathy target esterase, neurotoxická esteráza). Cicavčia NTE bola identifikovaná pri hľadaní molekulárnej podstaty neuropatií zapríčinených pôsobením organofosfátov. Ľudská NTE vykazuje na C-konci proteínu výraznú podobnosť s rodinou serínových hydroláz. Na základe cDNA sekvencie NTE boli identifikované jej homológy u ovocnej mušky *Drosophila melanogaster*, u nematódy *Caenorhabditis elegans* a u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Pomocou týchto modelových organizmov bolo zistené, že NTE má vlastnosti fosfolipázy B, ktorá štiepi fosfatidylcholin na glycerofosfocholín a voľné masné kyseliny. Potvrdením fosfolipázovej aktivity NTE bolo zistenie, že pri inhibícii NTE sa znižuje hladina vnútrobunkového glycerofosfocholínu u buniek tkanivových kultúr a naopak pri nadexpresii proteínu NTE sa hladina glycerofosfocholínu zvyšovala<sup>26-28</sup>. Nepítomnosť NTE aktivity má fatálny dôsledok v niektorých tkanivách vyšších eukaryotov. Jeho funkcia je pravdepodobne esenciálna pre prežitie post-mitotických, vysoko diferencovaných buniek, akými sú sekundárne gliové bunky placenty a neurónov a gliá nervového systému<sup>29,30</sup>.

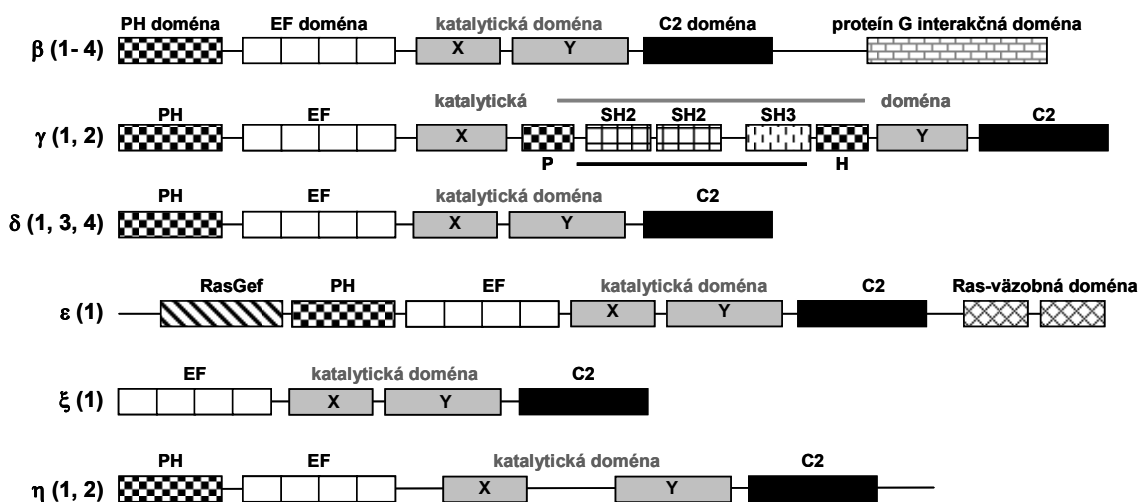
## 2.3. Fosfolipáza C

Fosfolipázy C hydrolyzujú fosfodiesterovú väzbu fosfolipidu v pozícii *sn*-3 za vzniku diacylglycerolu a alkoholfosfátu. Zvlášť veľká pozornosť sa venuje rodine fosfatidylinozitol špecifických fosfolipáz, ktoré majú kľúčový význam v bunkovej signalizácii<sup>31</sup>. Izoenzýmy fosfolipázy C špecifické pre fosfoinozitidy (EC 3.1.4.11) tvoria v eukaryotoch príbuznú skupinu proteínov, ktoré odštiepujú polárnu hlavičku fosfolipidov obsahujúcich inozitol. Tieto

enzýmy sú kontrolované receptormi bunkového povrchu a hydrolyzujú najmä viacnásobne fosforylovaný lipid, fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>), za vzniku dvoch vnútrobunkových signálnych molekúl: D-*myo*-inozitol-1,4,5-trifosfátu (IP<sub>3</sub>) a diacylglycerolu. Aktivita fosfolipáz C bola popísaná v bunkách rôznych organizmov od baktérií, cez kvasinky a rastliny až po živočíchy. Cicavčia rodina PLC pozostáva z 13 izoenzýmov rozdelených do šiestich rodín, pričom sú známe štyri β (cit.<sup>32</sup>), dve γ (cit.<sup>33</sup>), tri δ (cit.<sup>32</sup>), jedna ε (cit.<sup>34</sup>), jedna ξ (cit.<sup>35</sup>) a dve η izoformy<sup>36</sup>. Tieto rôzne izoenzýmy PLC sa líšia v štruktúrnej organizácii, regulácii, aktivácii a v tkanivovej distribúcii proteínu. Kvasinky *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* a patogénna kvasinka *Candida albicans* obsahujú gén *PLC1* kódujúci približne 100 kDa proteín, ktorý je príbuzný s 85 kDa cicavčou δ-izoformou PLC.

Podľa kryštalografickej štruktúry PLC-δ<sub>1</sub> a PLC-β<sub>2</sub> je katalytická doména fosfolipázy C tvorená z X a Y regiónov<sup>32,37</sup>. Táto doména je zložená zo striedajúcich sa α-helixov a β-skladaných listov a je podobná neúplnému α/β baretu triozafosfátizomerázy. Aktuálny model katalýzy PLC-δ<sub>1</sub> sa skladá z dvoch hlavných krokov. V prvom fosfotransferázovom kroku sú aminokyselinové zvyšky kyseliny glutámovej (390) a His-392 zapojené do prenosu protónu z hydroxylovej skupiny (v pozícii 2) inozitolového kruhu na fosfor, čím podporujú intramolekulový atak a cyklizáciu<sup>38</sup>. V druhom fosfodiesterázovom kroku sú dôležitými aminokyselinovými zvyškami His-356 a His-311, ktoré sa zúčastňujú hlavnej kyslo-zásaditej katalýzy protonizáciou diacylglycerolovej skupiny<sup>39</sup>. Po celom katalytickom mieste PLC-δ<sub>1</sub> sa nachádza sieť vodíkových väzieb a soľných mostíkov. Táto sieť väzieb viaže inozitolový kruh a zvyčajne zodpovedá za substrátovú špecifitu. Je zaujímavé, že výmena arginínu v pozícii 549 v druhej polovici α/β baretu nepoškodí katalytickú aktivitu enzýmu, ale zmení jeho substrátovú preferenciu z PIP<sub>2</sub> na fosfatidylinozitol<sup>40</sup>. Na substrátovú špecifitu PLC vplýva aj rôzny charakter polárnej hlavičky lipidu. Kým prokaryotické formy PLC preferujú ako substrát fosfatidylinozitol a fosfatidylinozitol glykány, eukaryotické enzýmy všeobecne uprednostňujú PIP<sub>2</sub> pred fosfatidylinozitol-4-fosfátom a fosfatidylinozitolom.

Sekvencie eukaryotických PLC obsahujú rad domén (obr. 2), ktoré sú organizované okolo katalytického α/β baretu<sup>41</sup>. Všetky izoformy PLC obsahujú tri regulačné domény: (i) plextrin homologická (PH) doménu, ktorá viaže fosfoinozitidy a/alebo proteíny a pravdepodobne slúži ako držiak alebo povraz, ktorý spája proteín s membránovým povrchom počas katalýzy<sup>42</sup>, (ii) EF motívy viažuce vápnik<sup>43</sup> a (iii) samostatnú C2 doménu, ktorá obyčajne v prítomnosti iónov Ca<sup>2+</sup> viaže fosfolipidy<sup>44</sup>. Výnimkou je len PLC-ξ, ktorá neobsahuje PH doménu<sup>45</sup>. Každá z rôznych rodín PLC odpovedá na odlišné stimuly, čomu nasvedčujú aj rôzne regulačné domény fosfolipáz C (obr. 2). Väčšinou sa funkcia fosfolipáz C spája so vznikom dôležitej signálnej molekuly IP<sub>3</sub>, či už v cytoplazme alebo v jadre. Izoformy PLC majú kľúčovú úlohu vo váp-



Obr. 2. Lineárna reprezentácia funkčných domén jednotlivých rodín fosfolipáz C; vo všetkých fosfoinozid špecifických fosfolipázach C je katalytická doména rozdelená do dvoch regiónov, X a Y, ktoré sú obklopené rôznymi regulačnými doménami (upravené podľa cit.<sup>41</sup>). SH2 – Src homologická doména 2; SH3 – Src homologická doména 3; RasGef – Ras guanine nucleotide exchange factor-like domain, RasGef-doména príbuzná s výmenným faktorom guanínu; PX – plextrín homologická doména; PH – phox homologická doména

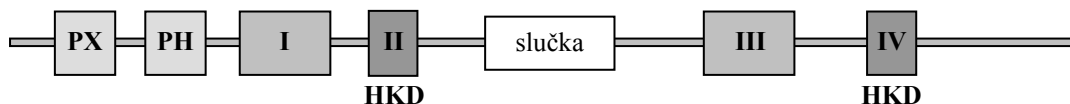
nikom sprostredkovanej signalizácii. Zvýšenie hladiny vápnika v bunke je zabezpečené hlavne tvorbou univerzálneho sekundárneho posla  $IP_3$ , ktorý sa viaže na  $Ca^{2+}$  kanál v endoplazmatickom retikule a aktivuje ho<sup>33</sup>. Ďalšou molekulou, ktorá vzniká účinkom PLC, je diacylglycerol. Diacylglycerol zohráva úlohu v mnohých bunkových procesoch, pričom najznámejšia úloha je aktivácia proteínkinázy C (cit.<sup>46</sup>). Produkty štyroch jadrových izoform PLC-β pravdepodobne ovplyvňujú zosťrih pre-mRNA a štruktúru chromatinu<sup>47</sup>. PLC-η<sub>2</sub> je neurón špecifický enzým, ktorý je dôležitý pre vznik a/alebo udržiavanie siete neurónov v mozgu<sup>41</sup>.

#### 2.4. Fosfolipáza D

Aktivita PLD bola prvýkrát pozorovaná v extraktoch mrkvy ako aktivita fosfolipid špecifickej fosfodiesterázy, ktorá hydrolyzuje fosfatidylcholin za vzniku kyseliny fosfatidovej. Neskôr bola táto aktivita pozorovaná u rôznych organizmov od vírusov cez baktérie, kvasinky, rastliny až k cicavcom. V bunkách cicavcov je aktivita fosfolipázy D prítomná v takmer všetkých typoch buniek okrem leukocy-

tov a niektorých lymfocytov. Fosfolipáza D je okrem veľkého množstva povrchových receptorov regulovaná vnútrobunkovými faktormi, vrátane aktivácie proteínkinázou C, malými GTPázami a najmä pomocou fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátu<sup>48</sup>.

Fosfolipázy D sú charakteristické štruktúrou, v ktorej sú katalytické domény zo strán ohraničené regulačnými sekvenciami (obr. 3). Tieto sekvencie zahŕňajú lipidviažuce PX (Phox homologická) a PH domény ako i väzobné miesto pre  $PIP_2$  (cit.<sup>49,50</sup>). PH doména ľudskej PLD1 a PLD2 a kvasinkovej fosfolipázy D1 (Spo14p) zohráva kritickú úlohu vo väzbe enzýmu na špecifické lipidové povrchy, ktoré obsahujú  $PIP_2$ . Táto doména však neviaže  $PIP_2$ , ktorý je dôležitý k aktivácii enzýmu a ktorého väzobné miesto sa nachádza v katalytickej doméne PLD (cit.<sup>51</sup>). PX doména pravdepodobne zabezpečuje interakcie s inými proteínmi alebo viaže fosfatidylinozitolfosfáty<sup>52</sup>. Ďalším konzervovaným regiónom PLD1 ale nie PLD2 je takzvaná slučka, ktorá má úlohu v negatívnej regulácii proteínu<sup>53</sup>. Nielen spomínané domény, ale aj konce proteínu sú dôležité pre aktivitu PLD. N-koniec PLD1 je potrebný k stimulácii enzýmu



Obr. 3. Základná štruktúra ľudskej fosfolipázy D1; domény I až IV predstavujú konzervované katalytické jadro eukaryotických fosfolipáz D (upravené podľa cit.<sup>50</sup>). PX – plextrín homologická doména; PH – phox homologická doména

pomocou proteínkinázy C (cit.<sup>54</sup>) a bunková lokalizácia proteínu je definovaná jeho C-koncom<sup>55</sup>.

Katalytické jadro eukaryotických fosfolipáz D pozostáva zo štyroch konzervovaných oblastí (I-IV). Obzvlášť vysoko konzervované sú domény II a IV, ktoré obsahujú HKD (H-histidín, K-arginín, D-kyselina glutámová) motív (obr. 3). Kompletne zachovanie týchto motívov v evolúcii naznačuje ich dôležitú úlohu, ktorá bola overená mutačnými štúdiami<sup>54</sup>. Každý z HKD motívov tvorí polovicu účinného aktívneho miesta. Individuálne exprimovaný N- alebo C-koncový HKD fragment fosfolipázy D1 je katalyticky neaktívny.

Objav transfosfatidylačnej reakcie PLD viedol k úvahám o tvorbe intermediátu fosfatidyl-enzým v priebehu reakcie. Na základe svojich experimentov na rastlinnej PLD Stanacev a Stuhne-Sekalec navrhli model, v ktorom katalytický mechanizmus PLD zahŕňa dvojstupňovú „ping-pong“ reakciu, v ktorej je tvorba kovalentného fosfatidyl-enzýmového intermediátu nasledovaná buď hydrolýzou alebo transfosfatidyláciou<sup>56</sup>. Histidínový aminokyselinový zvyšok z HKD motívu slúži ako nukleofilný atak na fosfát vo fosfodiesterovej väzbe za tvorby prechodného fosfoenzýmového intermediátu. V druhej polovici reakcie je fosfoenzýmový medziprodukt hydrolyzovaný vodou (alebo primárnymi krátkymi reťazcami alkoholu) za uvoľnenia kyseliny fosfatidovej (alebo fosfatidylalkoholu) (cit.<sup>57</sup>).

O biologickej funkcii fosfolipáz D najviac vypovedá poznatok, že produkt degradácie fosfolipidov týmto enzýmom, kyselina fosfatidová, je vnútrobunkovým lipidovým poslom. Tento fakt indikuje úlohu fosfolipáz D v rôznych formách regulácie vnútrobunkového membránového transportu, ako aj v metabolických dráhach, ktoré regulujú bunkový rast, adaptáciu a diferenciáciu<sup>49,58</sup>. Samotná kyselina fosfatidová môže taktiež priamo svojimi fyzikálno-chemickými vlastnosťami ovplyvňovať zakrivenie biologických membrán a slúžiť ako kotevné miesto pre proteíny asociované s membránami<sup>59</sup>. V bunke môže byť kyselina fosfatidová premenená na iné bioaktívne lipidy, včítane diacylglycerolu a kyseliny lyzofosfatidovej<sup>6,46</sup>.

### 3. Využitie fosfolipáz v priemysle

Fosfolipidy sú amfifilné molekuly a povrchovo aktívne látky. Pre svoje vlastnosti sa využívajú hlavne v potravinárskom priemysle, napríklad na redukciu viskozity a kryštalizácie čokolády, na stabilizáciu vlhkosti instantných produktov a slúžia aj ako prostriedok proti oroseniu a hnednutiu margarínu. Vo farmaceutickom priemysle sú lipidy často aplikované ako špecifické nosiče liečiv. Komerčne dostupné fosfolipidy sa bežne získavajú zo surového sójového oleja, slnečnicového oleja a vaječného žltka pomocou chemických alebo biochemických postupov. Biochemická modifikácia alebo syntéza poskytuje náhradné a často lacnejšie cesty pre úpravu a výrobu fosfolipidov určených pre rôzne aplikácie. Porovnaním s chemickými metódami majú enzymatické modifikácie

niekoľko výhod. Selektivita a špecifita je jednou z najdôležitejších vlastností proteínov, ktoré robia úpravu fosfolipidov jednoduchšou a ľahšou oproti chemickým postupom. Enzymatické reakcie sú často vykonávané za miernejších podmienok, ktoré prispievajú k zachovaniu pôvodných vlastností lipidov. Ďalšou výhodou je, že bio-katalytické prístupy vysoko redukovujú použitie toxických a škodlivých roztokov, a tak poskytujú bezpečnejšie a čistejšie produkty pre potravinársky, farmaceutický a kozmetický priemysel. V poslednej dobe získané poznatky v oblasti biochémie lipidov otvárajú nové možnosti pre vývoj enzymológie a inžinierstva fosfolipidov. Tieto možnosti zahŕňajú syntézu lipidových analógov prírodne sa vyskytujúcich bioaktívnych zlúčenín pre farmaceutické využitie<sup>60,68,69</sup>.

Fosfolipázy sú dôležitou skupinou enzýmov, ktoré hydrolyzujú fosfolipidy za vzniku rôznych produktov. Postupne s vývojom DNA technológií je možné exprimovať čoraz väčšie množstvo fosfolipáz v cudzích organizmoch. Táto produkcia viedla k vzniku nových a lepších fosfolipáz, ktoré boli následne využité v priemyselných aplikáciách. Niektoré z nich, ako prasačia pankreatická fosfolipáza A<sub>2</sub>, sú používané v priemysle už po desaťročia. Fosfolipázy sa všeobecne využívajú na výrobu emulgátorov, ktoré vznikajú pôsobením fosfolipáz na fosfolipidy prirodzene sa nachádzajúce v ingredienciách. Uplatňujú sa vo výrobe škrobov, konzumných olejov, syrov a v pekárskom priemysle<sup>61</sup>.

V pekárskom priemysle sa využitím fosfolipáz dosahuje zvýšená kvalita cesta. Lipidy a ich hydrolyzované produkty sú potrebné pre stabilizáciu vzduchových bublín v ceste, čo vedie k jemnejšej štruktúre, k zväčšeniu objemu chleba a aj k jeho predĺženej trvanlivosti<sup>62</sup>. Fosfolipázy sa tiež uplatňujú v mliekarskom priemysle na výrobu syra, jogurtu, mlieka a zmrzliny. Napríklad pri produkcii syra, hydrolýza mliečnych fosfolipidov pred pridaním syridla značne zvýši výťažok syra bez znižovania jeho kvality<sup>63</sup>. Zlepšenie výťažku syra je pravdepodobne dôsledkom zvýšeného zadržovania tuku a vlhkosti v syrenine. Hydrolýza hydrofóbných fosfolipidov pomocou fosfolipázy A<sub>1</sub> vedie k uvoľneniu menej hydrofóbných a teda viac vo vode rozpustných lyzofosfolipidov. Predpokladá sa, že lyzofosfolipidy, ktoré sú uvoľnené z mliečného tuku, slúžia ako povrchovo aktívne činidlo v syrenine a tým napomáhajú k emulgácii vody a tuku počas spracovania syra. Jedna z ďalších aplikácií fosfolipáz je prečisťovanie konzumných olejov. Surové rastlinné oleje obsahujú rôzne druhy nežiaducich látok, ktoré znehodnocujú ich kvalitu: voľné mastné kyseliny, fosfolipidy nazývané ako gummy, stopy kovov, farbív a ťažké kovy. Veľká časť fosfolipidov sa odstraňuje vodou, avšak zvyšná časť je odstraňovaná buď žieravým procesom alebo enzymaticky za pomoci fosfolipázy A alebo fosfolipázy C. Prídavkom malého množstva vody do surového oleja sa fosfolipidy hydratujú a tvoria gumu. Táto guma je následne z oleja separovaná odstredením. Vzhľadom k tomu, že amfifilné fosfolipidy sú dobrými emulgátormi, vychytávajú z oleja i triacylglyceroly, čím sa znižuje konečný výťažok oleja.

Pridanie fosfolipázy C v čistiacom procese hydrolyzuje fosfolipidy, čím sa zníži množstvo vychytaných triacylglycerolov v gume a zvýši sa výťažok oleja<sup>64</sup>. Enzymatická rafinácia surových rastlinných olejov prebieha aj pomocou fosfolipázy A<sub>2</sub>. Toto prečisťovanie je založené na štiepení fosfatidylcholínu za vzniku lyzofosfatidylcholínu, ktorý je rozpustný vo vode a môže byť odseparovaný<sup>65</sup>. Ďalšia možná aplikácia fosfolipáz je založená na modifikovaní a príprave nových druhov lipidov. PLA<sub>2</sub> sa najviac uplatňuje v zámene rôznych mastných kyselín fosfolipidov. Diacylglycerol produkovaný hydrolýzou PLC má enantiomerné vlastnosti prírodných produktov, ktoré môžu byť využité pre syntézu stereošpecifických zlúčenín<sup>66</sup>. V neposlednom rade pomocou transesterifikačnej aktivity PLD je možné syntetizovať menej sa vyskytujúce fosfolipidy ako fosfatidyletanolamín, fosfatidylserín a fosfatidylglycerol z často sa vyskytujúceho fosfatidylcholínu<sup>67</sup>.

Za posledných 25 rokov môžeme sledovať prudký nárast vedomostí o štruktúrnej a biologickej funkcii fosfolipáz. Vzhľadom k tomu, že fosfolipázy zohrávajú rozhodujúcu úlohu v mnohých biochemických procesoch (napríklad trávenie a vznik zápalu), stávajú sa zaujímavým terčom vo farmaceutickom a biotechnologickom priemysle, kde sa vyvíjajú selektívne a účinné inhibitory voči týmto enzýmom<sup>20</sup>.

#### 4. Záver

V blízkej budúcnosti v súvislosti s rozvojom proteomických a lipidomických metodológií očakávame nárast znalostí o degradačných procesoch, ktoré sa podieľajú na homeostáze, alebo lepšie povedané na homeodynamike membránových lipidov. Fosfolipázy sa podieľajú na neustálej obnove lipidov v biologických membránach. Na základe svojich enzymatických vlastností sa rozdeľujú do štyroch hlavných tried, ktoré sa stále rozrastajú. Každá z fosfolipáz má v bunke okrem degradačnej funkcie aj nezastupiteľnú regulačnú úlohu. Najznámejšou funkciou fosfolipázy A<sub>2</sub> je produkcia prekurzora syntézy eikozanoidov, kyseliny arachidónovej. Fosfolipáza B je zapojená v trávení lipidov prijatých potravou. Degradačné produkty fosfoinozid špecifických fosfolipáz C regulujú hladinu vápnika v bunke a aktivitu proteínkinázy C. Kyselina fosfatidová, ktorá je hydrolyzovaná z fosfolipidu pomocou fosfolipázy D je zapojená do rôznych transportných masínérií bunky. Známe enzymatické vlastnosti fosfolipáz sa čoraz častejšie využívajú v priemysle. V poslednej dobe narastá trend „bio“ produktov, kde sa namiesto chemických prísad používajú prírodné enzýmy, ktoré častokrát zabezpečia prípravu oveľa kvalitnejších a ekologickejších produktov. Mnohé biotechnologicky využívané fosfolipázy sa už dnes produkujú v mikroorganizmoch a s ďalším rozvojom proteínového inžinierstva bude možné cielene produkovať fosfolipázy so želanými vlastnosťami a tak rozšíriť možnosti ich aplikácie.

*Táto práca vznikla za podpory grantov VEGA 2/7136/27 a VVCE-0064-07.*

#### Použité skratky

cPLA <sub>2</sub>	cytozolická fosfolipáza A <sub>2</sub>
IP <sub>3</sub>	D- <i>myo</i> -inozitol-1,4,5-trifosfát
iPLA <sub>2</sub>	fosfolipáza A <sub>2</sub> nezávislá od iónov vápnika
PAF	aktivujúci faktor krvných doštičiek
PH	plextrin homologická doména
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát
PLA <sub>1</sub>	fosfolipáza A <sub>1</sub>
PLA <sub>2</sub>	fosfolipáza A <sub>2</sub>
PLB	fosfolipáza B
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
PX	phox homologická doména
sPLA <sub>2</sub>	sekrečná fosfolipáza A <sub>2</sub>

#### LITERATÚRA

- Holthuis J. C., Levine T. P.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 209 (2005).
- Maxfield F. R., Tabas I.: *Nature* 438, 612 (2005).
- Aoki J., Inoue A., Makide K., Saiki N., Arai H.: *Biochimie* 89, 197 (2007).
- Sato T., Aoki J., Nagai Y., Dohmae N., Takio K., Doi T., Arai H., Inoue K.: *J. Biol. Chem.* 272, 2192 (1997).
- Watanabe I., Koishi R., Yao Y., Tsuji T., Serizawa N.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 820 (1999).
- Rivera R., Chun J.: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 160, 25 (2008).
- Moolenaar W. H., van Meeteren L. A., Giepmans B. N.: *Bioessays* 26, 870 (2004).
- Funk C. D.: *Science* 294, 1871 (2001).
- Nevalainen T. J., Graham G. G., Scott K. F.: *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 1 (2008).
- Six D. A., Dennis E. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 1 (2000).
- Schaloske R. H., Dennis E. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1246 (2006).
- Burke J. E., Dennis E. A.: *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23, 49 (2009).
- Lambeau G., Gelb M. H.: *Annu. Rev. Biochem.* 77, 495 (2008).
- Bahnon B. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 96 (2005).
- Ghosh M., Loper R., Gelb M. H., Leslie C. C.: *J. Biol. Chem.* 281, 16615 (2006).
- Hsu Y. H., Burke J. E., Stephens D. L., Deems R. A., Li S., Asmus K. M., Woods V. L., Jr., Dennis E. A.: *J. Biol. Chem.* 283, 9820 (2008).
- Gardner A. A., Reichert E. C., Topham M. K., Stafforini D. M.: *J. Biol. Chem.* 283, 17099 (2008).
- Tjoelker L. W., Eberhardt C., Unger J., Trong H. L.,

- Zimmerman G. A., McIntyre T. M., Stafforini D. M., Prescott S. M., Gray P. W.: *J. Biol. Chem.* 270, 25481 (1995).
19. Hiraoka M., Abe A., Shayman J. A.: *J. Lipid Res.* 46, 2441 (2005).
  20. Burke J. E., Dennis E. A.: *J. Lipid Res.* (2008).
  21. Chaminade B., Le Balle F., Fourcade O., Nauze M., Delagebeaudeuf C., Gassama-Diagne A., Simon M. F., Fauvel J., Chap H.: *Lipids* 34 *Suppl*, S49 (1999).
  22. Delagebeaudeuf C., Gassama-Diagne A., Nauze M., Ragab A., Li R. Y., Capdevielle J., Ferrara P., Fauvel J., Chap H.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 859, 192 (1998).
  23. Maury E., Prevost M. C., Nauze M., Redoules D., Tarrow R., Charveron M., Salles J. P., Perret B., Chap H., Gassama-Diagne A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 362 (2002).
  24. Xu S., Zhao L., Larsson A., Venge P.: *Febs. J.* 276, 175 (2009).
  25. Ghannoum M. A.: *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 122 (2000).
  26. Zaccheo O., Dinsdale D., Meacock P. A., Glynn P.: *J. Biol. Chem.* 279, 24024 (2004).
  27. Fernandez-Murray J. P., McMaster C. R.: *J. Biol. Chem.* 280, 38290 (2005).
  28. Fernandez-Murray J. P., McMaster C. R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 331 (2007).
  29. Glynn P.: *Biochim. Biophys. Acta* 1736, 87 (2005).
  30. Glynn P.: *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 58, 355 (2007).
  31. Suh P. G., Park J. I., Manzoli L., Cocco L., Peak J. C., Katan M., Fukami K., Kataoka T., Yun S., Ryu S. H.: *BMB Rep.* 41, 415 (2008).
  32. Drin G., Scarlata S.: *Cell. Signalling* 19, 1383 (2007).
  33. Patterson R. L., van Rossum D. B., Nikolaidis N., Gill D. L., Snyder S. H.: *Trends Biochem. Sci.* 30, 688 (2005).
  34. Bunney T. D., Katan M.: *Trends Cell Biol.* 16, 640 (2006).
  35. Swann K., Saunders C. M., Rogers N. T., Lai F. A.: *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 264 (2006).
  36. Zhou Y., Wing M. R., Sondek J., Harden T. K.: *Biochem. J.* 391, 667 (2005).
  37. Essen L. O., Perisic O., Cheung R., Katan M., Williams R. L.: *Nature* 380, 595 (1996).
  38. Essen L. O., Perisic O., Katan M., Wu Y., Roberts M. F., Williams R. L.: *Biochemistry* 36, 1704 (1997).
  39. Ellis M. V., James S. R., Perisic O., Downes C. P., Williams R. L., Katan M.: *J. Biol. Chem.* 273, 11650 (1998).
  40. Cheng H. F., Jiang M. J., Chen C. L., Liu S. M., Wong L. P., Lomasney J. W., King K.: *J. Biol. Chem.* 270, 5495 (1995).
  41. Nakahara M., Shimozawa M., Nakamura Y., Irino Y., Morita M., Kudo Y., Fukami K.: *J. Biol. Chem.* 280, 29128 (2005).
  42. Ferguson K. M., Lemmon M. A., Schlessinger J., Sigler P. B.: *Cell* 83, 1037 (1995).
  43. Kobayashi M., Gryczynski Z., Lukomska J., Feng J., Roberts M. F., Lakowicz J. R., Lomasney J. W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 440, 191 (2005).
  44. Hurley J. H., Misra S.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 49 (2000).
  45. Saunders C. M., Larman M. G., Parrington J., Cox L. J., Royse J., Blayney L. M., Swann K., Lai F. A.: *Development* 129, 3533 (2002).
  46. Goto K., Hozumi Y., Nakano T., Saino-Saito S., Martelli A. M.: *Tohoku J. Exp. Med.* 214, 199 (2008).
  47. Cocco L., Faenza I., Fiume R., Maria Billi A., Gilmore R. S., Manzoli F. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 509 (2006).
  48. Exton J. H.: *FEBS Lett.* 531, 58 (2002).
  49. McDermott M., Wakelam M. J., Morris A. J.: *Biochem. Cell Biol.* 82, 225 (2004).
  50. Jenkins G. M., Frohman M. A.: *Cell Mol. Life Sci.* 62, 2305 (2005).
  51. Du G., Altshuller Y. M., Vitale N., Huang P., Chasserot-Golaz S., Morris A. J., Bader M. F., Frohman M. A.: *J. Cell Biol.* 162, 305 (2003).
  52. Xu Y., Seet L. F., Hanson B., Hong W.: *Biochem. J.* 360, 513 (2001).
  53. Sung T. C., Altshuller Y. M., Morris A. J., Frohman M. A.: *J. Biol. Chem.* 274, 494 (1999).
  54. Zhang A. L., Roomans G. M.: *Respir. Physiol.* 118, 237 (1999).
  55. Hughes W. E., Parker P. J.: *Biochem. J.* 356, 727 (2001).
  56. Stanacev N. Z., Stuhne-Sekalec L.: *Biochim. Biophys. Acta* 210, 350 (1970).
  57. Rudolph A. E., Stuckey J. A., Zhao Y., Matthews H. R., Patton W. A., Moss J., Dixon J. E.: *J. Biol. Chem.* 274, 11824 (1999).
  58. Morris A. J.: *Biochem. Soc. Symp.* 247 (2007).
  59. Roth M. G.: *Traffic* 9, 1233 (2008).
  60. Guo Z., Vikbjerg A. F., Xu X.: *Biotechnol. Adv.* 23, 203 (2005).
  61. De Maria L., Vind J., Oxenboll K. M., Svendsen A., Patkar S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 290 (2007).
  62. Neron S., El Amrani F., Potus J., Nicolas J.: *J. Chromatogr., A* 1047, 77 (2004).
  63. Lilbaek H. M., Broe M. L., Hoier E., Fatum T. M., Ipsen R., Sorensen N. K.: *J. Dairy Sci.* 89, 4114 (2006).
  64. Ciofalo V., Barton N., Kreps J., Coats I., Shanahan D.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45, 1 (2006).
  65. Clausen K.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103, 333 (2001).
  66. Iwasaki Y., Yamane T.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 90, 151 (2004).
  67. Ulbrich-Hofmann R., Lerchner A., Oblozinsky M., Bezakova L.: *Biotechnol. Lett.* 27, 535 (2005).
  68. Heinrich J., Švarcová I., Valentová K.: *Chem. Listy* 102, 245 (2008).
  69. Moravcová J., Opletal L., Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Drašar P.: *Chem. Listy* 101, 1002 (2007).

**M. Šimočková and P. Griač** (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Phospholipid Degradation: Making New from the Old**

Phospholipases are enzymes catalyzing controlled hydrolysis of phospholipids. The enzymes are major regulators of membrane lipid composition. In addition, phospholipase-mediated hydrolysis of phospholipids is an im-

portant source of vital signalling molecules. Hydrolytic properties of an increasing number of phospholipases are utilized in pharmaceutical and food industries. New lipid products could be prepared by the action of phospholipases in more efficient and more environment-friendly processes than those traditionally used. With the advances in protein engineering, modified phospholipases with desired new properties could be produced in microorganisms and thus their potential applications could be extended.