



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ana-Marija Lulić

PNPLA porodica enzima: karakterizacija i biološka uloga

Kemijski seminar 1

Poslijediplomski sveučilišni studij kemije, smjer: biokemija

Zagreb, 2021.

Sadržaj

§ 1. UVOD	1
§ 2. PNPLA PORODICA ENZIMA	3
2.1. Patatin	3
2.2. ADPN-skupina PNPLA porodice enzima	4
2.2.1. <i>PNPLA1</i>	5
2.2.2. <i>PNPLA2</i>	6
2.2.3. <i>PNPLA3</i>	9
2.2.4. <i>PNPLA4</i>	11
2.2.5. <i>PNPLA5</i>	12
2.3. NTE-skupina PNPLA porodice enzima.....	13
2.3.1. <i>PNPLA6</i>	14
2.3.2. <i>PNPLA7</i>	16
2.4. Zasebne skupine PNPLA porodice enzima: PNPLA8 i PNPLA9.....	17
2.4.1. <i>PNPLA8</i>	17
2.4.2. <i>PNPLA9</i>	20
§ 3. ZAKLJUČAK	25
§ 4. LITERATURNI IZVORI	xv

§ 1. UVOD

Serinske hidrolaze su jedna od najvećih klasa enzima koja broji više od 200 serinskih proteaza, ekstracelularnih i intracelularnih lipaza, kolinesteraza i pojedinih fosfolipaza, amidaza te peptidaza. U aktivnom mjestu serinskih hidrolaza nalazi se serin koji je najčešće dio katalitičke dijade ili trijade: Serin-Aspartat, tj. Serin-Histidin-Glutamat/Aspartat. Serin sadrži hidroksilnu skupinu koja je nukleofil, histidin je opća baza koja uzima proton hidroksilnoj skupini serina i čini ju boljim nukleofilom, a glutamat/aspartat je opća kiselina koja uzima proton histidinu i čini ga boljom općom kiselinom. U blizini aktivnog mjesta i katalitičke dijade/trijade nalazi se oksianionska šupljina koja stabilizira prijelazno stanje enzim-supstrat [1].

Mehanizam katalize serinskih hidrolaza sastoji se od dvije faze. U prvoj fazi hidroksilna skupina serina nukleofilno napada supstrat pri čemu dolazi do nastajanja tetraedarskog intermedijera acil-enzim. A u drugoj fazi dolazi do regeneracije enzima; voda nukleofilnim napadom "oslobađa" enzim iz kompleksa acil-enzim pa je enzim spreman za ponovni reakcijski ciklus [1].

Serinske hidrolaze sudjeluju u skoro svim biološkim procesima u sisavcima uključujući metabolizam, upalni odgovor, neurotransmisiju, oksidativni stres, odgovor na bakterijske infekcije, itd. [1]

PNPLA (engl. *patatin-like phospholipase domain containing proteins*) porodica enzima sastoji se od 9 članova; PNPLA1-PNPLA9. Svi članovi ove porodice enzima sadrže patatinsku domenu otkrivenu u enzimu patatin, glikoproteinu, koji je visoko zastupljen u gomolju krumpira. PNPLA enzimi pripadaju u veliku obitelj enzima fosfolipaza A2 koji kataliziraju reakciju hidrolize supstituenta koji se nalazi na poziciji *sn*-2 membranskih fosfolipida, a poznati su još i pod engleskim nazivom *Ca²⁺-independent phospholipases A2* (iPLA₂s) zato što za njihovu aktivnost nije potrebna prisutnost iona kalcija. Iako PNPLA enzimi pripadaju skupini fosfolipaza, određeni članovi iz ove skupine pokazuju hidrolitičku aktivnost prema triacilgliceridnim, kolesterolnim retinolnim esterskim supstratima [2,3].

Mutacije, genski polimorfizmi i nepravilna regulacija enzimske aktivnosti određenih članova ove porodice enzima povezane su s razvojem različitih bolesti što daje dodatan uvid u važnost

ovih enzima za normalnu funkciju organizma [2,3]. Npr. mutacije PNPLA2 povezane su s bolestima koje karakterizira akumulacija triglicerida u gotovo svim tkivima, a mutacije PNPLA3 povezane su s razvojem brojnih bolesti jetre [2,3]. Mutacije i nepravilna enzimska aktivnost PNPLA6 i PNPLA9 povezane su s razvojem neuroloških i neurodegenerativnih bolesti, a fiziološka uloga ostalih članova ove porodice enzima i njihova povezanost s bolestima još nije dovoljno istražena [2,3].

§ 2. PNPLA PORODICA ENZIMA

2.1. Patatin

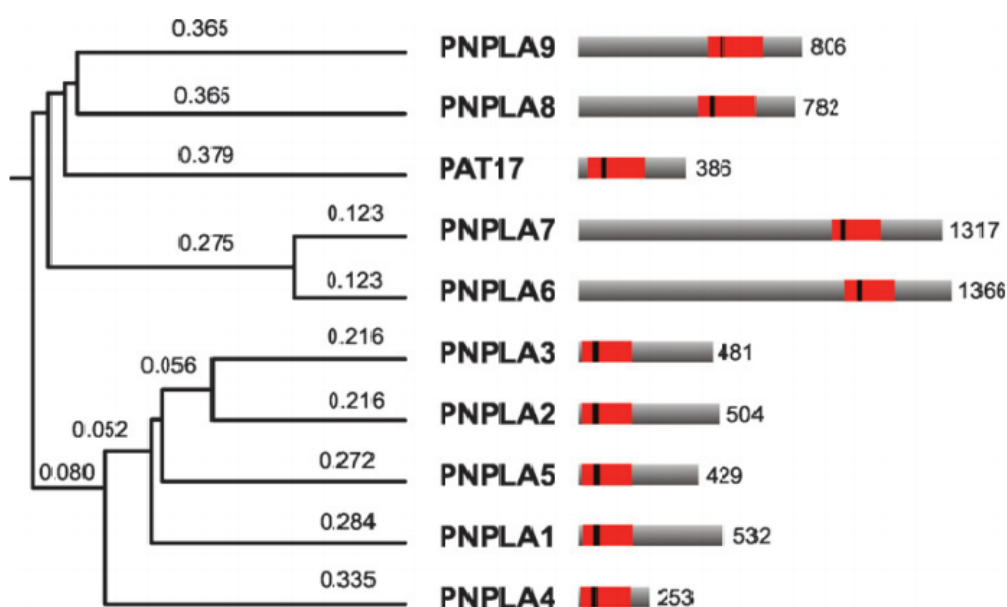
Patatin je nespecifična acil-hidrolaza koja hidrolizira široki spektar supstrata uključujući fosfolipide, triacilgliceride i retinolne estere [2,4]. Visoko je zastupljen u gomolju krumpira i ima ulogu u straničnoj signalizaciji, hidrolizi membranskih lipida i obrani od parazita. Za razliku od većine serinskih hidrolaza, patatin u aktivnom mjestu sadrži katalitičku dijadu koju čine serin i aspartat [2,4].

Serin je nukleofil, a aspartat ima ulogu i opće baze i opće kiseline u reakcijskom mehanizmu. Isto tako, u blizini aktivnog mjesta nalazi se oksianionska šupljina za stabilizaciju prijelaznog stanja enzim-supstrat.

Riješavanjem kristalne strukture patatina ustanovljeno je da je serin dio Gly-X-Ser-X-Gly motiva koji je dio $\alpha/\beta/\alpha$ trosloja [2,4]. Nukleofilni serin nalazi se na prijelazu iz β -ploče u α -zavojnici. Navedeni motivi su visoko očuvani u svim enzimima koji sadrže patatinsku domenu [2,4].

U prirodi postoji veliki broj enzima koji sadrže patatinsku domenu; ti enzimi su rasprostranjeni i u prokariotskim i u eukariotskim stanicama, a sudjeluju u velikom broju bioloških procesa uključujući metabolizam lipida, prijenos tvari preko membrane, indukcija sepse i mnogi drugi procesi. [2,4]

Jedna od skupina enzima s ovom domenom je i PNPLA porodica enzima koja se može podijeliti u dvije skupine: 1) ADPN skupina koju čine PNPLA1, PNPLA2, PNPLA3, PNPLA4 i PNPLA5, 2) NTE skupina koju čine PNPLA6 i PNPLA7 i na dva člana PNPLA8 i PNPLA9 koji ne pripadaju ni u ADPN ni NTE skupinu. Na **Slici 1** prikazan je filogenetski odnos i usporedba struktura svih članova PNPLA porodice enzima. [2]



Slika 1. Filogenetski odnos i usporedba struktura PNPLA enzima. Crvenom bojom prikazan je položaj patatinske domene, crnom vertikalnom linijom prikazan je položaj nukleofilnog serina, a broj s desne strane prikazuje duljinu proteina. Preuzeto iz ref. [2].

2.2. ADPN-skupina PNPLA porodice enzima

ADPN-skupinu PNPLA enzima sačinjavaju enzimi PNPLA1, PNPLA2, PNPLA3, PNPLA4 i PNPLA5, a naziv je dobila po adiponutrinu (PNPLA3) [2,4]. Enzimi iz ADPN-skupine sastoje se od N-terminalne i C-terminalne domene koja je varijabilna. U N-terminalnoj domeni nalazi se patatinska domena s aktivnim mjestom koju čine katalitička dijada Ser-Asp i oksianionska šupljina za stabilizaciju prijelaznog stanja enzim-supstrat. Serin je dio motiva Gly-X-Ser-X-Gly, a aspartat dio Asp-Gly-Gly/Ala motiva. Oba motiva visoko su očuvana među svim enzimima koji sadrže patatinsku domenu [5].

Lokalizacija u stanicima

U stanicima, PNPLA1, PNPLA2, PNPLA3 i PNPLA5 asocirani su s lipidnim kapljicama [5]. U C-terminalnoj domeni nalazi se sekvenca koja je dovoljna za asocijaciju s lipidnim kapljicama (LD, engl. *lipid droplets*), a asocijacija s LD je neovisna o enzimskoj aktivnosti [7]. Pokazano je da mutant ljudskog PNPLA1 enzima koji ne sadrži C-terminalnu domenu ne asocira s LD [6]. Iako pripadaju istoj grupi (ADPN-grupi), navedeni enzimi asociraju s LD putem različitih motiva. Istraživanja su pokazala da PNPLA5 sadrži arginin ili neku drugu aminokiselinu s pozitivno nabijen bočnim ogrankom na poziciji u rasponu od 358. do 361. aminokiseline u

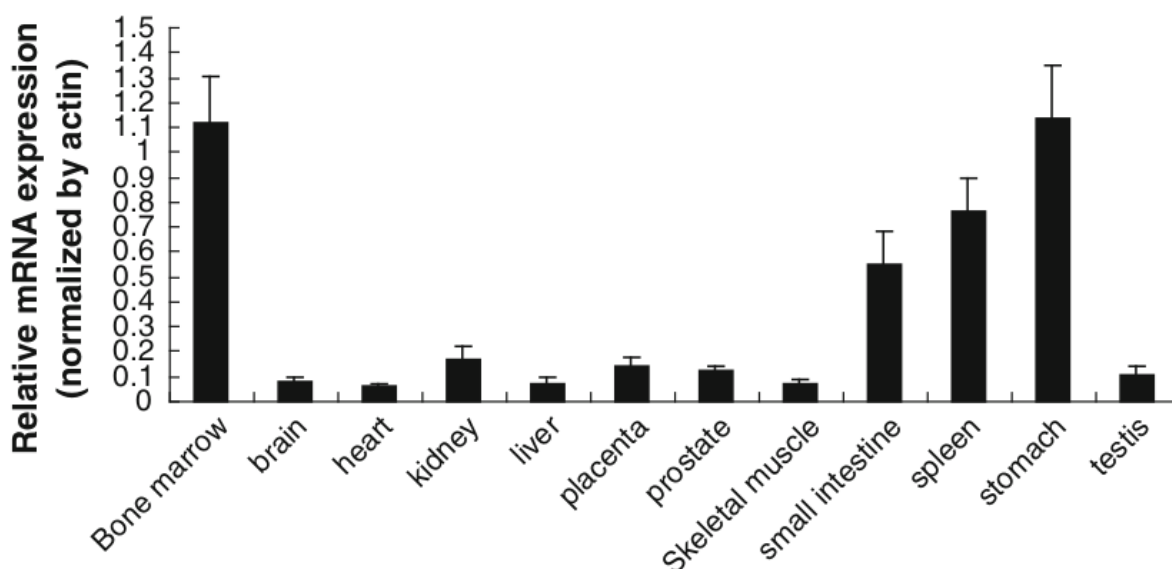
aminokiselinskom slijedu koji su važni za asocijaciju s LD [7]. Za razliku od PNPLA5, PNPLA2 sadrži kratku hidrofobnu domenu u području od 309. do 390. aminokiseline [7].

PNPLA4 je najmanji PNPLA enzim, ne sadrži C-terminalnu varijabilnu domenu pa je lokaliziran u citoplazmi [6,7].

2.2.1. *PNPLA1*

PNPLA 1 je relativno neistražen enzim, a mRNA PNPLA1 enzima eksprimirana je u skoro svim tkivima u relativno niskoj koncentraciji, a u višoj razini u tkivima probavnog sustava, slezeni i koštanoj srži (**Slika 2**) [6]. Također, metodom imunofluorescencije pokazana je visoka ekspresija mRNA PNPLA1 u epidermi (vanjskom sloju kože) i to u granularnom sloju kože. Smatra se da ovaj enzim ima ulogu u sintezi glicerofosfolipida, procesu koji je iznimno važan za diferencijaciju keratinocita [8].

Mutacije u genu koji kodira PNPLA1, i to u C-terminalnoj domeni preko koje enzim asociira s lipidnim kapljicama, povezane su s razvojem jednog tipa urođene bolesti kože, točnije ihtioze koja se naziva ARCI (engl. *autosomal recessive congenital ichthyoses*) [8].

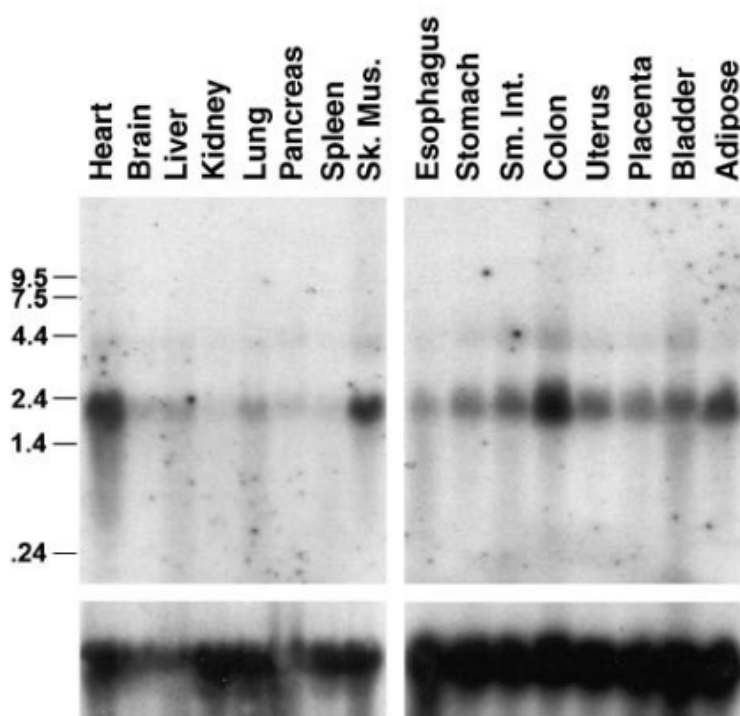


Slika 2. Razina ekspresije mRNA PNPLA1 enzima u različitim ljudskim tkivima normalizirano u odnosu na β -aktin. Preuzeto iz ref. [6].

2.2.2. PNPLA2 (*ATGL*, *desnutrin*)

PNPLA2 katalizira prvu reakciju u razgradnji triacilglicerida (TG), a produkti razgradnje TG su diacilgliceridi (DG) i neesterificirane masne kiseline (NEFA, engl. *non-esterified fatty acids*) [10,11]. Istraživanja su pokazala da PNPLA2 pokazuje fosfolipaznu i transacilaznu aktivnost, ali u puno nižoj razini u odnosu na triacilgliceridnu hidrolaznu aktivnost. Ovaj enzim ne hidrolizira monoacilgliceride, kolesterolne i retinolne estere [2]. Ekspresija mRNA PNPLA2 regulirana je ovisno o potrebi organizma za energijom. Stoga, u stanju gladi mRNA PNPLA2 je visoko eksprimirana, a u stanju sitosti ekspresija je niska [10,11].

mRNA PNPLA2 visoko je eksprimirana u masnom tkivu, a prisutna je i u skoro svim tkivima ljudskog organizma u nižoj razini uključujući srčani mišić, skeletni mišić, testis, jetra, itd. (Slika 3) [5]. Postoje dva tipa masnog tkiva; bijelo masno tkivo, WAT (engl. *white adipose tissue*) i smeđe masno tkivo, BAT (engl. *brown adipose tissue*). Također, PNPLA2 je visoko eksprimiran tijekom diferencijacije 3T3-L1 mišjih stanica u adipocite [9-11].



Slika 3. Razina ekspresije mRNA PNPLA2 enzima u različitim ljudskim tkivima normalizirano u odnosu na β -aktin. Preuzeto iz ref [5].

Lipoliza i lipidne kapljice

PNPLA2 je enzim koji katalizira prvu reakciju u lipolizi, tj. u razgradnji TG za dobivanje energije u stanici. Produkti razgradnje TG-a su neesterificirane masne kiseline, di- i monoacilgliceridi [10-13].

Lipoliza je proces koji se sastoji od 3 koraka, a započinje reakcijom razgradnje TG u diacilgliceride i NEFA koju katalizira PNPLA2 [11-13]. U drugom koraku HSL (engl. *hormon sensitive lipase*) razgrađuje diacilgliceride u monoacilgliceride i NEFA. U zadnjem koraku monoglicerid lipaza (MGL) razgrađuje monoacilgliceride u glicerol i NEFA. Produkti dobiveni lipolizom – NEFA mobiliziraju se u tkiva kojima je potrebna energija, a glicerol ulazi u proces glukoneogeneze u jetri. Osim što su izvor energije, NEFA sudjeluju u regulaciji ekspresije određenih gena, ligandi su za određene nuklearne receptore, itd. Povećana razina NEFA uzrokuje oštećenja membrana raznih organela što naposljetku može dovesti i do smrti stanica zbog čega se one pohranjuju u obliku triacilglicerola u LD [9,10].

LD ili adiposomi su dinamični organeli koji se nalaze u citosolu u skoro svim stanicama u tijelu. U središtu, LD sadrže triacilgliceride i kolesteril-estere, a središte je omeđeno membranom koju čini fosfolipidni sloj [9]. Sastav LD i proteina koji su asocirani na njihovoj membrani ovisi o tipu stanice i tkivu [9].

Regulacija PNPLA2

PNPLA2 je prisutan i u citosolu i asociran s LD. PNPLA2 se aktivira interakcijom s enzimom CGI-58 (engl. *comparative gene identification-58*) koji je poznat i pod nazivom ABHD5 (engl. *α/β hydrolase domain containing protein 5*) jer sadrži α/β hidrolaznu domenu karakterističnu za lipaze, esteraze i tioesteraze [12]. CGI-58 povećava aktivnost PNPLA2 oko 5 puta u ljudskom organizmu [12].

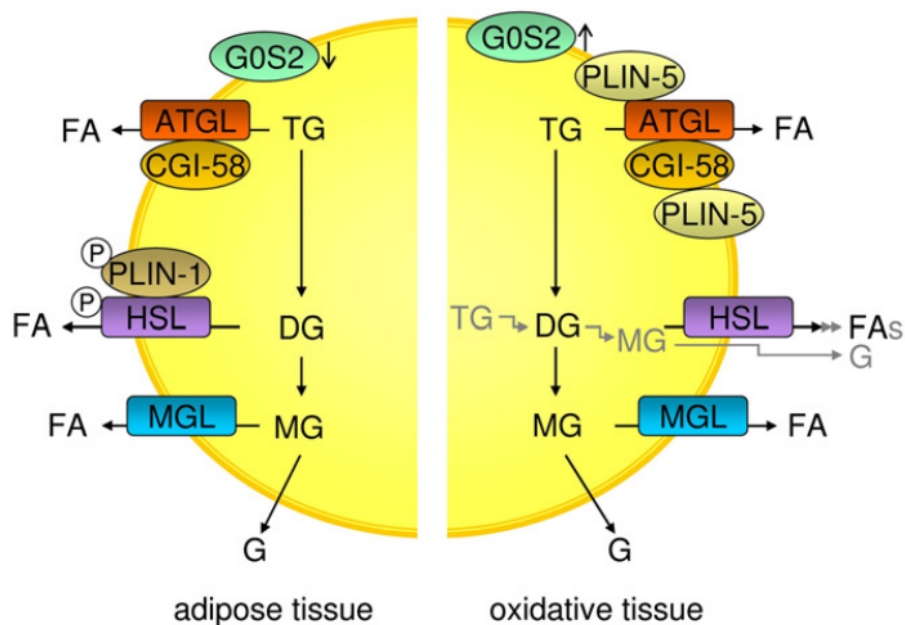
CGI-58 eksprimiran je i u epidermalnom sloju kože pa potencijalno može stimulirati i neku drugu, zasad nepoznatu triacilglicerid hidrolazu [13].

U bazalnim uvjetima CGI-58 je asociran s perilipinom-1 na lipidnim kapljicama u masnom tkivu. Perilipin je enzim koji je vezan na LD i u bazalnim uvjetima ovaj enzim štiti LD od lipolize [13]. β -adrenergičnom (hormonskom) stimulacijom dolazi do aktivacije protein kinaze A koja fosforilira perilipin na nekoliko aminokiselinskih bočnih ogranaka što dovodi do oslobađanja CGI-58 iz interakcije s perilipinom-1 [13]. Tako disocirani CGI-58 interagira s

PNPLA2 i stimulira hidrolizu triacilglicerida, tj. lipolizu. Maksimalna stimulacija lipolize postiže se ekvimolarnom koncentracijom PNPLA2 i njegovog aktivatora CGI-58 [13]. Istraživanja su pokazala da se aktivacija PNPLA2 postiže interakcijom aminokiselinske sekvence koja se nalazi u patatinskoj domeni N-terminalnog dijela enzima, a C-domena ima inhibitorni utjecaj na aktivaciju PNPLA2 pomoću CGI-58 [13]. Smanjenje koncentracije cAMP-a u citosolu uzrokuje ponovno vezanje CGI-58 na perilipin-1 (Slika 4) [13].

Također, otkriven je i G0S2 protein koji selektivno inhibira pnpla2 interakcijom s N-terminalnom domenom PNPLA2. [10-12]

Proces regulacije aktivnosti PNPLA2 još nije dovoljno istražen u ostalim tkivima (tkivima poput srca i skeletnih mišića koji energiju dobivaju procesom oksidacije masnih kiselina) jer je perilipin-1 eksprimiran u maloj koncentraciji ili uopće nije eksprimiran [13]. Međutim, istraživanja su pokazala da je perilipin-5 eksprimiran u srcu i skeletnim mišićima [13]. Ekspresija perilipina-5 znatno povećava asocijaciju PNPLA2 i CGI-58 s LD i njihovu interakciju. U stanju gladi, perilipin-5 direktno veže PNPLA2 i CGI-58 i regrutira ih na LD [11-13].



Slika 4. Proces lipolize u masnom tkivu i tkivima u kojem se energija dobiva oksidacijom masnih kiselina u stanju gladi. TG – triacilgliceridi, DG – diacilgliceridi, MG – monoacilgliceridi, G – glicerol, PLIN1 – perilipin-1, PLIN5 – perilipin-5. Preuzeto iz ref. [13].

Mutacije u PNPLA2 i CGI-58 i povezani sindromi

Mutacije u genima koji kodiraju PNPLA2 i CGI-58 povezane su s razvojem NLS (engl. *neutral lipid storage disease*) [2,13]. NLS je rijetki genetički sindrom kojeg karakterizira akumulacija triacilglicerida u skoro svim tkivima u tijelu što dovodi do pojave miopatije u skeletnim mišićima i srcu te steatoze u jetri [12,13]. Mutacija u genu koji kodira PNPLA2 dovodi do razvoja NLS sindroma s miopatijom, a kod pacijenata kod kojih je prisutna mutacija u genu koji kodira CGI-58, također, dolazi do razvoja NLS sindroma, ali uz pojavu ihtioze [12,13].

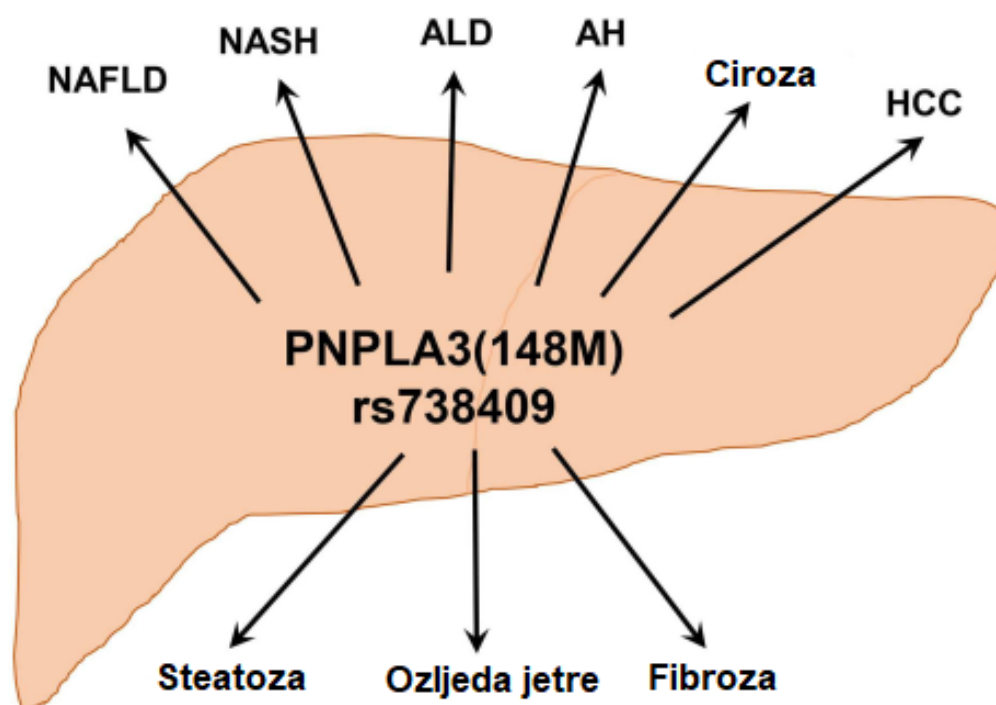
2.2.3. PNPLA3 (adiponutrin)

PNPLA3 je privukao pažnju otkrićem polimorfizma u genu koji kodira adiponutrin u kojem je citozin mutiran u gvanin pri čemu dolazi do zamjene aminokiseline izoleucina u metionin na poziciji 148 [2,3,14]. Brojna istraživanja pokazala su da je ovaj mutirani oblik adiponutrina povezan s raznim bolestima jetre poput NAFLD (engl. *non-alcoholic fatty liver disease*), nealkoholnog steatohepatitisa (upala jetre), fibroze, ciroze pa i raka jetre [2,3].

PNPLA3 je triacilglicerid lipaza koja katalizira reakciju pretvorbe lizofosfatidilne kiseline u fosfatidilnu kiselinu [14]. Osim toga, PNPLA3 pokazuje i acilglicerol transacilaznu aktivnost specifičnu za lizofosfatidilnu kiselinu i acil-CoA pri čemu acilna skupina mora imati 16 ili više ugljikovih atoma [14]. U stanici, PNPLA3 je pretežito asociiran s LD. U tkivima, PNPLA3 pokazuje najveću ekspresiju u jetri, a umjerenu ekspresiju u masnom tkivu, mozgu, bubrezima i koži [5]. Također, uočeno je da PNPLA3 visoko eksprimiran za vrijeme diferencijacije 3T3-L1 mišjim stanicama za vrijeme njihove diferencijacije u adipocite [2,14]. PNPLA3 pokazuje najviši postotak homologije sa PNPLA2 [2,5]. Različiti faktori poput hormona, agonista, nutrijenata reguliraju ekspresiju ovih enzima, ali u suprotnim smjerovima [2,5]. Za razliku od PNPLA2, ekspresija PNPLA3 u stanju gladi je niska na temelju čega se pretpostavlja da PNPLA3 sudjeluje u sintezi lipida [5,14].

Povezanost s bolestima jetre

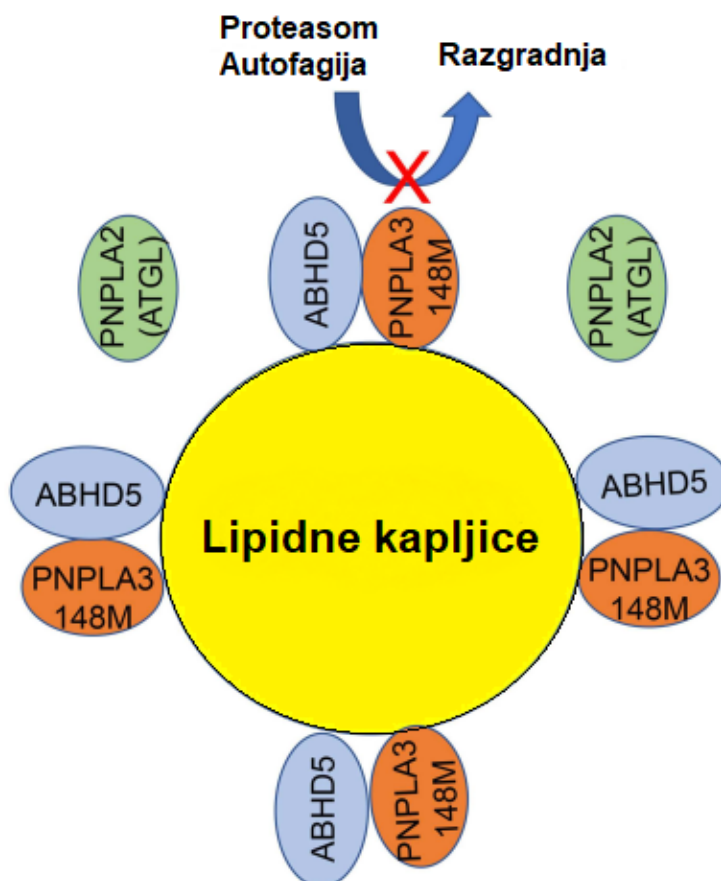
Prekomjerno nakupljanje triacilglicerida u jetri je jedna od prvih obilježja NAFLD sindroma koji može napredovati u nealkoholni steatohepatitis i naposljetku u cirozu jetre. Veliki broj istraživanja pokazao je snažnu asocijaciju varijante PNPLA3 proteina (rs738409) u kojem je izoleucin zamijenjen metioninom na poziciji 148 (148M) sa različitim bolestima jetre (**Slika 5**) [14]. *In vitro* istraživanja pokazala su da je triacilglicerid hidrolazna aktivnost mutiranog proteina smanjena za više od 80 % [14].



Slika 5. Povezanost mutiranog oblika PNPLA3 (148M) s različitim bolestima jetre. NAFLD – *non-alcoholic fatty liver disease*, NASH – *non-alcoholic steatohepatitis*, ALD – *alcoholic liver disease*, AH – *alcoholic hepatitis*, HCC – hepatocelularni rak jetre. Preuzeto i prilagođeno iz ref [14].

Također, istraživanja su pokazala da navedena mutacija čini protein rezistentan na ubikvitilaciju zbog čega se ovaj protein ne razgrađuje u proteasomu niti autofagijom [16]. Rezistentnost na ubikvitilaciju uzrokuje abnormalnu akumulaciju mutiranog proteina na LD što onemogućuje normalan metabolizam lipida. Pretpostavlja se da pretjerana akumulacija na lipidnim kapljicama onemogućuje normalnu aktivnost PNPLA2 s kojim kompetira za protein

CGI-58, aktivator PNPLA2 (Slika 6). Također, pokazano je da je CGI-58 potreban za asocijaciju PNPLA3 sa LD, a mutacija 148M uzrokuje jaču interakciju mutiranog PNPLA3 sa CGI-58. [15,16]



Slika 6. Pretpostavljeni mehanizam nakupljana mutiranog oblike PNPLA3 enzima na lipidnim kapljicama. ABHD5 – CGI-58, aktivator PNPLA2. Preuzeto i prilagođeno iz ref [15].

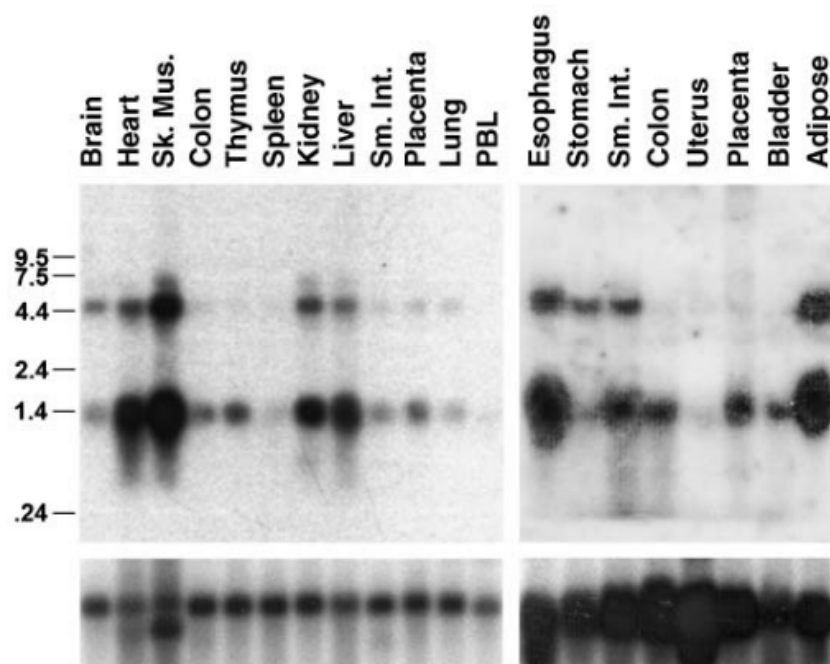
2.2.4. *PNPLA4 (GS2)*

PNPLA4, najmanji PNPLA enzim, eksprimiran je u gotovo svim tkivima uključujući masno tkivo, jetru, mišićime, bubrege, pluća, placentu i mozak (Slika 7) [5]. PNPLA4 hidrolizira triacilgliceride, a pokazuje i retinol transacilaznu aktivnost [2,12]. Također, PNPLA4 katalizira reakciju prijenosa acilnog lanca s jedne diacilgliceridne molekule na drugu pri čemu dolazi do nastajanja triacilglicerida i monoacilglicerida [2,12].

PNPLA4 sudjeluje i u metabolizmu retinolnih estera. Retinoidi (vitamin A i njegovi metaboliti) su klasa lipida koji imaju ulogu u važnim biološkim procesima poput rasta i diferencijacije epitelnih stanica, rasta koštanog tkiva, imunološkog sustava i aktivacije

tumor-supresorskih gena. Višak retinoida u tijelu pohranjuje se u obliku retinolnih estera posebice u LD u jetri [17].

Pretpostavlja se da ovaj enzim hidrolizira retinolne estere u keranocitama u koži [18]. Koža je najveći ljudski organ, a rast, diferencijacija i razvoj kože uvelike ovisi o retionoidima [18].



Slika 7. Razina ekspresije mRNA PNPLA4 enzima u različitim ljudskim tkivima normalizirano u odnosu na β -aktin. Preuzeto iz ref. [5].

2.2.5. *PNPLA5 (GS2-like)*

mRNA PNPLA5 eksprimirana je u gotovo svim tkivima čovjeka u niskoj koncentraciji, a najviše u mozgu i hipofizi [20]. Ekspresija gena PNPLA5 slična je ekspresiji PNPLA3. Tijekom stanja gladi, ekspresija mRNA je niska, a ekspresija je povećana tijekom diferencijacije adipocita [19].

Istraživanja su pokazala da je ovaj enzim esencijalan za optimalnu inicijaciju autofagije [20]. Autofagija je proces u kojemu stanica uklanja proteinske agregate, intracelularne patogene, organele u suvišku i oštećene organele. Prvi korak autofagije je nastajanje fagofora, prekursora koji se proširuje i zatvara u autofagosom koji je omeđen dvostrukom membranom [20]. Autofagosom uzima dijelove citoplazme ili specifične mete i spaja se s lizosomom u kojemu se razgrađuje sadržaj autofagosoma. U stanici, PNPLA5 je asociiran s LD, staničnim organelima u kojima se pohranjuju triacilgliceridi i neutralni lipidi. Neutralni lipidi potrebni su za biogenezu membrana autofagosoma zbog čega su bitne lipaze triacilglicerida [20].

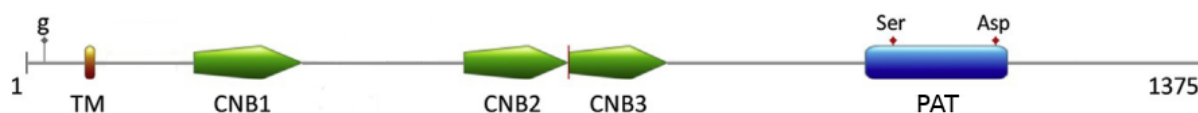
Pretpostavlja se da lipidne kapljice i triacilgliceridi doprinose nastajanju membranskog dvosloja autofagosoma putem PNPLA5 [20]. Također, postoji mogućnost da diacilgliceridi, produkti hidrolize triacilglicerida doprinose staničnoj signalizaciji ili zakrivljenosti membrane autofagosoma [20]. Disfunkcionalna autofagija povezana je sa starenjem, razvojem tumora, neurodegeneracije i upalnim procesima. [20]

2.3. NTE-skupina PNPLA enzima

U ovu skupinu pripadaju 2 enzima – PNPLA6 i PNPLA7. Ova 2 člana su membranski proteini asocirani s endoplazmatskim retikulumom (ER), sastoje se sastoje od N-terminalne i C-terminalne domene, a pretpostavljena organizacija domena prikazana je na **Slici 8** [21,22]. U N-terminalnoj domeni nalazi se transmembranski (TM) segment i regulatorni (R) segment u kojem se nalaze 3 vezna mjesta za cikličke nukleotide (CNB1-3) [21,22]. U C-terminalnoj domeni nalazi se patatinska domena s aktivnim mjestom (Ser-Asp) i oksianionska šupljina. Istraživanja su pokazala da je C-terminalna jedinica katalitički kompetentna i bez prisutnosti N-terminalne domene [22,26]. Također, istraživanja su pokazala da ciklički nukleotidi ne utječu na katalitičku aktivnost C-domene [21,22,26].

N-terminalni kraj enzima orijentiran je prema lumenu endoplazmatskog retikuluma, a ostatak enzima (R-segment i C-terminalna domena) prema citosolu [21,22]. PNPLA6 je asociran s ER preko TM-segmenta, a za pravilnu asocijaciju PNPLA7 s ER, potrebna je cijela N-terminalna domena [21,22].

Također, sama C-terminalna jedinica oba enzima pokazuje visoki afinitet za asocijaciju s LD i ta asocijacija neovisna je o enzimskoj aktivnosti [21,22]. Rezultati istraživanja na PNPLA6 pokazala su da cijeli enzim ne asocira s lipidnim kapljicama i da ta asocijacija ovisi o R-segmentu [22]. Delecijom R-segmenta, enzim asocira s LD čak i u prisutnosti TM segmenta. Istraživanja na PNPLA7 pokazala su da je za pravilnu asocijaciju cijelog enzima s LD bitan je R-segment i to CNB3 vezno mjesto [21]. Utjecaj cikličkih nukleotida na asocijaciju PNPLA6 s LD nije istražen [21,22].



Slika 8. Organizacija domena PNPLA6 enzima. TM – transmembranski segment, CNB1-3 – vezna mjesta za cikličke nukleotide, PAT – patatinska domena.. Preuzeto i prilagođeno iz ref. [22].

2.3.1. PNPLA6 (NTE)

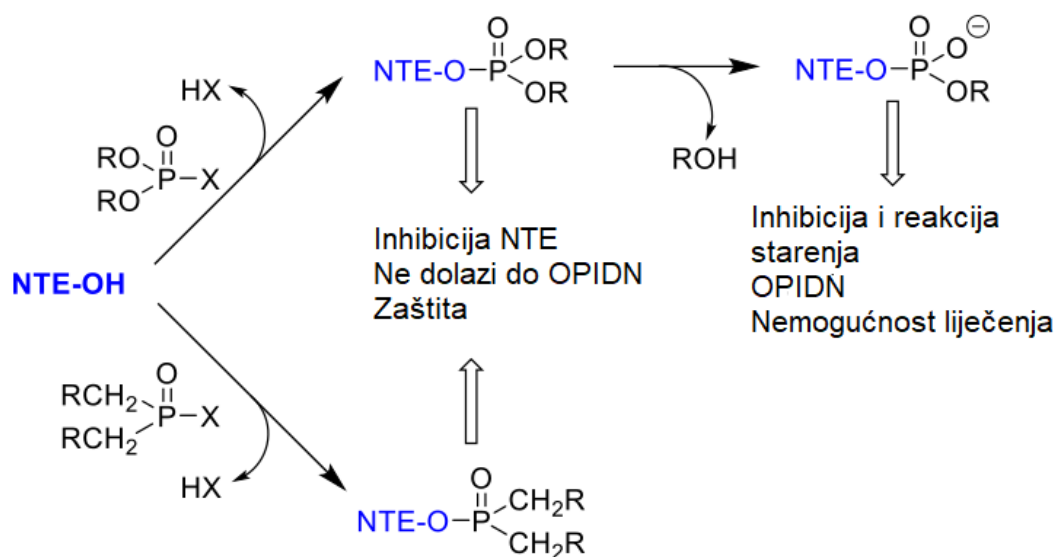
PNPLA6 pokazuje najveću razinu ekspresije u mozgu i limfocitima, a u nižoj razini enzim je ekprimiran je i u tkivima poput leđne moždine, jetre, bubrezima, placenti, slezeni [23,25]. PNPLA6 je (lizo)fosfolipaza B koja katalizira hidrolizu acilnih lanaca sa pozicije *sn*-1 i *sn*-2 fosfolipida, a preferentno hidrolizira fosfatidilkolin i lizofosfatidilkolin [22]. PNPLA6 potencijalno ima ulogu u održavanju homeostaze i fluidnosti membrane [25].

OPIDN (engl. organophosphate-induced delayed neuropathy)

PNPLA6, enzim poznat i pod engleskim nazivom *neuropathy target esterase* (NTE), otkriven je prije više od 50 godina kao meta visokotoksičnih organofosfatnih (OP) spojeva. Inhibicija PNPLA6 enzima organofosfatnim spojevima uzrokuje sindrom OPIDN kojeg karakterizira degeneracija dugačkih aksona u leđnoj moždini i perifernom živčanom sustavu [23,24]. Simptomi se najčešće pojavljuju 8-14 dana od izloženosti OP spojevima, a neki od simptoma su slabost, gubitak koordinacije mišićnih pokreta, utrnulost, trnci i grčevi u mišićima donjih udova [2,22,23,25].

Mehanizam inhibicije PNPLA6 enzima OP spojevima prikazan je na **Slici 9** [23]. U prvom koraku reakcije OP-a s PNPLA6 započinje nukleofilnim napadom hidroksilne skupine serina iz katalitičke dijade na fosforov atom iz organofosfatne skupine pri čemu do nastajanja prijelaznog stanja trigonsko bipiramidalne geometrije. Kovalentnom acilacijom, izlazna skupina izlazi iz kompleksa pri čemu dolazi do nastajanja tetraedarskog produkta. Organofosfatni spojevi koji u svojoj strukturi sadrže kemijsku vezu poput P-O-R ili P-NH-R podliježu reakciji starenja pri čemu dolazi do izlaska R-skupine (**Slika 9**) [23,24]. Reakcijom starenja fosfatna skupina je negativno nabijena i ostaje kovalentno vezana na serin u aktivnom mjestu. Tako negativno nabijena skupina je stabilizirana vodikovim vezama u oksianionskoj šupljini enzima. Enzim u ovakvom kompleksu je jako teško reaktivirati zbog prisutnog negativnog naboja na fosfatnoj skupini [23,24].

Za razvoj OPIDN sindroma, najmanje 70 % PNLA6 enzima u živčanom sustavu mora biti inhibirano i OP spoj mora podlijeći reakciji starenja [23,24].



Slika 9. Mehanizam inhibicije PNPLA6 enzima OP spojevima. Preuzeto i prilagođeno iz ref. [24].

OP spojevi koji mogu inhibirati PNPLA6 mogu se podijeliti u 2 skupine (Slika 10): 1) fosfati, fosfonati, fosforamidati – spojevi koji inhibiraju enzim i podliježu reakciji starenja i 2) karbamati, sulfonil fluoridi i fosfinati – spojevi koji inhibiraju enzim, ali ne podliježu reakciji starenja. Duga izloženost ovog enzima spojevima koji ne podliježu reakciji starenja uzrokuju inhibiciju enzima što, također, pruža zaštitu enzima od OP koji uzrokuju neuropatiju [23,24].

Aktivnost PNPLA6 može se mjeriti koristeći njegov sintetski supstrat fenil-valerat, a definira se kao aktivnost koja je otporna na OP koji je uzrokuje neuropatiju, npr. paraokson i aktivnost koja je osjetljiva na OP koji uzrokuju neuropatiju, npr. mipafoks [23,24]

<p>TIP 1 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>	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{X}-\text{P}-\text{N}-\text{R}' \\ \\ \text{N}-\text{R}' \\ \\ \text{R} \end{array}$ <p>Fosforamidat</p>
<p>TIP 2 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>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{X}-\text{C}-\text{N}-\text{R}' \\ \\ \text{R}' \end{array}$ <p>Karbamat</p>

Slika 10. Inhibitori PNPLA6. Preuzeto i prilagođeno iz ref. [24].

Povezanost s ostalim bolestima

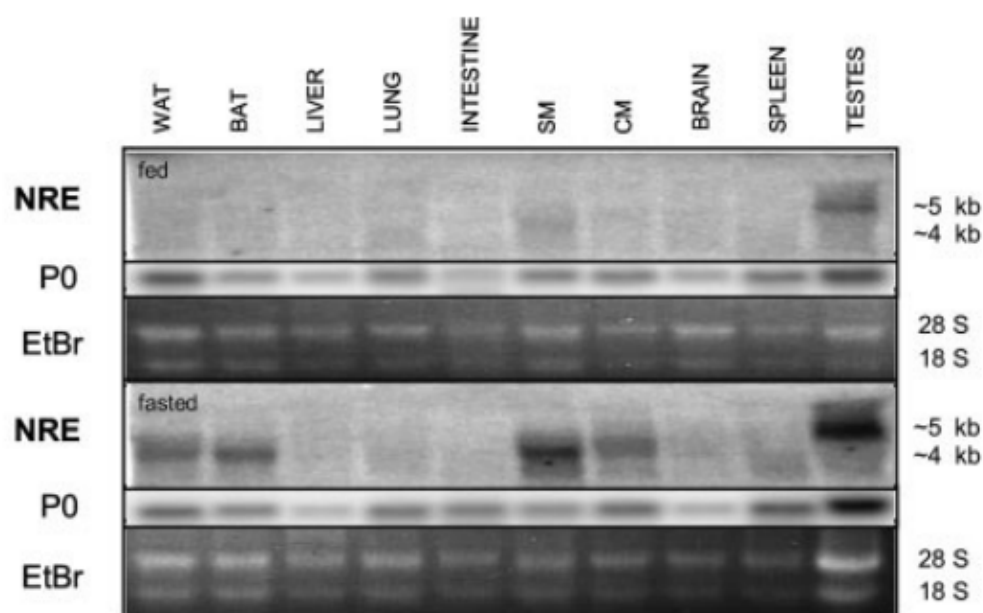
U istraživanjima, pokazano je da je knock-out PNPLA6 na modelu miša letalan zbog zatajenja posteljice i poremećenog razvoja krvnih žila u embrionalnom razvoju što uzrokuje smrt embrija već nakon 8 dana. Rezultati istraživanja pokazuju da smanjena ekspresija PNPLA6 enzima tijekom embrionalnog razvoja ima negativan utjecaj na razvoj živčanog, krvnog i dišnog sustava [22,25].

Također, “*loss-of-function*“ mutacije PNPLA6 povezane su sa nekoliko neurodegenerativnih sindroma poput bolesti motornih neurona, nasljedne spastične paraplegije 39 (SPG39), Boucher-Neuhäuser sindrom, Gordon-Holmes sindrom, Oliver-McFarlane sindrom i Laurence-Moon sindrom [22,24,25].

2.3.2. *PNPLA7 (NRE)*

PNPLA7, poznat i pod nazivom NRE (*NTE-related esterase*) je lizofosfolipaza koja hidrolizira lizofosfatidilkolin (LPC), lizofosfatidiletanolamin (LPE) i lizofosfatidilserin (LPS) te preferira nezasićene vrste [21,26]. mRNA PNPLA7 najviše je ekspimirana u tkivima koja su meta inzulina uključujući masno tkivo, srce i skeletne mišiće [26]. Također, visoka ekspresija mRNA PNPLA7 prisutna je i u testisima, u tkivu u kojemu je prisutan visoki obrat lipida [2,26]. Istraživanja su pokazala da se ekspresija mRNA PNPLA7 smanjuje povećanjem koncentracije inzulina (**Slika 11**) [26].

Supstrati PNPLA7, lizofosfolipidi, su klasa lipida koji izgrađuju staničnu membranu i utječu na zakrivljenost membrana. Osim toga, lizofosfolipidi su ekstracelularne signalne molekule koje su uključene u različite biološke procese poput regulacije metabolizma glukoze i masnih kiselina, upalnih procesa i apoptoze [26]. PNPLA7 ima ulogu u metabolizmu lipida, ali točna fiziološka uloga u organizmu još nije poznata. [21,26]



Slika 11. Razina ekspresije mRNA PNPLA7 u različitim ljudskim tkivima u stanju gladi i u stanju sitosti. WAT – *white adipose tissue* (bijelo masno tkivo), BAT – *brown adipose tissue* (smeđe masno tkivo), SM – *skeletal muscle* (skeletni mišići), CM – *cardiac muscle* (srčani mišić). Preuzeto iz ref.[26].

2.4. Zasebne skupine PNPLA enzima: PNPLA8 i PNPLA9

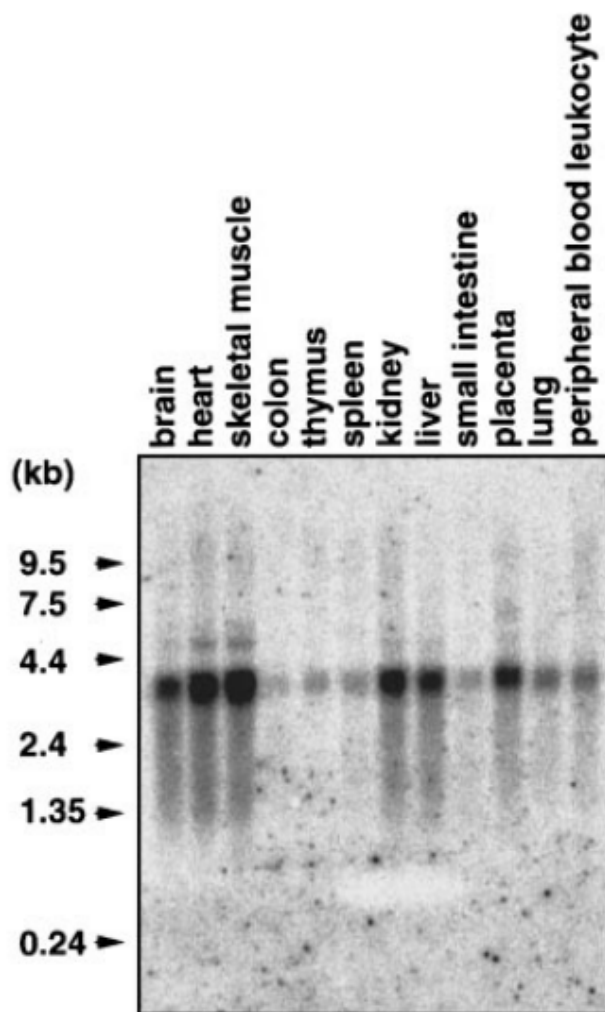
2.4.1. *PNPLA8*

PNPLA8 je membranski protein koji se sastoji od C-terminalne domene u kojoj se nalazi patatinska domena s aktivnim mjestom i N-terminalne domene bogate serinom i treoninom, potencijalnim mjestima fosforilacije protein kinaza [27]. PNPLA8 asocira s peroksisomom ili mitohondrijem ovisno o tome je li u C-terminalnoj domeni prisutna peroksisomalna ili mitohondrijska lokalizacijska sekvenca [27].

Najviše je ekspimiran u srcu, razina ekspresije je niža u placenti i skeletnim mišićima, a najniža u mozgu, jetri, gušterači i plućima (**Slika 12**) [27].

U stimuliranim stanicama, PNPLA8 katalizira reakciju hidrolize zasićenih ili monozasićenih masnih kiselina sa *sn*-1 ili *sn*-2 položaja diacil-fosfatidilkolinskih (PC) supstrata [28]. Inkubacija pročišćenog PNPLA8 enzima s 1-palmitoil-2-arahidonoil-*sn*-glicero-3-PC supstratom rezultira akumulacijom 2-arahidonoil-lizofosfatidilkolina (2-AA-LPC), lipida koji je prirodno zastupljen u ljudskom srcu [28]. 2-arahidonoil-LPC je intermedijer u staničnoj signalizaciji i može metabolizirati u endokanabinoide te biti izvor arahidonske kiseline ili

2-arahidonoil-lizofosfatidilne kiseline, bioaktivnih molekula uključenih u eikozanoidnu signalizaciju [28]. Također, pročišćeni enzim hidrolizirao je reakciju u kojoj je došlo do oslobađanja arahidonske kiseline sa *sn*-2 pozicije plazmenilkolina [28]. Arahidonska kiselina i njeni metaboliti u eikozanoidnom signalnom putu su izrazito važni za staničnu signalizaciju i dobivanje energije u srčanom mišiću [28,29].



Slika 12. Razina ekspresije mRNA PNPLA8 u različitim ljudskim tkivima. Preuzeto iz ref. [27].

Fiziološka uloga

Iako fiziološka uloga i mehanizam regulacije enzimske aktivnosti još nisu u potpunosti razjašnjeni, rezultati istraživanja na PNPLA8 knock-out modelima na miševima ukazuju na važnost PNPLA8 u održavanju homeostaze fosfolipida u srčanom mišiću i normalnoj funkciji mitohondrija [30].

Pojedina istraživanja su pokazala da PNPLA8 sudjeluje u regulaciji metabolizma lipida u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani, a promjene u unutarnjoj membrani mitohondrija mogu utjecati na oksidaciju masnih kiselina, potrošnju kisika, trošenje energije i, naposljetku, homeostazu tkiva [30]. Također, pokazano je da PNPLA8 ima ulogu u metabolizmu kardiolipina. Kardiolipin je fosfolipid koji je isključivo zastupljen u membrani mitohondrija i neophodan je za normalnu funkciju mitohondrija [30].

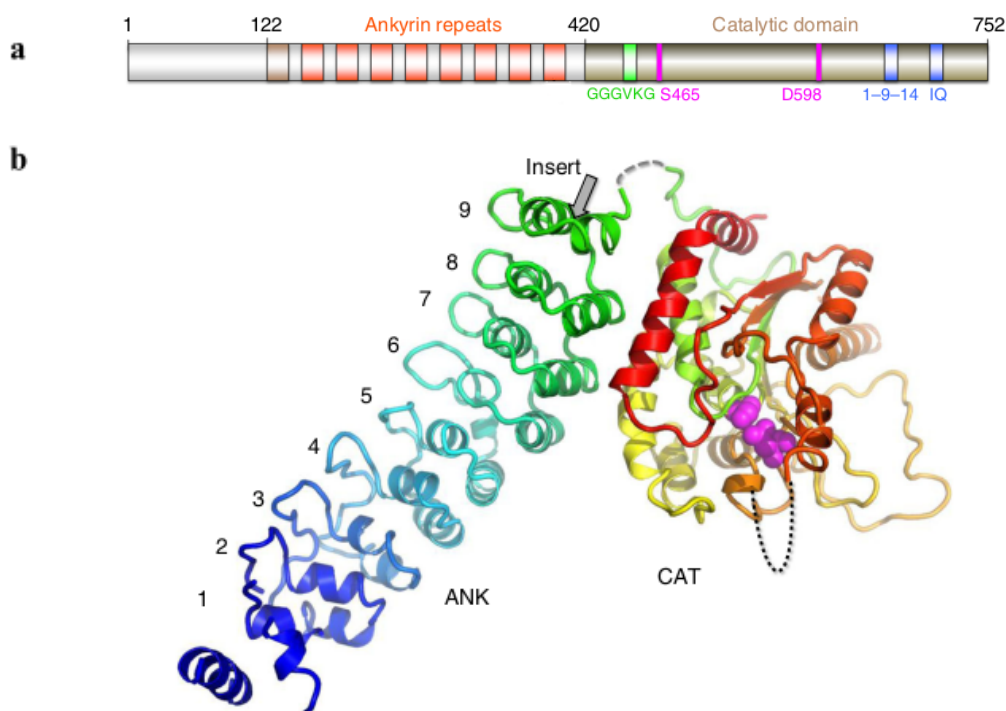
Delecija gena koji kodira PNPLA8 (knock-out) u miševima rezultira atrofijom i slabošću u mišićima, smanjenom tolerancijom na hladnoću zbog poremećene razgradnje masti u smeđem masnom tkivu i nepravilnom funkcijom kompleksa IV (jedan od 4 kompleksa elektronskog transportnog lanca) [30]. Mišićna atrofija popraćena je poremećajima u razgradnji masnih kiselina, oksidacijom i degeneracijom mitohondrija, smanjenom koncentracijom kardiolipina i ATP-a te povećanoj razgradnji lipida peroksidacijom [30]. Uočeno je da poremećaji u mitohondrijskoj razgradnji masnih kiselina utječu i na sposobnost korištenja i ugljikohidrata i masti kao izvora energije. Većina navedenih simptoma povezana je sa promjenama u sastavu kardiolipina [30].

Naime, mitohondriji su jedan od najvažnijih staničnih izvora reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*), a kardiolipin je jedna od meta ROS-a jer je bogat linoleinskom kiselinom i jer je lokaliziran u unutarnjoj membrani mitohondrija. ROS su inicijatori lipidne peroksidacije, a peroksidacija kardiolipina u mitohondriju potencijalno može inicirati apoptozu [30]. Stoga, PNPLA8 potencijalno može imati ulogu u "popravku" peroksidiranog kardiolipina u mitohondriju i na taj način braniti stanicu od stanične smrti [30].

Povezanost PNPLA8 s bolestima zasad još nije dovoljno proučeno. Nekoliko istraživanja predložila su ulogu PNPLA8 u tzv. Bolesti Chaga koju uzrokuje parazit *Trypanosoma cruzi* [3]. Jedno kliničko istraživanje pokazalo je da odsutnost PNPLA8 uzrokuje simptome slične PNPLA8 knock-out miševa poput nefunkcionalnosti srčanog mišića, kognitivnih defekata i degeneracije mitohondrija [3].

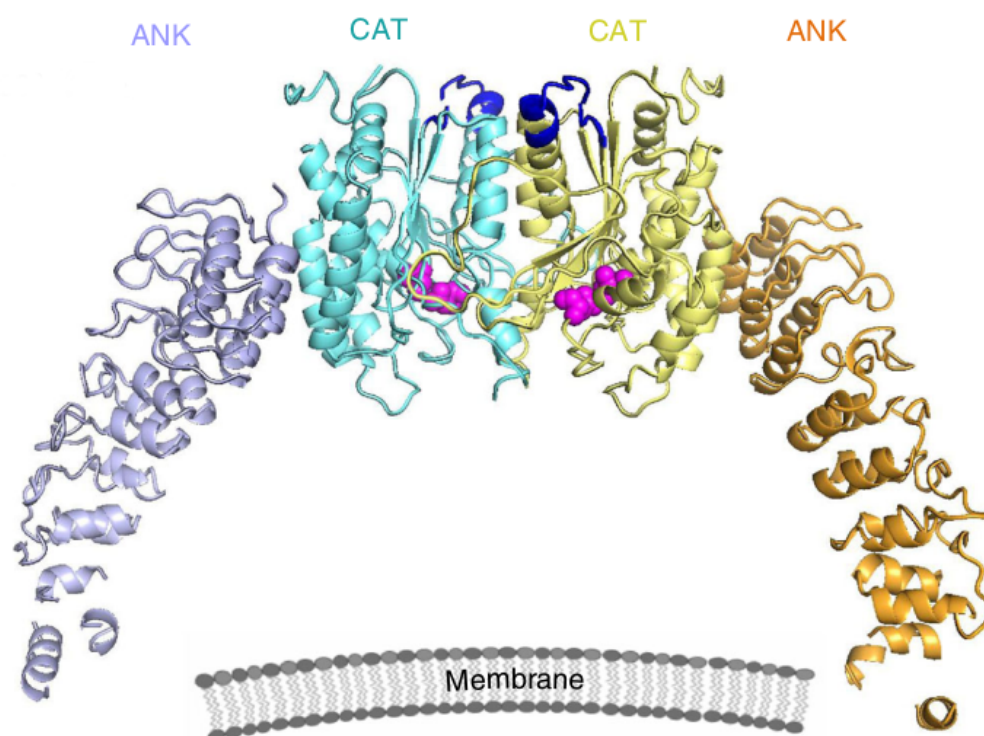
2.4.2. *PNPLA9*

PNPLA9, enzim poznat i pod nazivom PLA2G6, je jedini PNPLA enzim čija je kristalna struktura riješena [31]. Na **Slici 13** prikazana je struktura i organizacija domena PNPLA9. Struktura PNPLA9 sastoji se od N-terminalne domene, katalitičke domene i domene koja sadrži ankirinska ponavljanja. U katalitičkoj domeni nalazi se aktivno mjesto s katalitičkom dijadom Ser-Asp i oksianionskom šupljinom koju karakterizira strukturni motiv bogat glicinom. Za razliku od aktivnog mjesta u patatinu koji je sa površinom povezan pomoću 2 uska kanala, šupljina u kojoj se nalazi aktivno mjesto PNPLA9 širom je otvorena i u nju se mogu smjestiti i fosfolipidi s dugačkim nezasićenim lancima masnih kiselina [31]. PNPLA9 je jedini PNPLA enzim koji ne sadrži transmembranski segment nego nekoliko regija bogatih prolinom i 9 ankirinska ponavljanja preko kojih je moguće ostvariti interakciju s nekoliko srodnih receptorskih proteina [31]. Ankirinska ponavljanja su vrlo prepoznatljiv strukturni motiv koji je prisutan u stotinama proteina. U kristalnoj strukturi PNPLA9, ankirinska ponavljanja vezana su na katalitičku domenu i šire se prema suprotnim stranama dimera i potencijalnom mjestu interakcije na membrani [31].



Slika 13. a) Organizacija domena PNPLA9 (GGGVKG – oksianionska šupljina, 1-9-14, IQ – vezna mjesta za CaM kinazu), b) 3D prikaz PNPLA9 (ANK – ankirinska ponavljanja, CAT – katalitička domena). Preuzeto iz ref. [31].

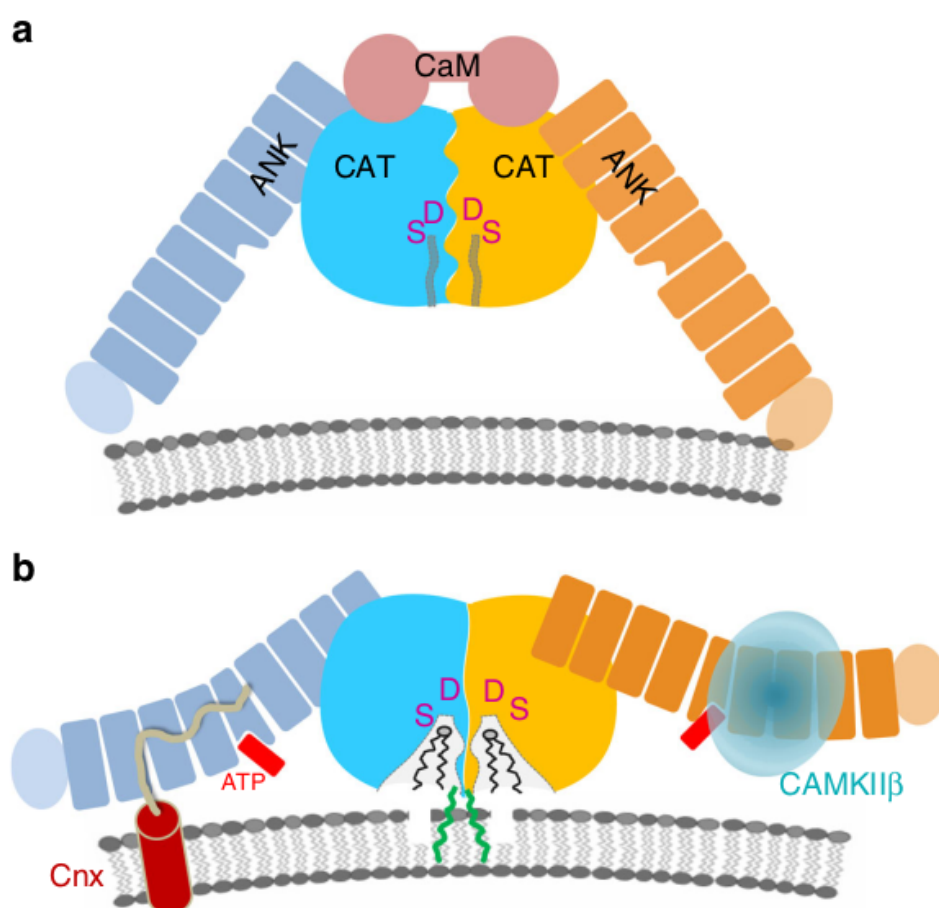
PNPLA9 ostvaruje interakciju s CaM kinazom (engl. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) i kalneksinom, tzv. “chaperon“ proteinom iz endoplazmatskog retikuluma [3,31]. Ovaj enzim formira stabilan dimer (**Slika 14**), a interakcija je posredovana katalitičkim domenama. Aktivna mjesta nalaze se u neposrednoj blizini mjesta dimerizacije što upućuje na alosteričku asocijaciju između 2 aktivna mjesta i ovisnost katalitičke aktivnosti o dimerskoj konformaciji [31]. Disrupcija dimera rezultira nastajanjem neaktivnog enzima [31]. CaM kinaza inhibira enzimsku aktivnost PNPLA9 u prisutnosti kalcija čak i pri malim koncentracijama. Pretpostavlja se da se interakcija s CaM kinazom može oslabiti kovalentnom modifikacijom, reakcijom autoacilacije Cys651 koji se nalazi na ulazu u aktivno mjesto u petlji preko koje se ostvaruje interakcija s membranom [31]. Pretpostavlja se da kovalentno vezan dugački lanac masne kiseline povećava afinitet PNPLA9 za interakciju s membranom. Reakcija autoacilacije odvija se u prisutnosti oleoil-CoA, a kovalentno modificirani enzim je aktivan i u prisutnosti CaM kinaze i Ca^{2+} [31].



Slika 14. Konfiguracija dimera PNPLA9 u kristalnoj strukturi. Žutom i narančastom bojom prikazan je monomer 1, a ljubičastom i svijetloplavom bojom monomer 2. Ružičastom bojom prikazana je

katalitička dijada, a tamnoplavom bojom prikazano je vezno mjesto za CaM kinazu (1-9-14). ANK – ankirinska ponavljanja, CAT – katalitička domena. [31]

Na **slici 15** prikazan je pretpostavljeni mehanizam regulacije PNPLA9 enzima. Vežanje jedne molekule CaM na dimer PNPLA9 enzima uzrokuje alosteričku promjenu konformacije pri čemu dolazi do stabilizacije zatvorene konformacije aktivnog mjesta. Reakcijom autoacilacije Cys651 dolazi do disocijacije CaM kinaze, enzim postaje katalitički aktivan i dolazi do stabilizacije otvorene konformacije. PNPLA9 je jedina fosfolipaza koja ostvaruje interakciju s ATP vjerojatno u blizini triptofana na poziciji 293 u aminokiselinskoj sekvenci enzima [31].



Slika 15. Pretpostavljeni mehanizam regulacije PNPLA9. a) Shematska reprezentacija hipotetskog inhibiranog stanja u kojem je na PNPLA9 vezana CaM kinaza, b) Aktivna konformacija dimera. Disocijacijom CaM aktivna mjesta se otvaraju, a ankirinska ponavljanja ponovno su dostupna za interakciju. Preuzeto iz ref. [31].

PNPLA9 je ekprimiran u skoro svim tkivima ljudskog organizma i u bazalnim uvjetima lokaliziran je pretežito u citoplazmi [3]. Stimulacijom, PNPLA9 može asociirati s različitim staničnim organelima uključujući staničnu membranu, mitohondrij, endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat i jezgrinu ovojnicu [3,31]. Mehanizam lokalizacije PNPLA9 s membranama različitih staničnih organela u različitim tkivima je zasad još uvijek nepoznat [3,31].

Enzimska aktivnost

PNPLA9 katalizira reakciju hidrolize masnih kiselina na poziciji *sn-2* glicerofosfolipida, preferentno plazmalogenih fosfolipida koji sadrže arahidonsku skupinu na poziciji *sn-2* [2]. Produkti hidrolize membranskih fosfolipida su lipidne molekule koje imaju ulogu sekundarnih glasnika u različitim signalnim putevima. Također, PNPLA9 pokazuje i transacilaznu i tioesteraznu aktivnost [2,3,31].

Potencijalne fiziološke uloge

Ovaj enzim uključen je u niz procesa uključujući stanični rast i migraciju, modeliranje stanične membrane, autofagiju, oslobađanje arahidonske kiseline inducirano agonistom, sekreciju inzulina, formiranje kosti, kontrakciju i relaksaciju krvnih žila stimulirano signalnim putem Ca^{2+} i apoptozu [31]. PNPLA9 knock-out modeli na miševima pokazali su da muški miševi imaju kompromitiranu plodnost zbog smanjene mogućnosti kretnje spermija i smanjenu toleranciju na glukozu zbog smanjenog izlučivanja glukoze iz β -otočiča gušterače. Također, starenjem i muški i ženski miševi razvijaju neurološka oštećenja zbog narušene homeostaze membrana aksona i akumulacije ubikvitiliranih proteina [2,31].

Povezanost s bolestima

Uloga PNPLA9 enzima u različitim signalnim putevima i uloga u različitim bolestima nije razjašnjena, ali promjene u aktivnosti PNPLA9 povezane su s kardiovaskularnim bolestima, tumorima, dijabetesom, mišićnom distrofijom, nealkoholnim steatohepatitisom i antivirusnim odgovorom [3,31].

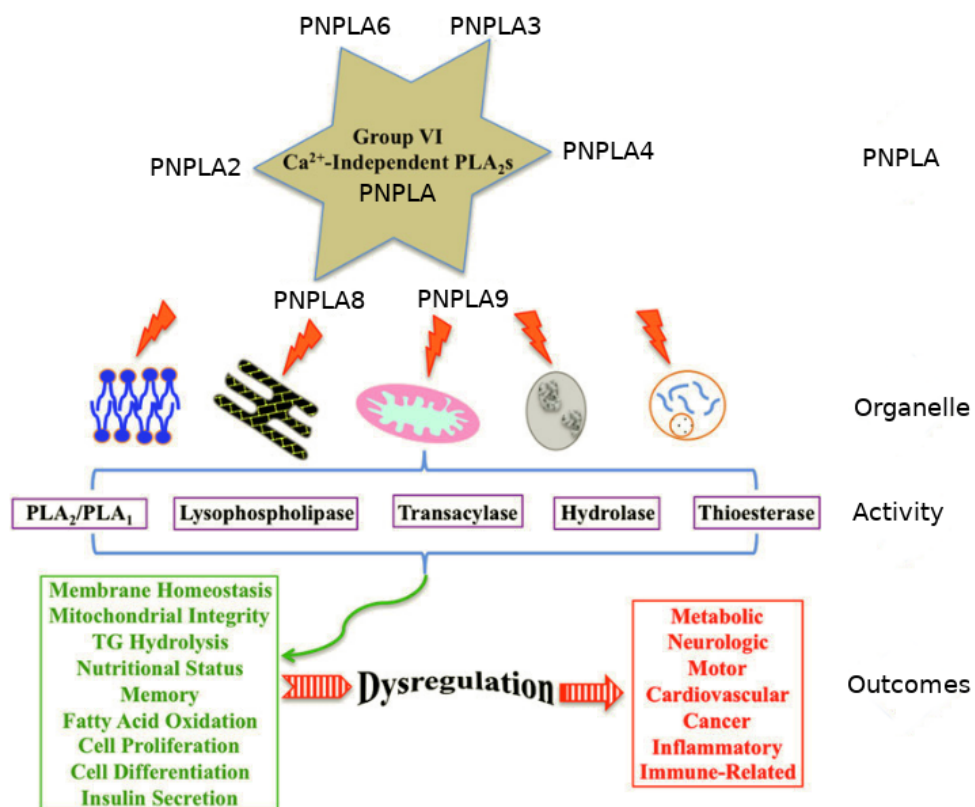
Gubitak i smanjena aktivnost PNPLA9 enzima povezana je s različitim neurološkim i neurodegenerativnim sindromima [31]. Mutacije povezane s neurodegenerativnim bolestima pronađene su u svim domenama enzima, stoga, mutacije mogu narušiti enzimsku aktivnost, njegovu regulaciju i potencijalne makromolekulske interakcije. Istraživanja na miševima u kojima je gen koji kodira PNPLA9 u potpunosti deletiran uočena je degeneracija unutarnje membrane mitohondrija i presinaptičke membrane, smanjena mogućnost ulaska Ca^{2+} u astrocite, točkaste mutacije u ankirinskim ponavljanjima koje generiraju inaktivni PNPLA9 enzim i neuroinflamaciju što potencijalno može dovesti do neurodegenerativnih bolesti koje karakterizira akumulaciju željeza [33]. Primjeri takvih bolesti su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, Karakov sindrom, INAD (engl. *infantile neuroaxonal dystrophy*) i NBIA (engl. *neurodegeneration with brain iron accumulation*) [2,3]. INAD i NBIA su dvije dječje neurodegenerativne bolesti koje se pojavljuju do 2. godine života pri čemu dolazi do degeneracije živčanog sustava. NBIA je podvrsta INAD koju karakterizira akumulaciju željeza u mozgu [2,3].

Također, mutacije u genu koji kodira PNPLA9 mogu uzrokovati razvoj Alzheimerove i Parkinsonove bolesti bez akumulacije željeza [3,31].

§ 3. ZAKLJUČAK

PNPLA porodica enzima čini raznovrsnu skupinu enzima koji imaju esencijalnu ulogu u remodeliranju lipida uključujući triacilgliceride, fosfolipide i retinolne estere. Najmanji PNPLA enzim sastoji se od 253 aminokiseline, a najveći sadrži više od 1360 aminokiselina. Iako je kristalna struktura riješena samo za jedan enzim, PNPLA9, pokazano je da svi članovi ove porodice enzima sadrže patatinsku domenu u kojoj se nalazi aktivno mjesto s katalitičkom dijadom (Ser-Asp) i oksianionska šupljina. Također, većina PNPLA enzima sadrži dodatne regulatorne domene koje utječu na lokalizaciju enzima u stanici. Skoro svi enzimi vezani su na membranu različitih staničnih organela poput endoplazmatskog retikuluma, lipidnih kapljica, mitohondrija i peroksisoma.

Fiziološka uloga i mehanizmi regulacije enzimske aktivnosti još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni ni za jednog od članova PNPLA porodice enzima, ali različiti knock-out, "gain-of-function" i "loss-of-function" modeli na miševima i rezultati dosadašnjih istraživanja upućuju na važnu ulogu ovih enzima u različitim biološkim procesima poput održavanja homeostaze i integriteta staničnih membrana, rasta stanica, stanične signalizacije, metabolizma lipida i aktivnosti pojedinih članove ove skupine enzima i različitih bolesti (**Slika 16**, sljedeća stranica). Stoga, potrebno je nastaviti istraživanja na PNPLA porodici enzima za bolje razumijevanje njihove biološke uloge i uloge u razvoju bolesti što ih čini i potencijalnom metom za razvoj lijekova.



Slika 16. Biološka uloga PNPLA enzima i povezanost s različitim bolestima. Preuzeto i prilagođeno iz ref. [3].

§ 4. **LITERATURNI IZVORI**

1. J. Z. Long, B. F. Cravatt, The Metabolic Hydrolases and Their Functions in Mammalian Physiology and Disease, *Chem Rev.* **111** (2011) 6022-6063.
2. P. Kienesberger, M. Oberer, A. Lass, R. Zechner, Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions, *J. Lipid R.* (2009) S63-S68.
3. S. Ramanadham, T. Ali, J. W. Ashley, R. N. Bone, W. D. Hancock, X. Lei, Calcium-independent phospholipase A₂ and their roles in biological processes and diseases, *J. Lipid. R.* **56** (2013) 1643-1668.
4. P. A. Wilson, S. D. Gardner, N. M. Lambie, S. A. Commans, D. J. Crowther, Characterization of the human patatin-like phospholipase family, *J. Lipid R.* **47** (2006) 1940-1949.
5. A. C. Lake, Y. Sun, J.L. Li, J. E. Kim, J. W. Johnson, D. Li, T. Revett, H. H. Shih, W. Liu, J. E. Paulsen, R. E. Gimeno, Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members, *J. Lipid R.* **46** (2005) 2477-2487.
6. P. A. Chang, Y. J. Sun, F. F. Huang, W. Z. Qin, Y. Y. Chen, X. Zeng, Y. J. Wu, Identification of human patatin-like phospholipase domain-containing protein 1 and a mutant in human cervical cancer HeLa cells, *Mol Biol Rep* **40** (2013) 5597-5605.
7. S. Murugesan, E. B. Goldberg, E. Dou, W. J. Brown, Identification of Diverse Lipid Droplet Targeting Motifs in the PNPLA Family of Triglyceride Lipases, *PLoS One* **8** (2013) 1-15.
8. P. A. Chang, L. P. Han, L. X. Sun, F. F. Huang, Identification mouse patatin-like phospholipase domain containing protein 1 as a skin-specific and membrane-associated protein, *Gene* (2016) 1-7.
9. E. Smirnova, E. B. Goldberg, K. S. Makarova, L. Lin, W. J. Brown, C. L. Jackson, ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells, *EMBO Rep.* **7** (2006) 106-113.
10. R. Zimmermann, A. Lass, G. Haemmerle, R. Zechner, Fate of fat: The role of adipose triglyceride lipase in lipolysis, *Biochim. Biophys. Acta* **1791** (2009) 494–500.
11. R. Zechner, P. C. Kienesberger, G. Haemmerle, R. Zimmermann, A. Lass, Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores, *J. Lipid R.* **50** (2009) 3-21.

12. A. Lass, R. Zimmerman, M. Oberer, R. Zechner, Lipolysis – A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores, *Prog. Lipid Res.* **50** (2011) 14–27.
13. R. Zechner, R. Zimmerman, T. O. Eichmann, S. D. Kohlwein, G. Haemmerle, A. Lass, F. Madeo, *Cell Metab.* **15** (2012) 279-291.
14. M. Kumari, G. Schoiswohl, C. Chitraju, M. Paar, I. Cornaciu, A. Y. Rangrez, N. Wongsiriroy, H. M. Nagy, P. T. Ivanova, S. A. Scott, O. Knittelfelder, G. N. Rechberger, R. Birner-Gruenberger, S. Eder, H. A. Brown, G. Haemmerle, M. Oberer, A. Lass, E. E. Kershaw, R. Zimmermann, R. Zechner, Adiponutrin Functions as a Nutritionally Regulated Lysophosphatidic Acid Acyltransferase, *Cell Metab.* **15** (2013), 691-702.
15. X. C. Dong, PNPLA3 - A Potential Therapeutic Target for Personalized Treatment of Chronic Liver Disease, *Frontiers in Medicine* **6** (2019) 1-11.
16. S. BasuRay, Y. Wang, E. Smagris, J. C. Cohen, H. H. Hobbs, Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets in the basis of associated hepatic steatosis, *PNAS* **116** (2019) 9521-9526.
17. R. S. Holmes, Vertebrate patatin-like phospholipase domain-containing protein 4 (PNPLA4) genes and proteins: a gene with a role in retinol metabolism, *Biotech* **3** (2012) 277-286.
18. R. Schreiber, U. Taschler, K. Preiss-Landl, N. Wongsiriroy, R. Zimmermann, A. Lass, Retinyl ester hydrolases and their roles in vitamin A homeostasis, *Biochim. Biophys. Acta* **1821** (2012) 113–123.
19. L. Yang, G. Qian, Z. Xue, H. Lei, X. Kui, H. Yan-qing, L. Lan, M. Yu-lian, L. Kui, PNPLA5-knockout rats induced by CRISPR/Cas9 exhibit abnormal bleeding and lipid level, *J. Integr. Agric.* **16** (2017) 169-180.
20. N. Dupont, S. Chauhan, J. Arko-Mensah, E. F. Castillo, A. Masedunskas, R. Weigert, H. Robenek, T. Proikas-Cezanne, V. Deretic, Neutral Lipid Stores and Lipase PNPLA5 Contribute to Autophagosome Biogenesis, *Curr. Biol.* **24** (2014) 609-620.
21. C. Heier, B. Kien, F. Huang, T. O. Eichmann, H. Xie, R. Zechner, P.A. Chang, The phospholipase PNPLA7 functions as a lysophosphatidylcholine hydrolase and interacts with lipid droplets through its catalytic domain, *J. Biol. Chem.* **292** (2017) 19087-19098.
22. P.A. Chang, L. He, Y. Wang, C. Heier, Y. Wu, F. Huang, Characterization of the Interaction of Neuropathy Target Esterase with the Endoplasmic Reticulum and Lipid Droplets, *Biomolecules* **9** (2019) 1-16.

23. R. J. Richardson, N. D. Hein, S. J. Wijeyesakere, J. K. Fink, G. F. Makhaeva, Neuropathy target esterase (NTE): overview and future, *Chem-Biol. Interact.* **203** (2013) 238–244.
24. R. J. Richardson, J. K. Fink, P. Glynn, R. B. Hufnagel, G. F. Makhaeva, S. J. Wijeyesakere, Neuropathy target esterase (NTE/PNPLA6) and organophosphorus compound-induced delayed neurotoxicity (OPIDN), *Advances in Neurotoxicology*, Volume 4, Academic Press, Newark, 2020, str. 1-78.
25. M. A. Sogorb, D. Pamies, C. Estevan, J. Estevez, E. Vilanova, Roles of NTE protein and encoding gene in development and neurodevelopmental toxicity, *Chem.-Biol. Interact.* (2016) 1-6.
26. P. C. Kienerberger, A. Lass, K. Preiss-Landl, H. Wolinski, S. D. Kohlwein, R. Zimmerman, R. Zechner, Identification of an Insulin-regulated Lysophospholipase with Homology to Neuropathy Target Esterase, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 5908-5917.
27. H. Tanaka, R. Takeya, H. Sumimoto, A Novel Intracellular Membrane-Bound Calcium-Independent Phospholipase A₂, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272** (2000) 320-326.
28. W. Yan, C. M. Jenkins, X. Han, D. J. Mancuso, H. F. Sims, K. Yang, R. W. Gross, The Highly Selective Production of 2-Arachidonoyl Lysophosphatidylcholine Catalyzed by Purified Calcium-independent Phospholipase A₂γ, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 26669–26679.
29. S. H. Moon, C. M. Jenkins, X. Liu, S. Guan, D. J. Mancuso, R. W. Gross, Activation of Mitochondrial Calcium-independent Phospholipase A₂γ (iPLA₂γ) by Divalent Cations Mediating Arachidonate Release and Production of Downstream Eicosanoids, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 14880-14895.
30. E. Yoda, K. Hachisu, Y. Taketomi, K. Yoshida, M. Nakamura, K. Ikeda, R. Taguchi, Y. Nakatani, H. Kuwata, M. Murakami, I. Kudo, S. Hara, Mitochondrial dysfunction and reduced prostaglandin synthesis in skeletal muscle of Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A₂γ-deficient mice, *J. Lipid R.* **51** (2010) 3003-3015.
31. K. R. Malley, O. Koroleva, I. Miller, R. Sanishvili, C. M. Jenkins, R. W. Gross, S. Korolev, The structure of iPLA₂β reveals dimeric active sites and suggests mechanisms of regulation and localization, *Nat. Commun.* **9** (2018) 1-11.