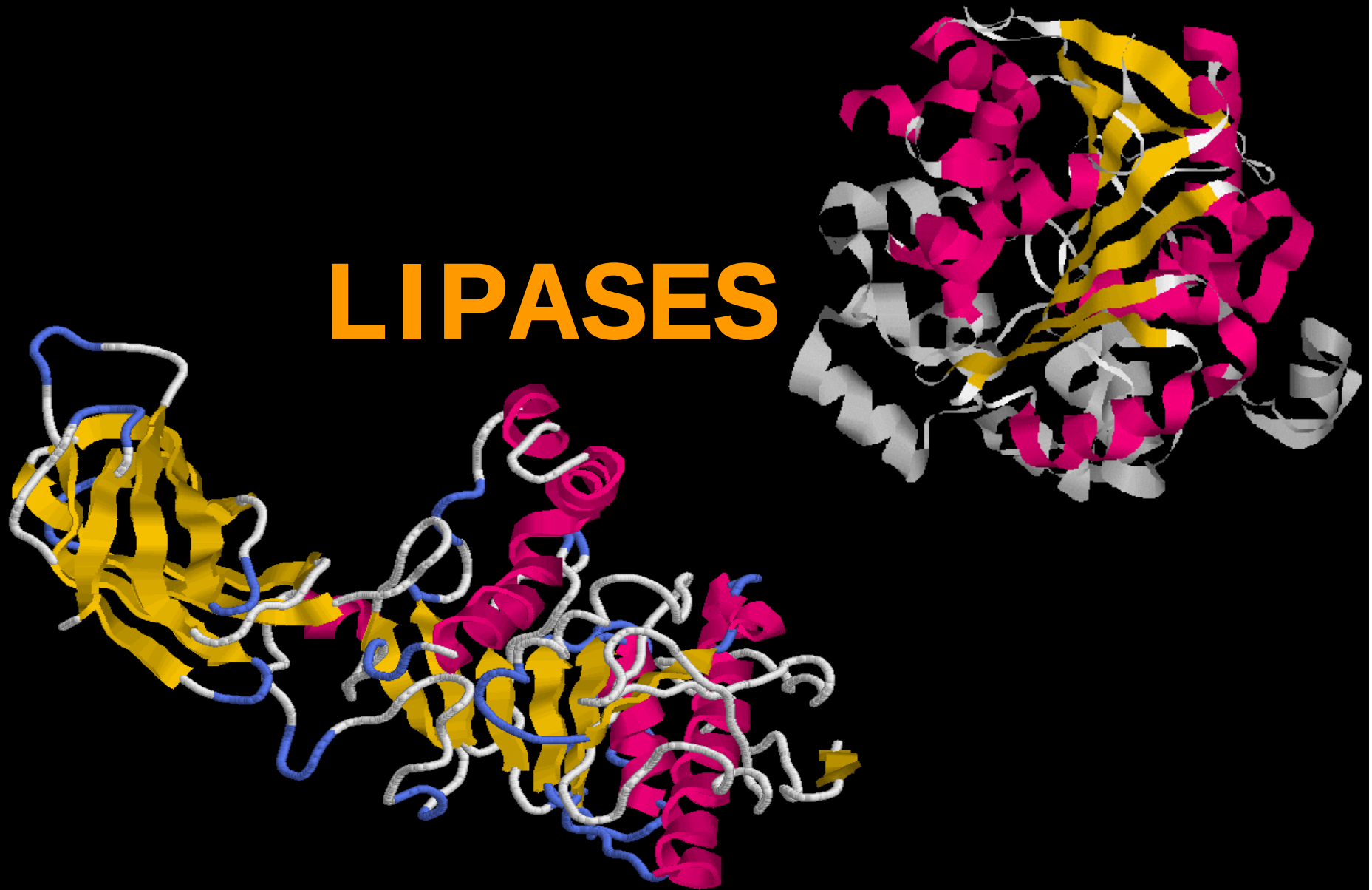


LIPASES



M. Berdiel, M. Esteve, N. Gresa, M. Mallo, N. Ramos

INTRODUCCIÓ

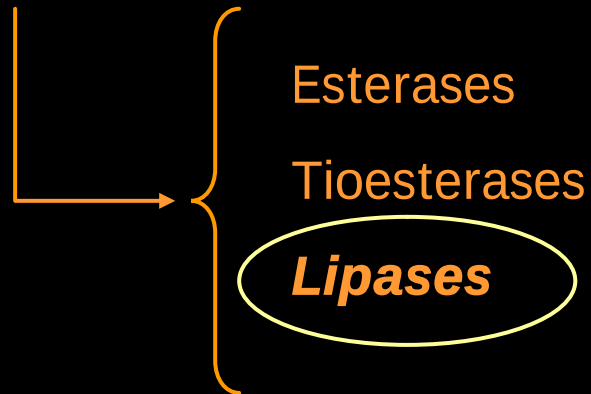
- Enzims hidrosolubles molt importants en el metabolisme dels lípids.
- Catalitzen la hidròlisi d'enllaços éster de substrats hidrofòbics lipídics, com els TAG, fosfolípids i ésters de colesterol.

- **Classificació d'SCOP**

Classe: proteïnes α/β

Plegament: α/β hidrolases

Superfamília: α/β hidrolases



TIPUS DE LIPASES

Gàstrica

Pancreàtica

Protein related to pancreatic lipase 1 i 2

Hepàtica

Lipoprotein lipasa

Lisosòmica

Endotelial

Fosfolipases

Esfingomielonases

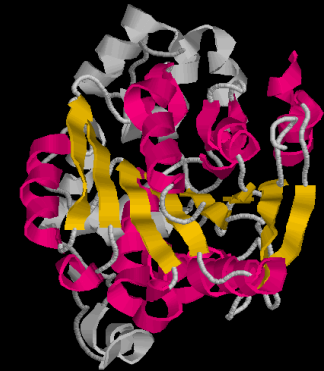
Lingual

Faríngia.

CARACTERÍSTIQUES

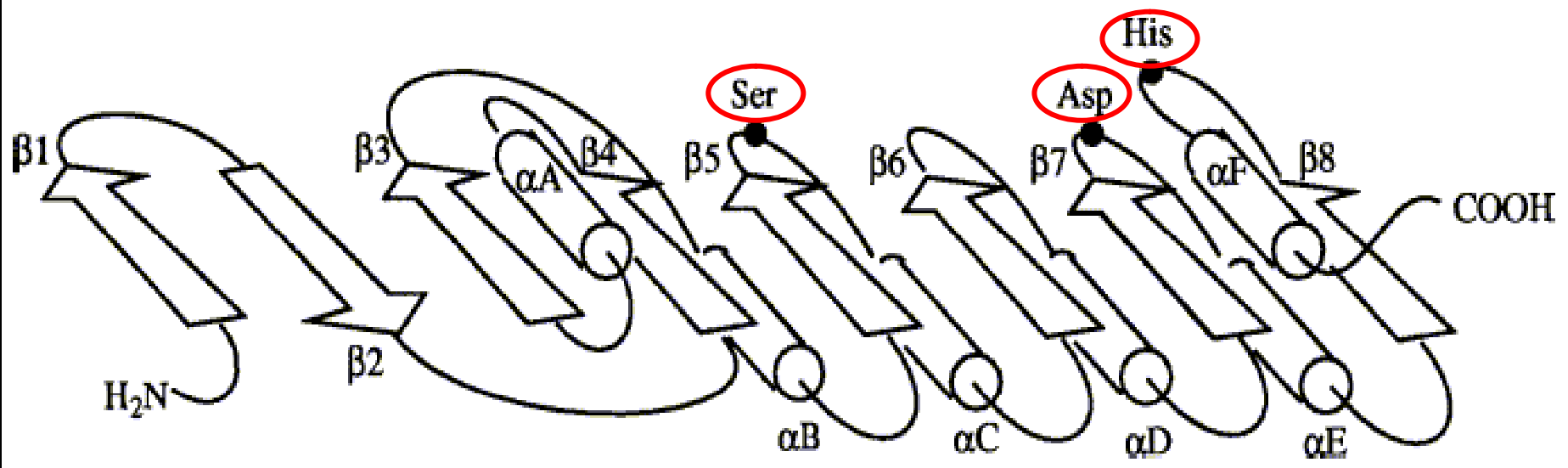
- **Core :**

8 cadenes β (7 paral·leles + 1 anti-paral·lela),
3 hèlixs α a cada banda.



→ Centre actiu → triada catalítica: Ser-His-Asp

→ Oxyanion hole

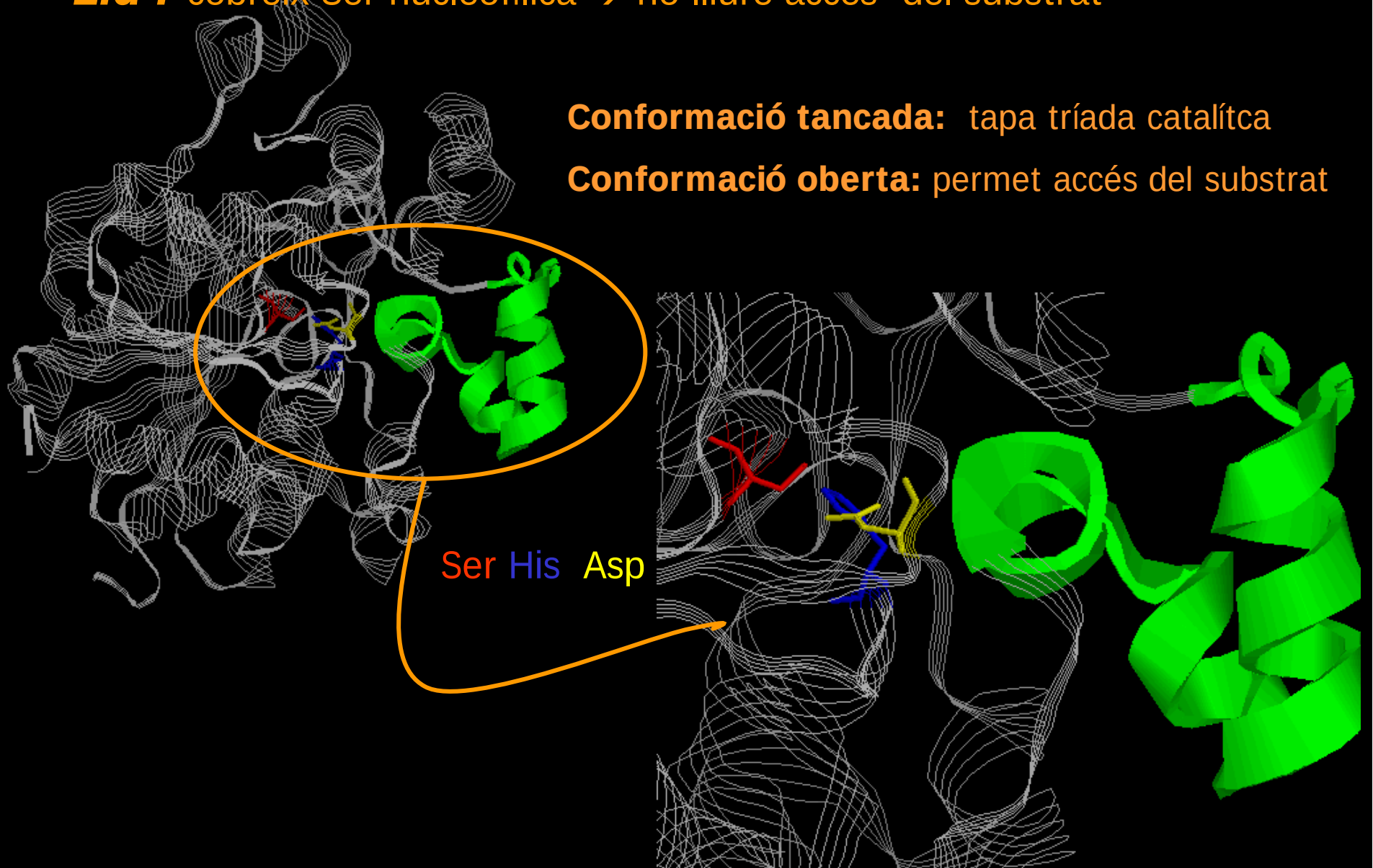


CARACTERÍSTIQUES

- **Lid** : cobreix Ser nucleofílica → no lliure accés del substrat

Conformació tancada: tapa tríada catalítica

Conformació oberta: permet accés del substrat

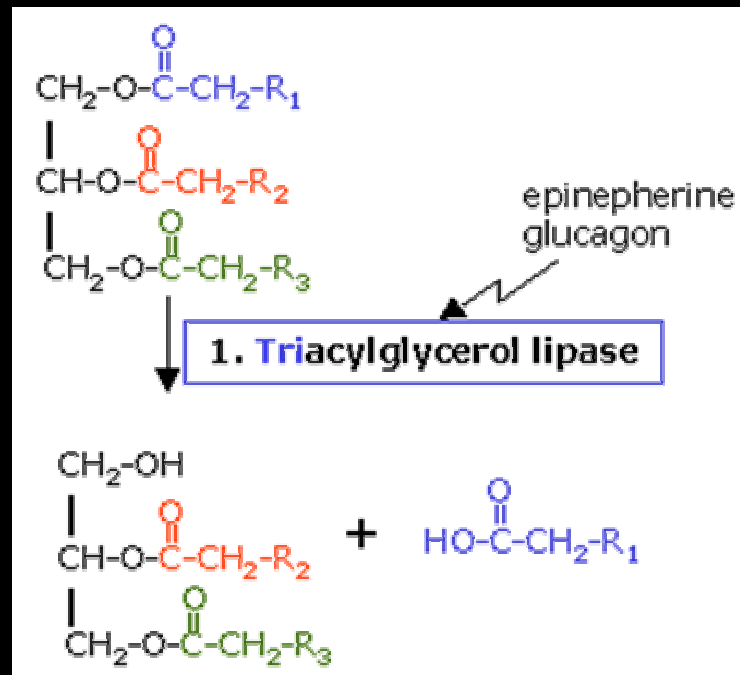
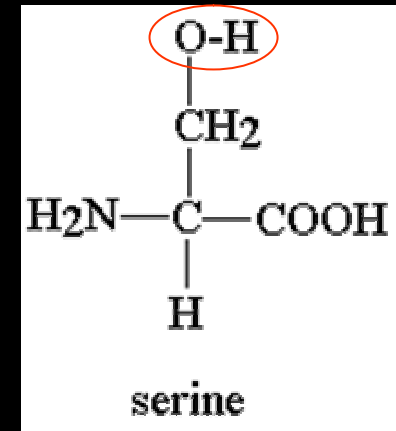


CARACTERÍSTIQUES



MECANISME D'ACCIÓ

1. Atac nucleofílic de l'O de la Ser del centre actiu
2. Trencament de l'enllaç éster
3. Estabilització del producte intermedi per ponts d'H amb residus de l'oxyanion hole
4. Atac de l'aigua



LIPASA GÀSTRICA



LIPASA GÀSTRICA

FUNCIÓ:

-Enzim lipolític (activitat triacilglicerol lipasa) secretat per les cèl·lules del fundus de l'estómac.



- Secreció estimulada per pentagastrina.
- S'encarrega de la digestió del 30% dels lípids de la dieta.
- És estable i activa a pH àcid.

LIPASA GÀSTRICA

ESTRUCTURA

- Enzim globular de 379 residus amb una massa de 50 kDa.
- Principals parts:

Core → 9-183 / 309-379

Domini d'extrusió (184-308)



Cap → 184-214 / 245-308

Lid → 215-244

priva el lliure accés dels substrats al centre actiu

CORE



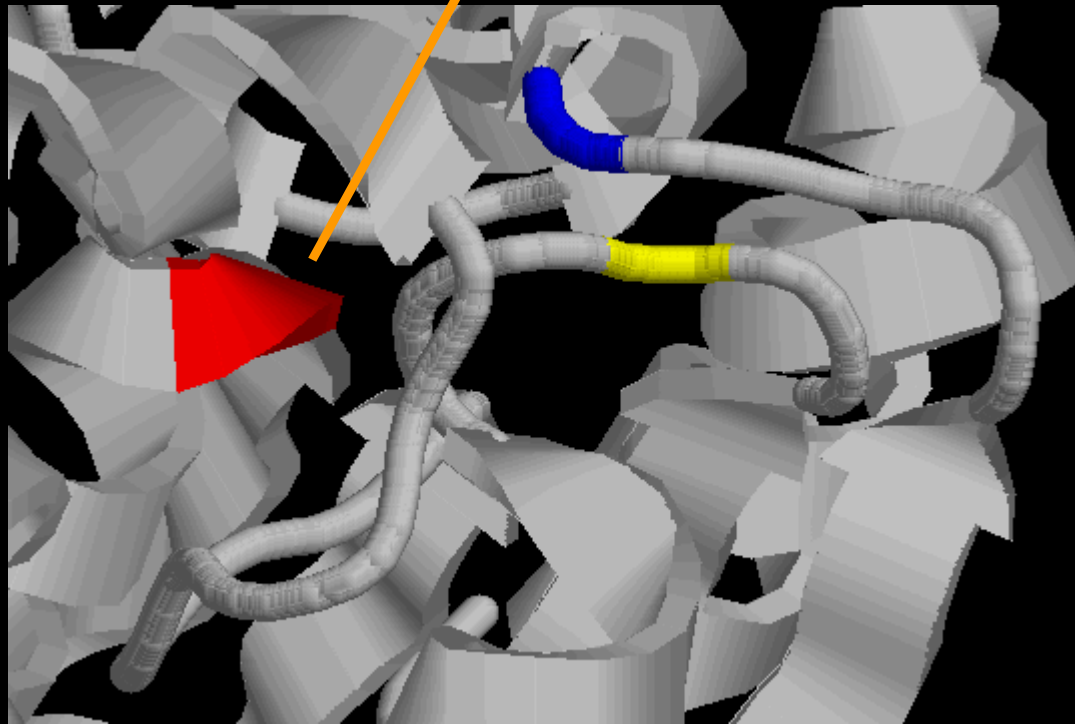
Triada catalítica

Ser 153

His 353

Asp 324

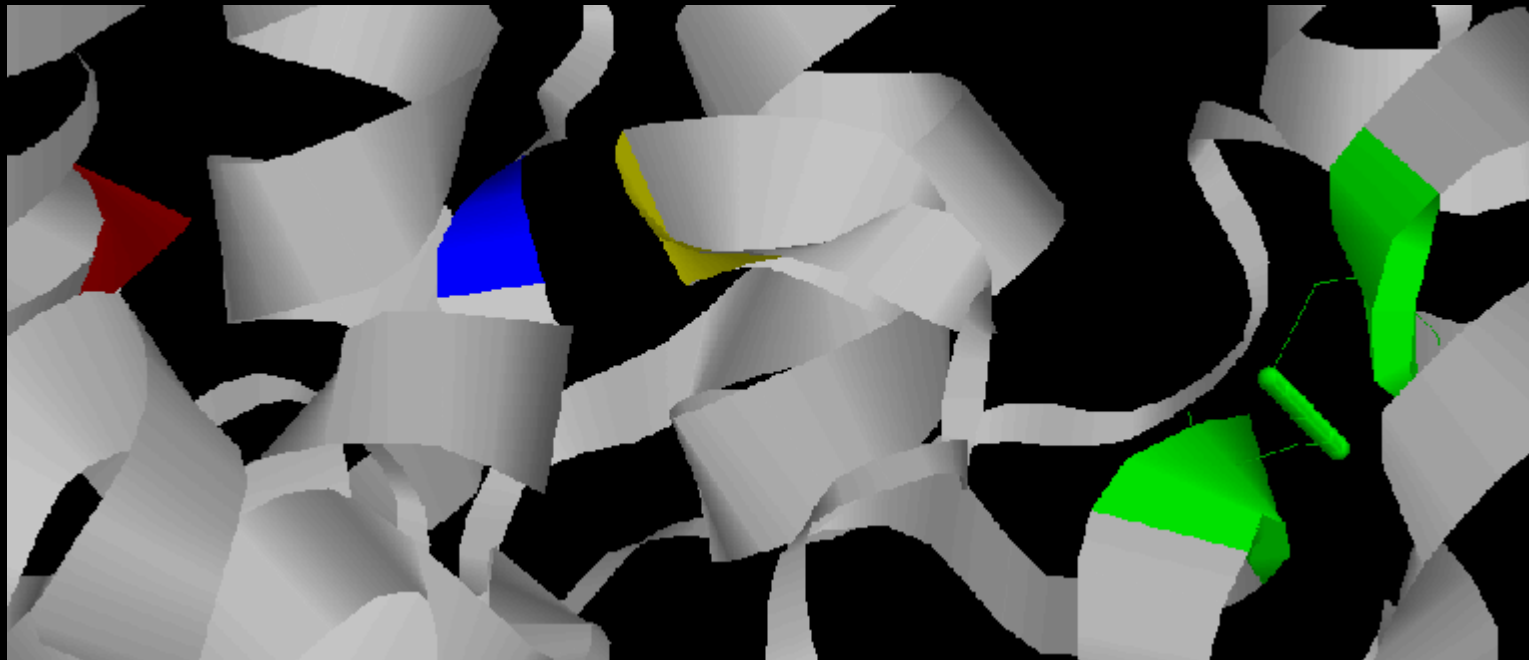
colze nucleofilic



CORE - cisteïnes

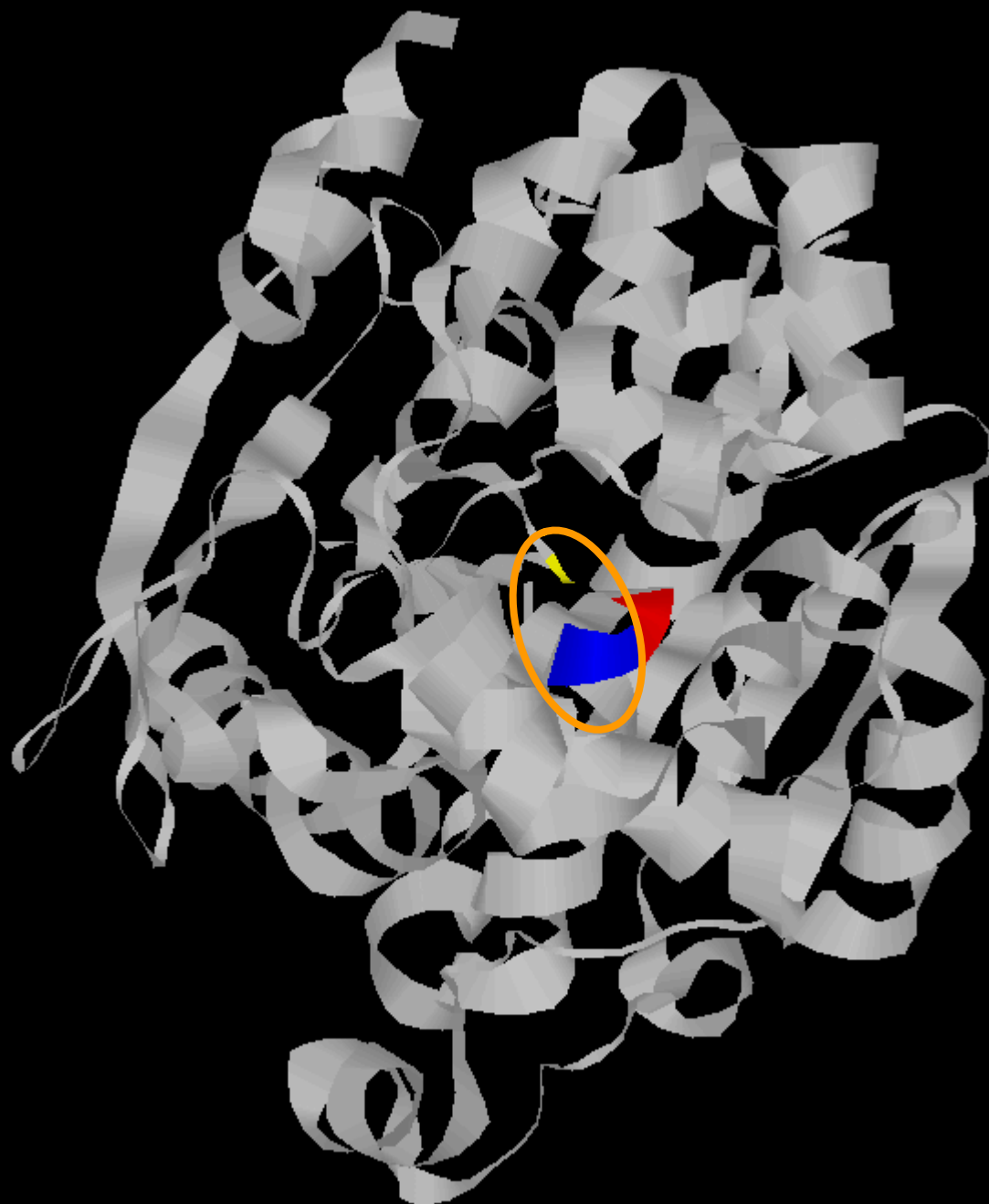
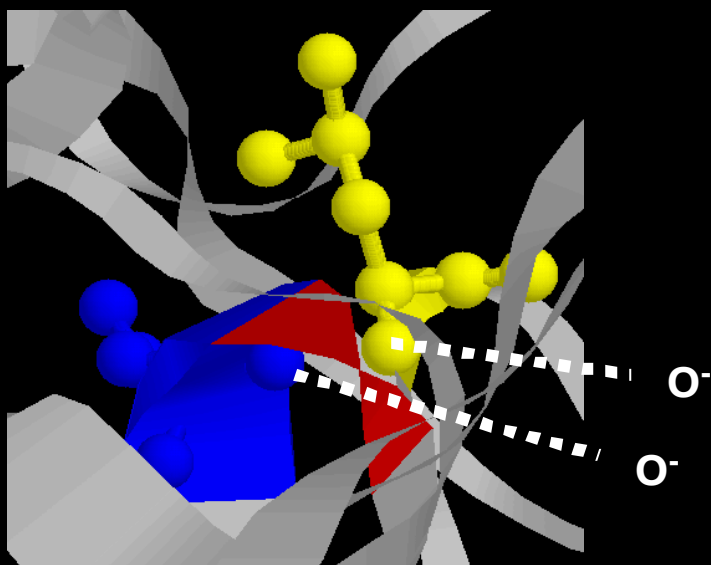
- 3 residus { Cys 227 Cys 236
Cys 244

propera a la Ser 153 i la His 353

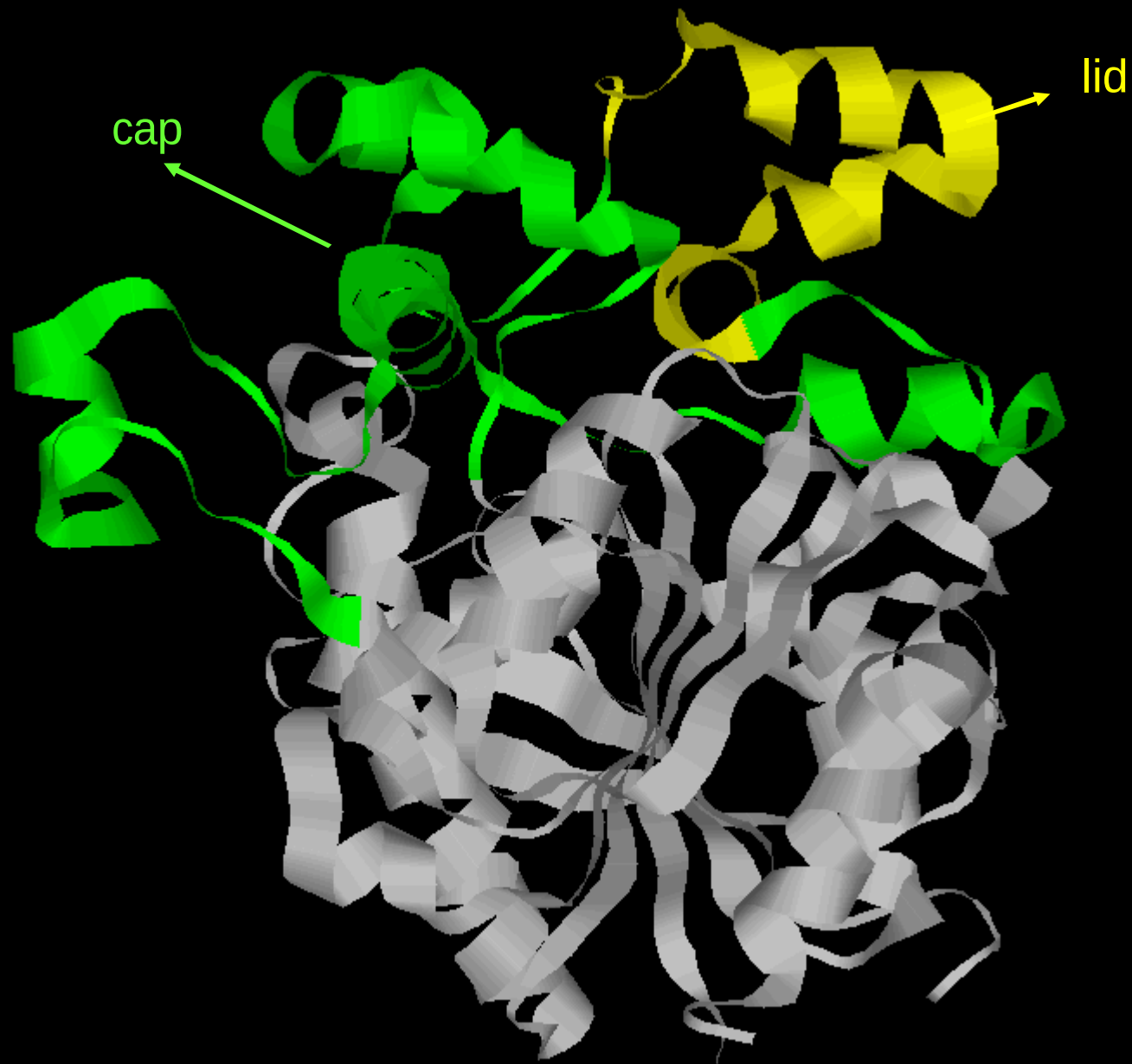


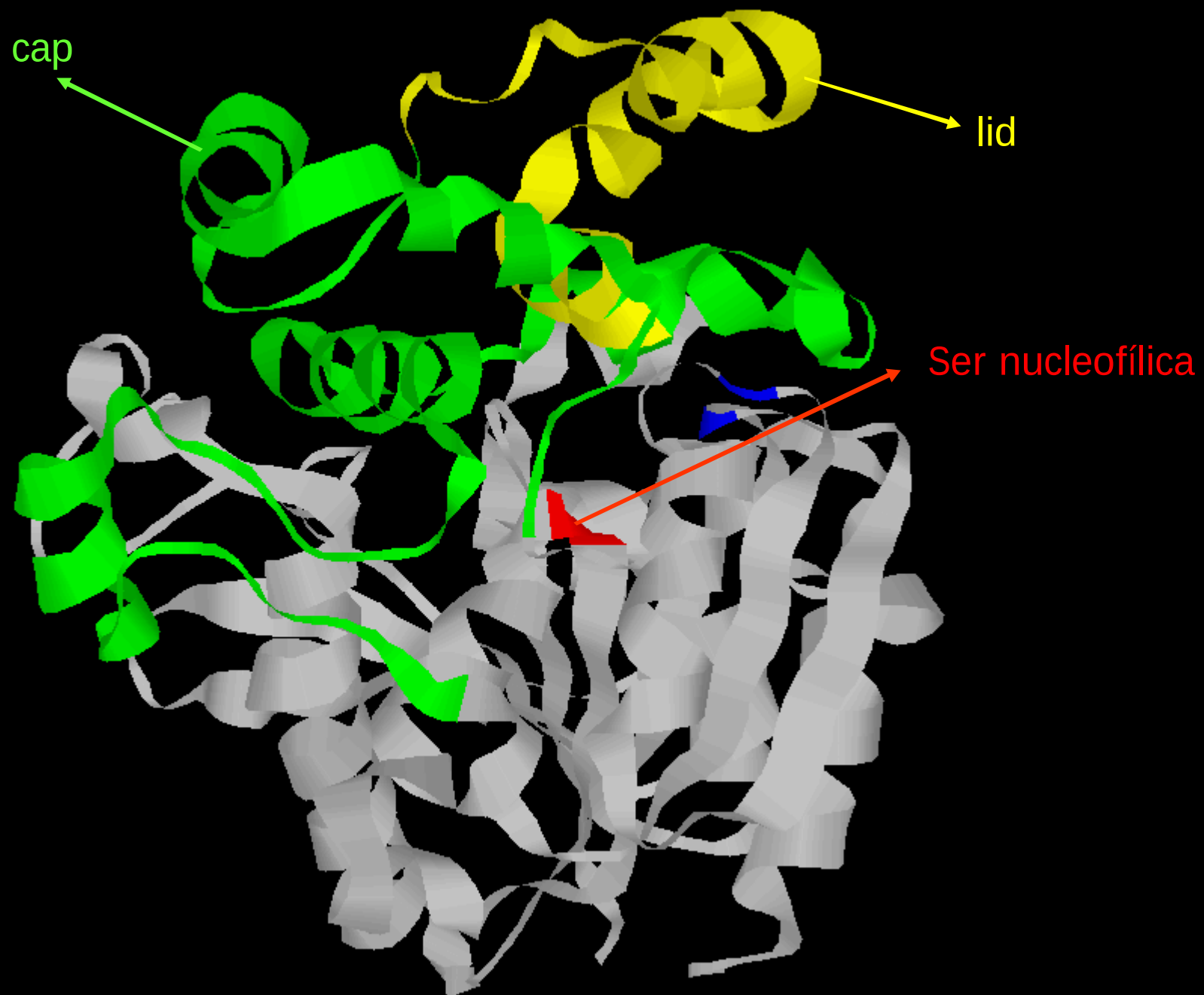
Oxyanion hole

Grups NH { Gln 154 (-Ser153)
Leu 67



DOMINI D'EXTRUSIÓ





LLOCS D'N-GLICOSILACIÓ

- Proteïna altament glicosilada (15% de la massa proteica).

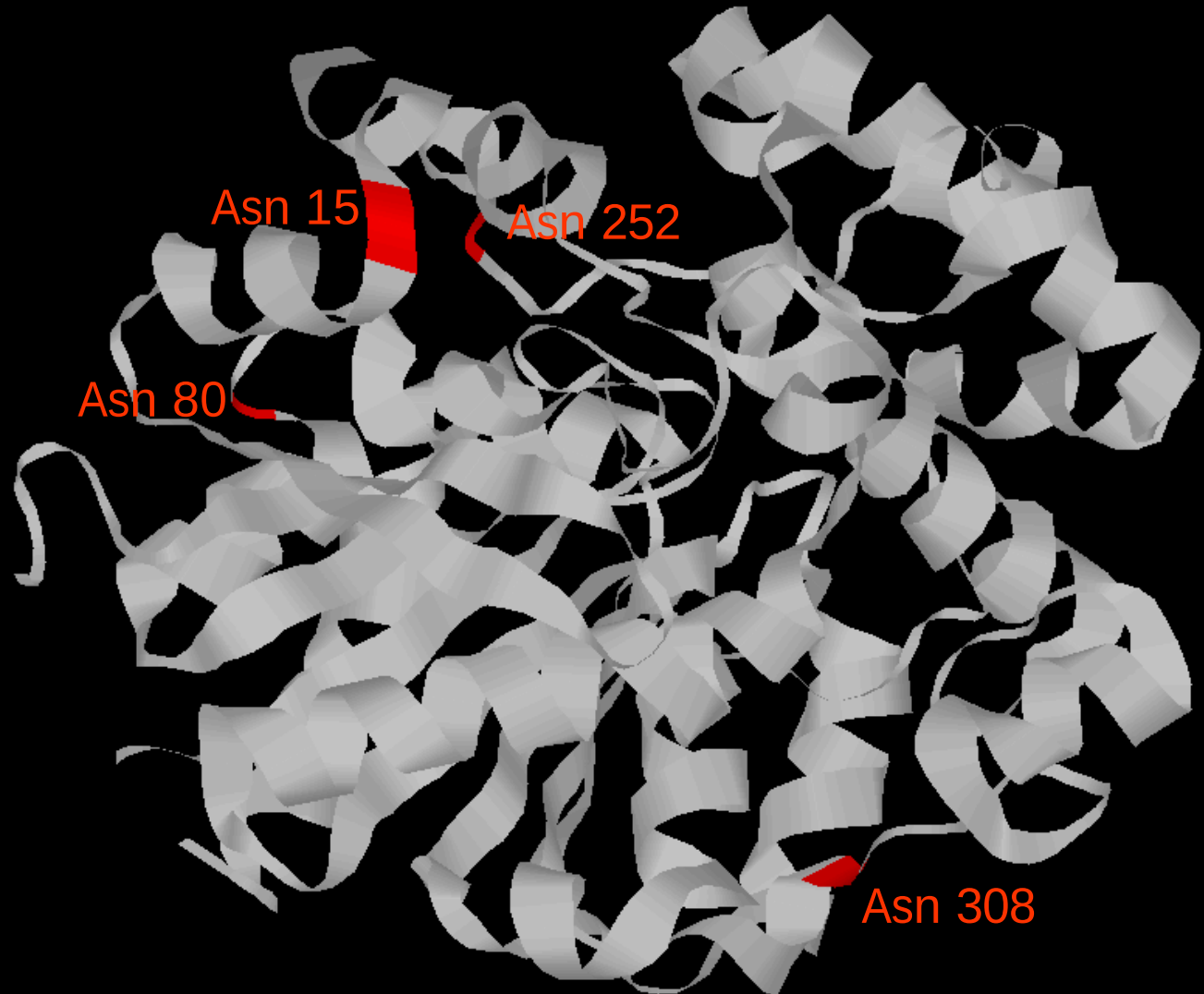


4 llocs d'N-glicosilació

- Resistència al pH àcid de l'estómac.



CH protegeixen de la degradació per part de pepsines



LIPASES PANCREATIQUES



LIPASES PANCREÀTIQUES

Formada per:

- **Lipasa pancreàtica (LP)**
- PLRP 1
- **PLRP 2**

Provenen d'un gen comú

% Id:

- LP - PLRP 1 68%
- LP – PLRP 2 65%

LIPASES PANCRÉATIQUES

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
Sequences used in model and found again:		
LIP1_CANFA (P06857) PANCREATIC LIPASE RELATED PROTEIN 1 PRECURSO...	810	0.0
LIP1_HUMAN (P54315) PANCREATIC LIPASE RELATED PROTEIN 1 PRECURSO...	799	0.0
LIP1_RAT (P54316) PANCREATIC LIPASE RELATED PROTEIN 1 PRECURSOR ...	797	0.0
LIP2_RAT (P54318) PANCREATIC LIPASE RELATED PROTEIN 2 PRECURSOR ...	790	0.0
LIPP_HORSE (P29183) TRIACYLGLYCEROL LIPASE, PANCREATIC PRECURSOR...	789	0.0
LIPP_HUMAN (P16233) TRIACYLGLYCEROL LIPASE, PANCREATIC PRECURSOR...	789	0.0
LIPP_PIG (P00591) TRIACYLGLYCEROL LIPASE, PANCREATIC (EC 3.1.1.3...	787	0.0
LIPP_MYOCO (Q64425) TRIACYLGLYCEROL LIPASE, PANCREATIC PRECURSOR...	780	0.0
LIPP_RAT (P27657) TRIACYLGLYCEROL LIPASE, PANCREATIC PRECURSOR (...)	779	0.0
LIP2_MOUSE (P17892) PANCREATIC LIPASE RELATED PROTEIN 2 PRECURSO...	768	0.0
LIPP_RABIT (Q02157) TRIACYLGLYCEROL LIPASE, PANCREATIC PRECURSOR...	758	0.0
LIP2_MYOCO (Q64424) PANCREATIC LIPASE RELATED PROTEIN 2 PRECURSO...	752	0.0
LIPP_CAVPO (P50903) TRIACYLGLYCEROL LIPASE, PANCREATIC PRECURSOR...	744	0.0
LIP2_HUMAN (P54317) PANCREATIC LIPASE RELATED PROTEIN 2 PRECURSO...	738	0.0
LIPL_PAPAN (P49060) LIPOPROTEIN LIPASE PRECURSOR (EC 3.1.1.34) (...)	586	e-167
LIPL_HUMAN (P06858) LIPOPROTEIN LIPASE PRECURSOR (EC 3.1.1.34) (...)	586	e-167
LIPL_RAT (Q06000) LIPOPROTEIN LIPASE PRECURSOR (EC 3.1.1.34) (LPL).	582	e-166
LIPL_MUSVI (O46647) LIPOPROTEIN LIPASE PRECURSOR (EC 3.1.1.34) (...)	582	e-166
LIPL_PIG (P49923) LIPOPROTEIN LIPASE PRECURSOR (EC 3.1.1.34) (LPL).	578	e-165

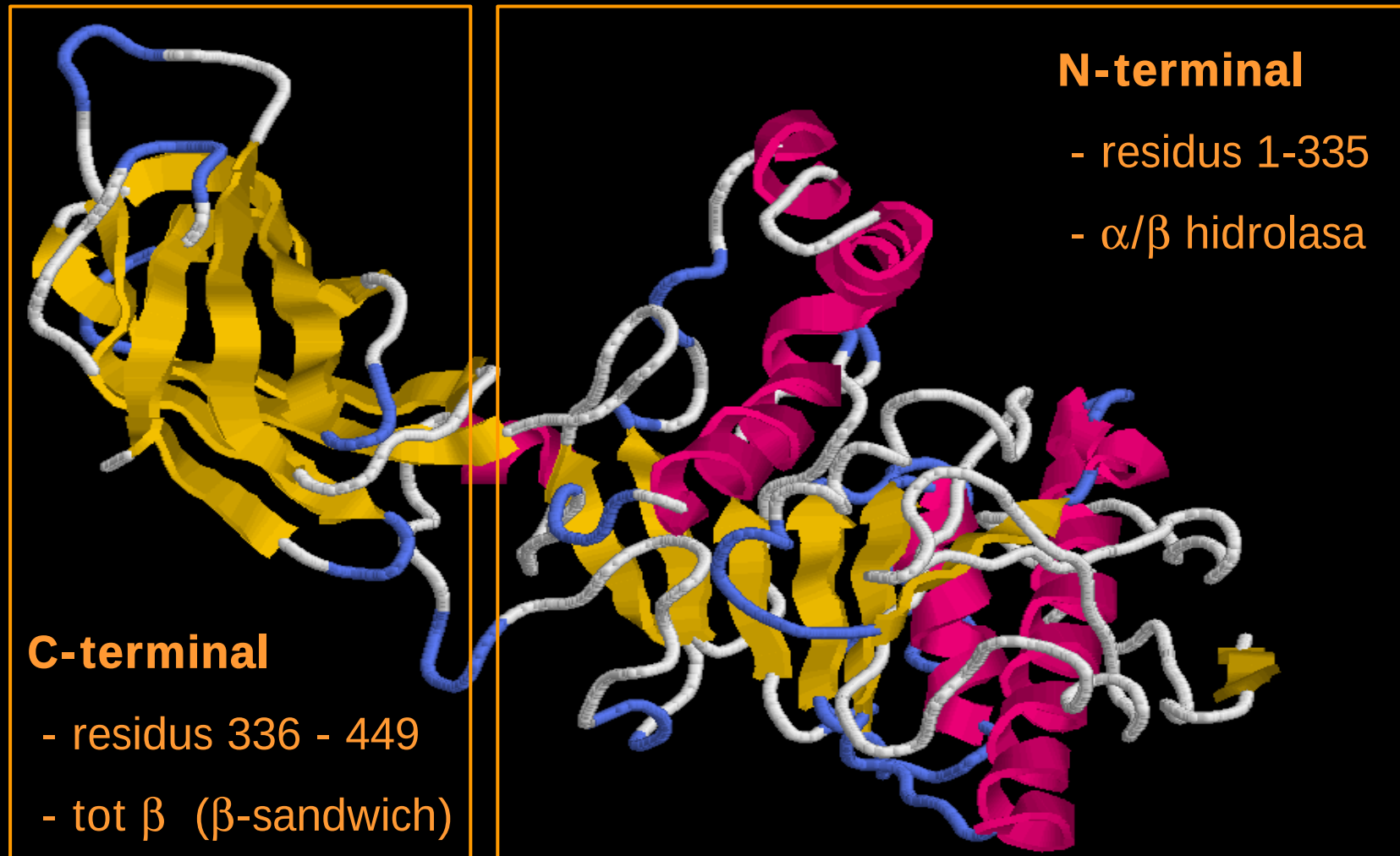
LIPASA PANCREÀTICA

FUNCIÓ

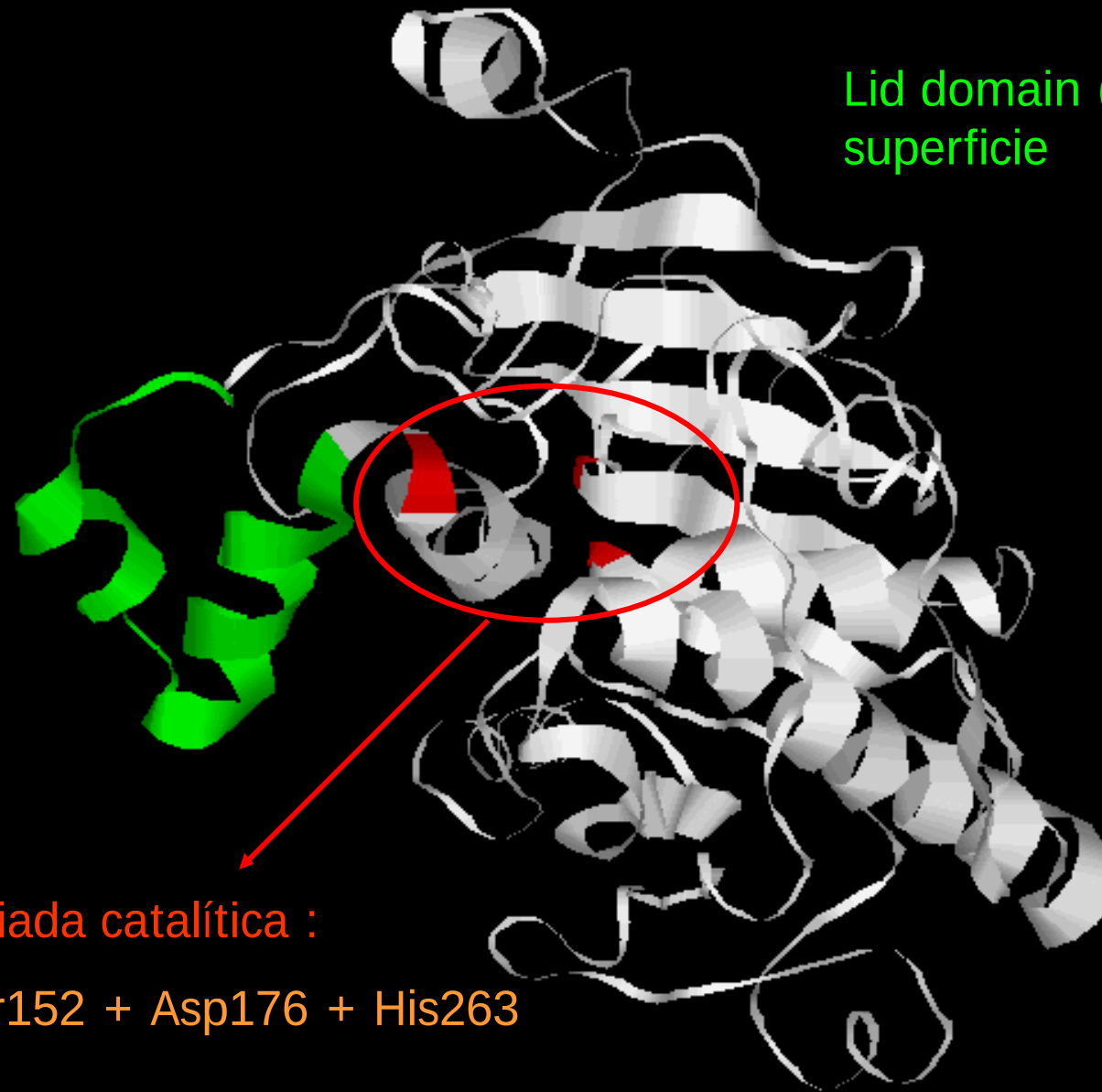
- Principal enzim lipolític en l'i.prim (duodè), secretat per cèl·lules pancreàtiques.
- Àcids biliars dificulten la seva activació → requereix un cofactor: *Colipasa*
- Catalitza conversió : $TG \rightarrow DG \rightarrow MG + \text{àcids grassos}$

LIPASA PANCREÀTICA

- Polipèptid de 499aa (50 kDa).
- Plegament en dos dominis:



LIPASA PANCREÀTICA : Domini N-terminal



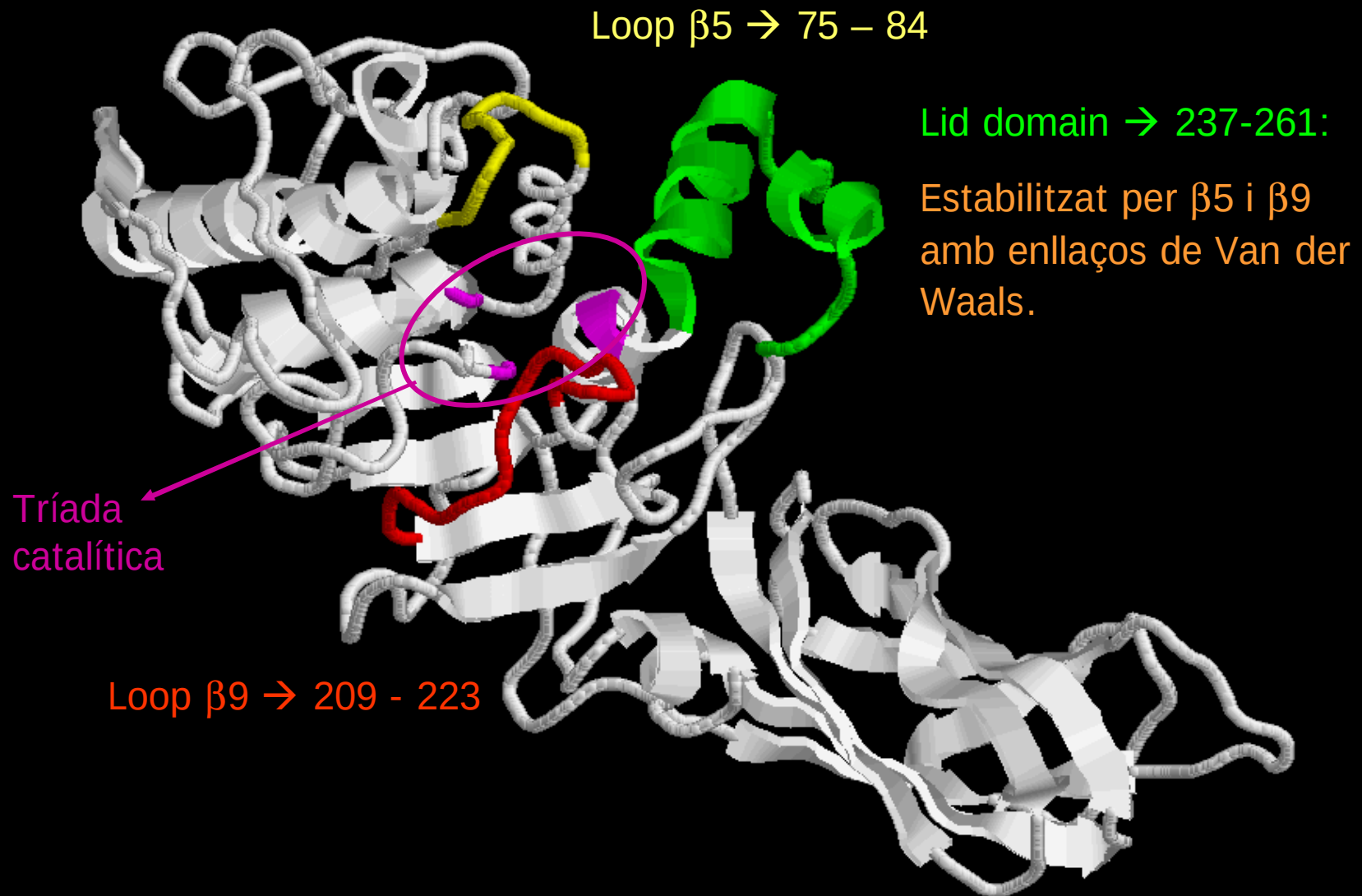
Lid domain (237 – 261) → loop de superfície

Triada catalítica :

Ser152 + Asp176 + His263

LIPASA PANCREÀTICA : Domini N-terminal

- LOOPS ACTIUS:



LIPASA PANCREÀTICA : Domini N-terminal

- Reorganització estructural de $\beta 5$ i lid domain en presència d'interfase, promovent la conformació oberta.

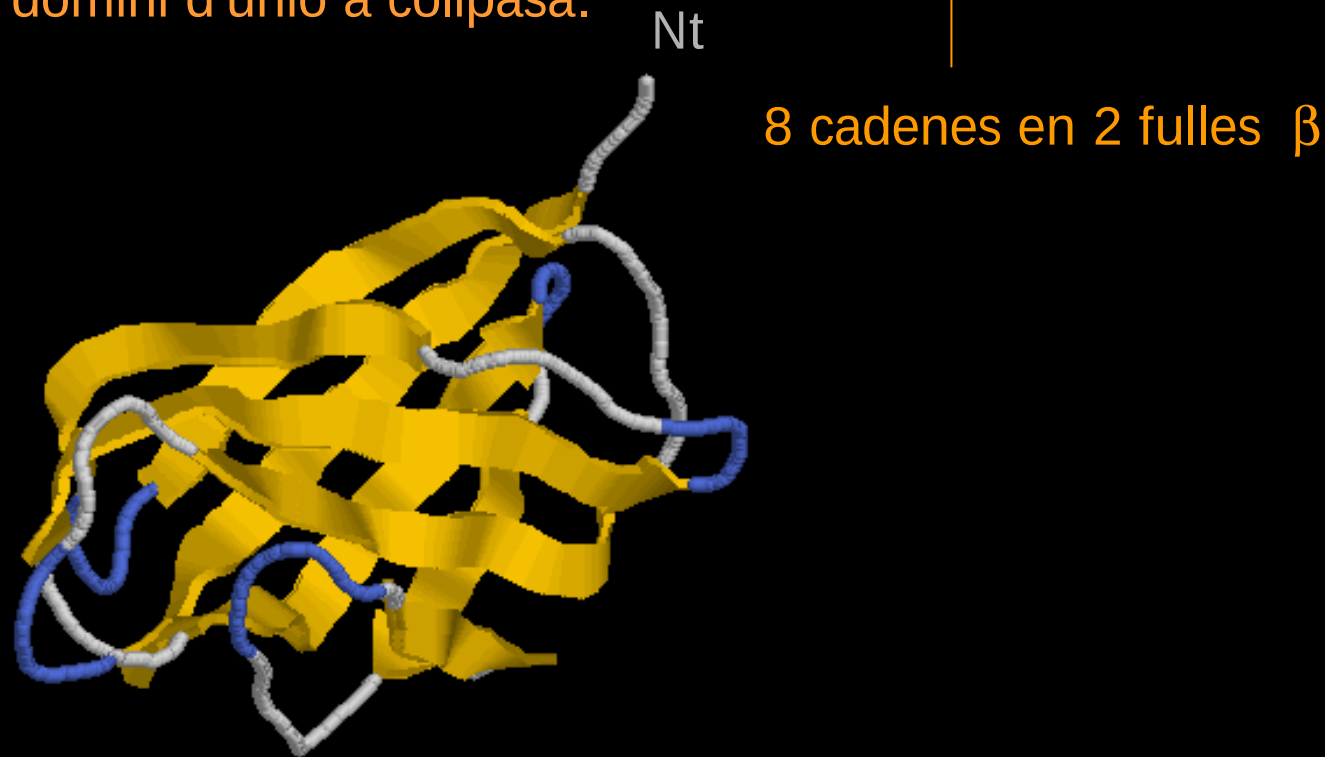
→ Accés del substrat al lloc actiu.

Oxyanion Hole → regió propera a Ser152 que estabilitza estat de transició intermediari format durant la catàlisi (Phe77 i Leu153)

→ Establiment de nous llocs de contacte amb la colipasa pel seu Nt.

LIPASA PANCREÀTICA: Domini C-terminal

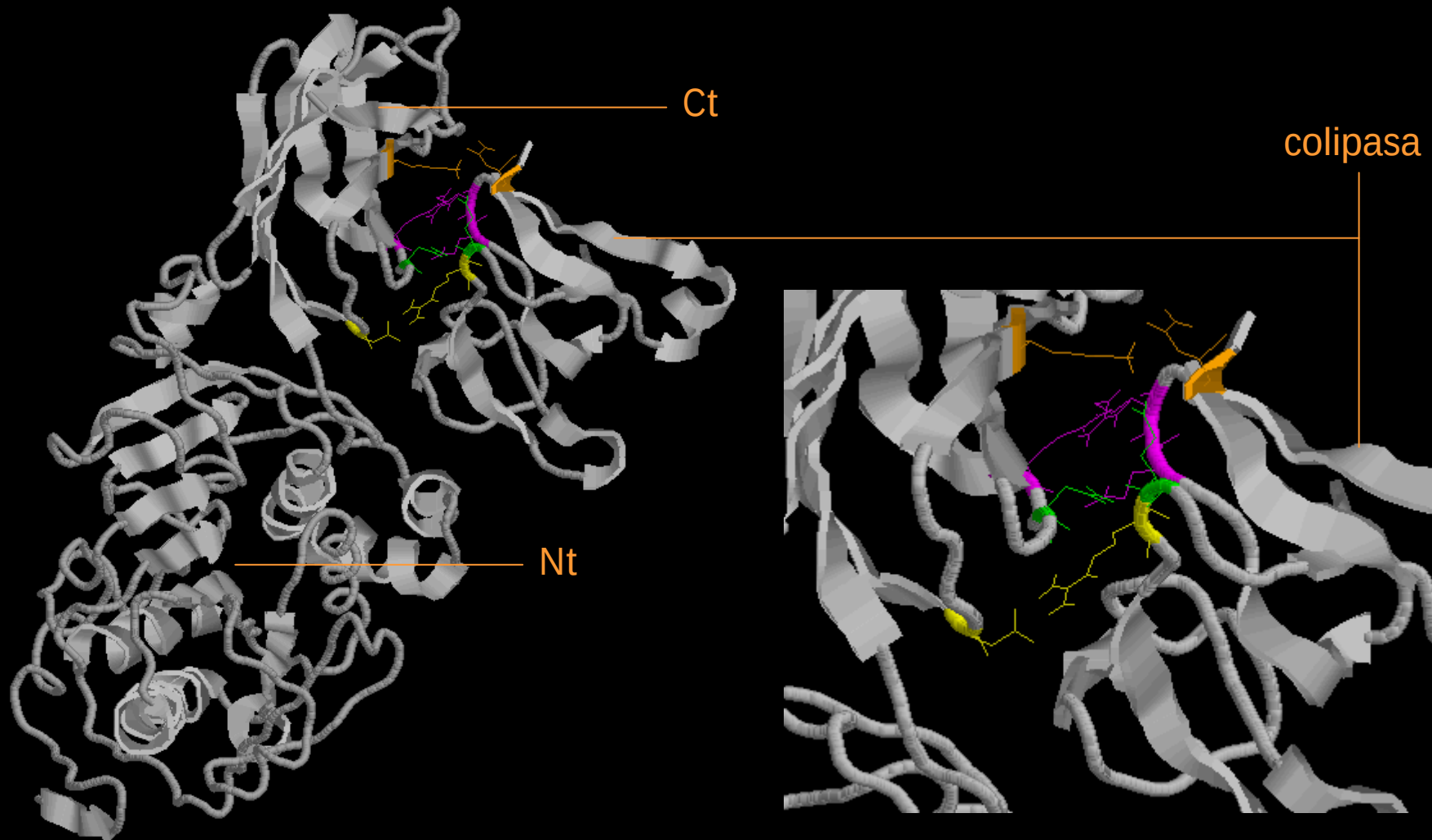
- **Classe:** proteïnes tot β .
- **Plegament:** domini lipasa/lipooxigenasa (sandwich β)
- **Superfamília:** lipasa/lipooxigenasa.
- **Família:** domini d'unió a colipasa.



- Unit a colipasa tant en conformació oberta com tancada.

LIPASA PANCREÀTICA - COLIPASA

- Establiment de contactes polars.



COLIPASA

- Proteïna que interacciona amb la HPL.
- Facilita la interacció lipasa-substrat.
- Permet que la lipasa pugui actuar en presència de sals bilars.

Estructura:

79 residus

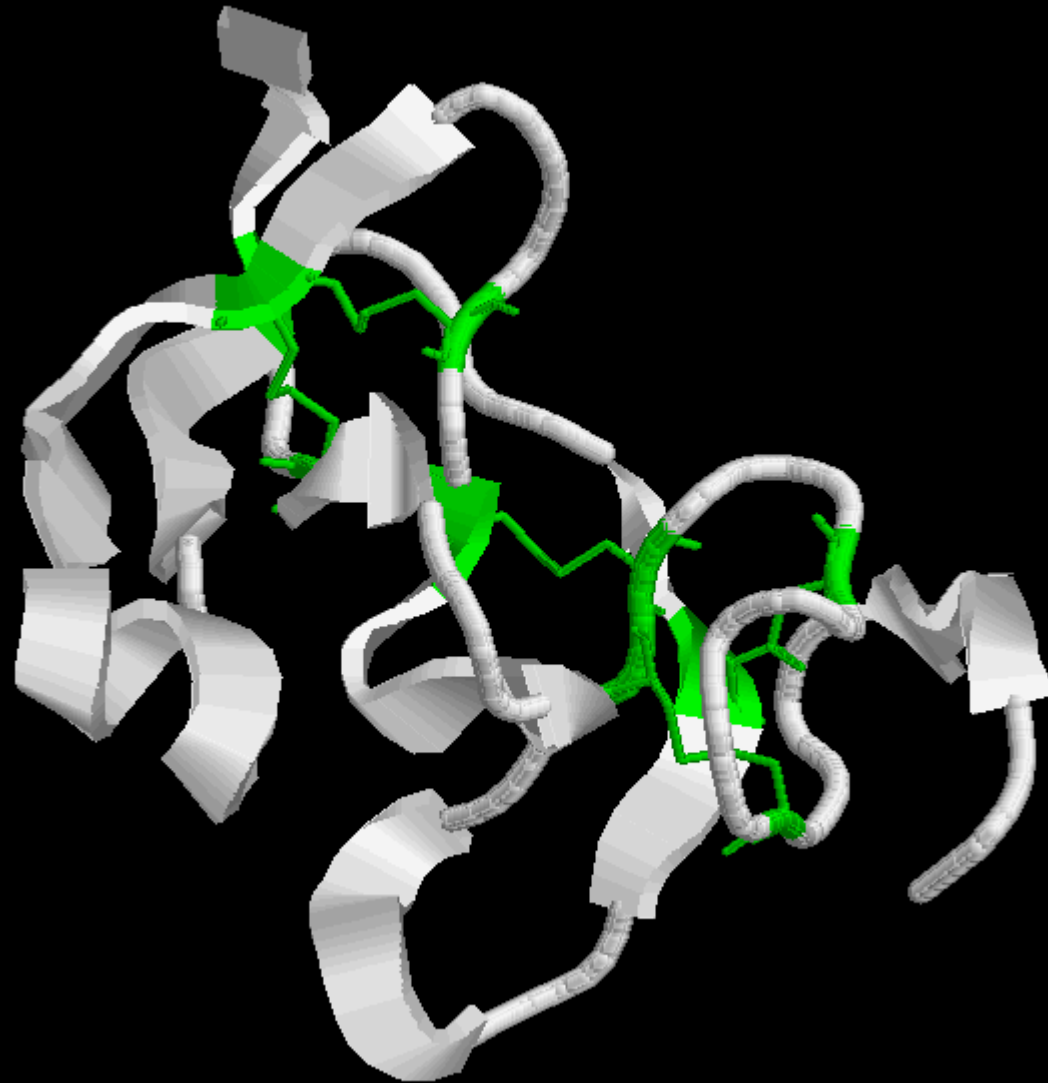
3 fingers: 26-39

47-64

67-87

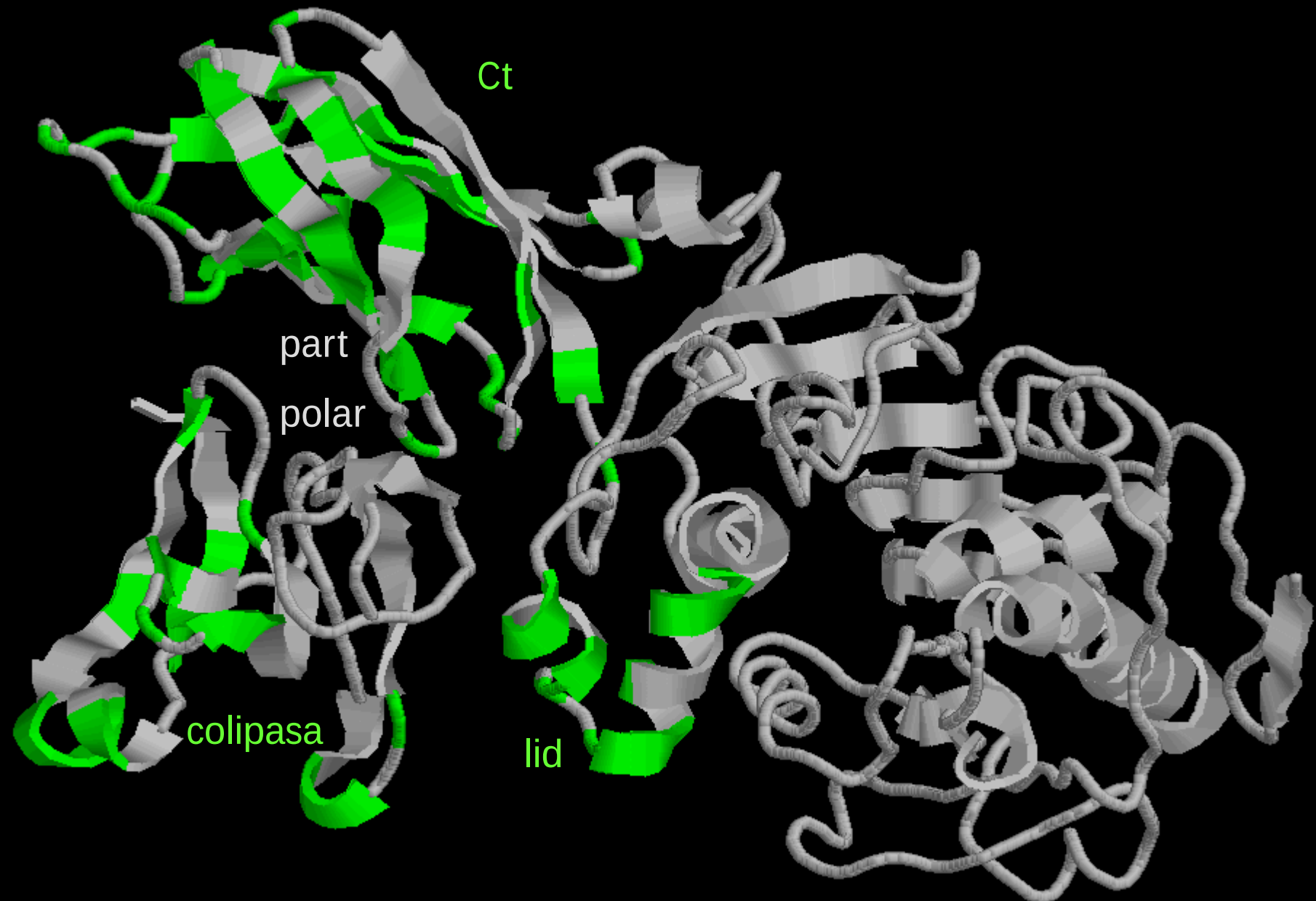


COLIPASA



ponts diS → estabilització de la colipasa

COLIPASA



COLIPASA



superfície hidrofòbica

PANCREATIC RELATED PROTEIN

- PLRP2 és la millor estudiada.

SIMILITUDS

- Seqüència primària:

hPLRP1 i hPLRP2: 68% i 65% d'identitat amb la PL.

- Dominis estructurals:

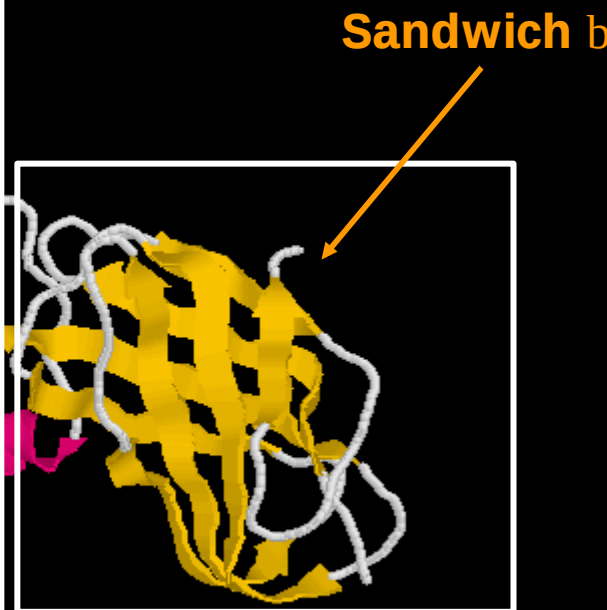
{ Domini N-Terminal: globular
{ Domini C-Terminal: sandwich beta

PANCREATIC RELATED PROTEIN

Fulla b + 5 hèlixs



N -Terminal



C -Terminal

PANCREATIC RELATED PROTEIN

- Glicosilacions: 334 Asn entre N i C terminal.
- Site actiu:
 - La topologia del site actiu de rPLRP2 caract. lipases.
 - La tríada catalítica es conserva: 152Ser, 263 His, 176Asp

Tríada catalítica
en fenedura HB



Ser 152

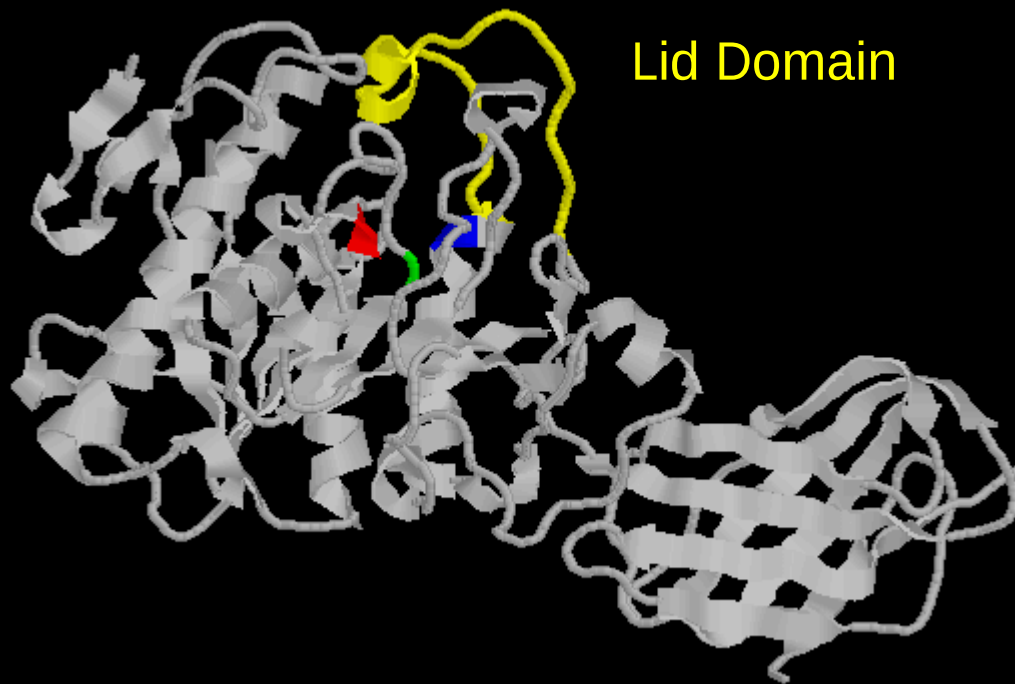
His 263

Asp 176

PANCREATIC RELATED PROTEIN

- Lid:

- Site actiu cobert pel lid.
- Localitzat entre els dos R de Cys 237-261 units per ponts disulfur.
- Juntament amb el loop $\beta 5$ adopta = conformació α en PL.



Lid Domain

Ser 152

His 263

Asp 176

PANCREATIC RELATED PROTEIN

- Interacció amb colipasa:
 - Els 3 R del lid domain involucrats amb la interacció amb la colipasa són conservats.
 - 12 R residus C-terminals interactuen amb la colipasa.

La majoria d'interaccions són conservades.

Només 4R diferents de hPL (Phe360Tyr, Ile401Leu, Tyr403Asn, Glu441Asp).

PANCREATIC RELATED PROTEIN

DIFERÈNCIES:

Funcionals + Cinètiques → Estructura

- Glicosilacions: PLRP1 (R138) → no en PL ni PLRP2
R166 → clàssic de les lipases (No en PLRP1-2)
- Funció:
 - PLRP1 → no activitat coneguda
 - PLRP2 → a diferència de la PL presenta altres funcions a més a més de la hidròlisi de greixos.
- Especificitat de substrat:
 - Conservació de la tríada catalítica → però PLRP2 menor especificitat de substrat que PL.
 - Hidrolitza triglicèrids, fosfolípids i galactolípids (PL només TG).

PANCREATIC RELATED PROTEIN

-L'est. rPLRP2 no explica les diferents activitats.

No diferències en els residus entorn el site actiu.

Diferències en el lid domain i el loop 5 → no expliquen les diferències de substrat.

Possiblement R llunyans al site actiu implicats

- PLRP2 hidrolitza monòmers de TG de cadena curta solubles en H₂O.

- PL té baixa activitat contra substrats monomèrics.

- PL incrementa l'activitat en substrats insolubles → Interfase lípid – H₂O → Activitat interfacial.

- rPLRP2 presenta activació interfacial → diferent a la de la PL.

LIPASA HEPÀTICA – LIPOPROTEIN LIPASA

LPL DIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVIA
HL VDAIHTFTREHMGLSVGIKQPIG } lid

aa. àcids

3

5

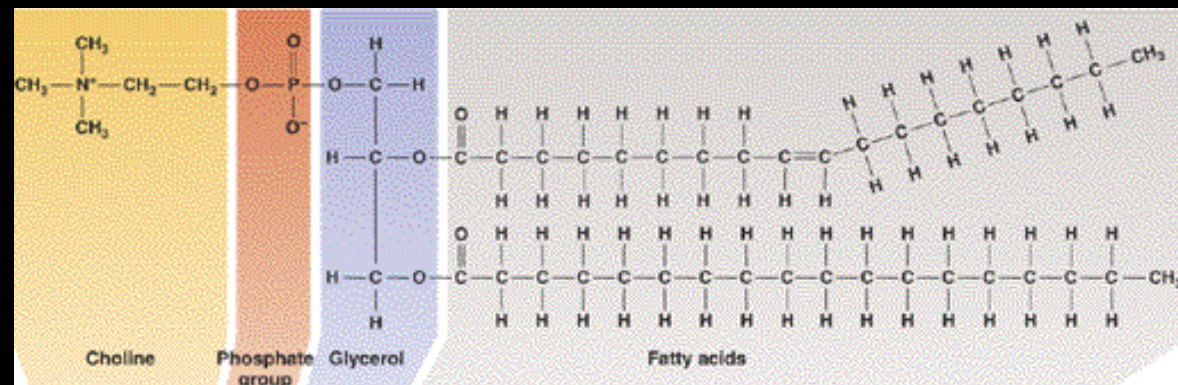
aa. bàsics

3

1

HL → lid neutre = permet entrada de fosfolípids, hidrolitzant-los.

LPL → lid carregat negativament = repulsió cap fosfolípid



BIBLIOGRAFIA

- Bezzine S. et al. Human pancreatic lipase: an exposed hydrophobic loop from the C-terminal domain may contribute to interfacial binding (1998) *Biochemistry* 37; 11846-11855
- Canaan S. Et al. Gastric lipase: crystal structure and activity (1999) *Biochimica et Biophysica acta*. 1441; 197-204.
- Carrier F. Et al. Pancreatic Lipase Structure-Function Relationships by Domain Exchange (1997) *Biochemistry*, 36, 239-248.
- Roussel A. Et al. Structure and activity of Rat Pancreatic Lipase-related protein 2. (1998) *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.237, N°48, 32121-3218.
- Dugi K. Et al. Human Hepatic and Lipoprotein Lipase: The loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity (1995). *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.270, N°43, 25396-25401.
- Roussel A. Et al. Crystal Structure of Human Gastric Lipase and Model of Lysosomal Acid Lipase, Two Lipolytic Enzymes of Medical Interest. *The Journal of Biological Chemistry* (1999). Vol.274, N°24, 16995-17002.
- Egloff MP. Et al. Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase. *Protein Science* (1995), 4:44-57.

BIBLIOGRAFIA

- Perret B. Et al. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. Journal of Lipid Researc (2002) Vol.43
- Shi Y. Et al. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. Nature Reviews (2004) Vol.3
- Tilbeurgh H. Et al. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. Nature (1992). Vol.359
- Hide W. Et al. Structure and evolution of the lipase superfamily. Journal of Lipid Research (1992). Vol.33
- Wong H. Et al. The lipase gene family. Journal of Lipid Researc (2002) Vol.43

Programes emprats: STAMP, Rasmol, PSI-BLAST.

Bases de dades: Pfam, SCOP, PDB, NCBI.

PREGUNTAS

PEM

1. Què és el que protegeix a la lipasa gàstrica de ser degradada per les pepsines presents en el suc gàstric? Indica la resposta correcta.
- a) la seva gran quantitat de ponts d'hidrogen
 - b) la seva gran quantitat de ponts disulfur
 - c) la seva elevada glicosilació
 - d) a i b són correctes
 - e) Cap de les anteriors

LA RESPOSTA CORRECTA ÉS LA C).

2. Assenyaleu les afirmacions correctes respecte la lipasa gàstrica:
- 1- pertany a la classe de proteïnes a /b
 - 2- presenta un plegament a /b hidrolasa
 - 3- és una triacilglicerol lipasa
 - 4- interacciona amb la colipasa per a un hidròlisi de triglicèrids eficient
- a) 1, 2 i 3
 - b) 1 i 3
 - c) 2 i 4
 - d) 4
 - e) 1, 2, 3 i 4

LA RESPOSTA CORRECTA ÉS L'A).

3. Respecte la lipasa gàstrica quines afirmacions són falses?

- a) consta de dues cadenes
- b) té un plegament lipasa /lipooxygenasa
- c) a i b
- d) consisteix en un core i un domini d'extrusió
- e) té 4 llocs de N-glicosilació

LA RESPOSTA CORRECTA ÉS LA C).

4. Quin o quins aminoàcids són els responsables de l'atac nucleòfil al substrat?

- a) His
- b) Ser
- c) Asp
- d) totes les anteriors
- e) cap de les anteriors

LA RESPOSTA CORRECTA ÉS L'B).

5. Respecte el “lid domain”, assenyala les correctes.

1- regula l'accés al substrat

2- en la lipasa pancreàtica s'uneix a la colipasa tant en conformació oberta com tancada

3- en la lipasa gàstrica forma el domini d'extrusió, juntament amb el “cap”

4- participa en l'atac nucleòfil

a) 1, 2 i 3

b) 1 i 3

c) 2 i 4

d) 4

e) 1, 2, 3 i 4

LA RESPOSTA CORRECTA ÉS LA B).

6. Respecte les lipases en general

a) tenen un origen ancestral comú

b) tenen un core constituït per una triada catalítica i l'oxyanion hole

c) a i b són correctes

d) l'oxyanion hole estabilitza els intermediaris de la reacció nucleofílica

e) totes les anteriors són correctes

LA RESPOSTA CORRECTA ÉS L'E).

7. Assenyala les respostes correctes respecte la lipasa pancreàtica

1- presenta dos dominis amb plegament diferenciat

2- la colipasa s'uneix al domini N-terminal

3- té funció principal en el duodè

4-el domini N-terminal té plegament b sandwich

a) 1, 2 i 3

b) 1 i 3

c) 2 i 4

d) 4

e) 1, 2, 3 i 4

LA RESPOSTA CORRECTA ÉS LA B).

8. Pel que fa a la colipasa

1- presenta estructura secundària definida

2- la part hidrofòbica dels fingers es troba en contacte amb la lipasa

3- és inhibida per àcids biliars

4- juntament amb el "lid" obert augmenta la superfície de contacte amb el substrat

a) 1, 2 i 3

b) 1 i 3

c) 2 i 4

d) 4

e) 1, 2, 3 i 4

LA RESPOSTA CORRECTA ÉS D).

9- Respecte a la PLRP, assenyala les respostes correctes:

- a) El seu % d'identitat amb la lipasa pancreàtica es troba entre el 60 i el 70 %**
- b) La PLRP2 pot hidrolitzar altres lípids diferents dels TG.**
- c) A i B són correctes**
- d) El lid domain de guinea pig (conillet d'índies) té 20aa.**
- e) Totes són correctes**

LA RESPOSTA CORRECTA ÉS LA C).

10- Què deteremina l'obertura del lid domain en la lipasa pancreàtica?

- a) El canvi conformacional del loop b9**
- b) El moviment del loop b5**
- c) La presència d'àcids biliars**
- d) La presència de la colipasa**
- e) Cap de les anteriors**

LA RESPOSTA CORRECTA ÉS L'A).

PREGUNTES

ASSAIG

1. Quines són les característiques estructurals de les lipases ?

Les lipases presenten un **core** amb plegament α/β hidrolasa format per 8 cadenes β (7 d'elles paral·leles i una antiparal·lela), i 6 hèlixs α (3 a cada cantó). El core conté dos elements necessaris per portar a terme l'activitat lipasa. Per un cantó, la *tríada catalítica* formada per Ser/His/Asp (conservada estructuralment però no en seqüència), de la qual la Serina és l'aminoàcid més rellevant, porta a terme l'atac nucleòfil. Per altra banda, en el core trobem l'*oxyanion hole*, format per dos residus que s'encarreguen d'estabilitzar el producte intermediari de la catàlisi. Aquesta estabilització s'aconsegueix mitjançant càrregues positives que compensen la càrrega negativa de l'oxianió de l'intermediari.

L'altra característica estructural rellevant és el "**lid domain**". Es tracta d'un loop que cobreix la tríada catalítica evitant el lliure accés del substrat quan l'enzim es troba en conformació tancada. En presència del substrat adequat, el "lid domain" s'obre i permet l'accés del substrat a la tríada catalítica.

2. Indica les interaccions entre colipasa i lipasa pancreàtica, així com les implicacions funcionals que se'n deriven.

La colipasa és un cofactor necessari per a la correcta activitat de la lipasa pancreàtica, ja que facilita l'activitat de la lipasa en presència de sals biliars en elevades concentracions (creen un ambient polar que dificulta l'activitat de la lipasa pancreàtica).

La colipasa es troba unida de forma permanent al domini C-terminal de la lipasa pancreàtica, el qual té un plegament β -sandwich. Aquest cofactor no disposa d'una estructura secundària ben definida, però es caracteritza per contenir un elevat nombre de ponts disulfur que l'estabilitzen.

Tot i l'absència d'una estructura secundària característica, s'hi poden diferenciar 3 "fingers", els extrems dels quals són hidrofòbics i es troben en el cantó oposat al d'unió a la lipasa.

La interacció amb el domini C-terminal de la lipasa pancreàtica implica residus hidrofílics i es dona principalment per ponts d'hidrogen.

La colipasa, doncs, presenta una assimetria pel que fa a la distribució de residus. Per una banda els residus hidrofílics permeten la unió a la lipasa pancreàtica, i per l'altre, els residus hidrofòbics. Aquests augmenten la superfície de contacte amb el substrat, juntament amb els residus del lid (en conformació oberta es troba unit a la colipasa) i això facilita l'activitat catalítica de l'enzim.

3. Anomena les similituts i diferències principals entre la lipasa pancreàtica i la PLRP (Pancreatic Lipase Related protein).

	LIPASA PANCREÀTICA	PLRP
SIMILITUTS	N-terminal → globular i C-terminal → β-sandwich. Conservació en les posicions de la tríada catalítica.	
DIFERÈNCIES	Residus d'interacció del TG com a únics substrats conservats. Funció lipolítica	Altres substrats (PL amb la colipasa galactolípid). Altres funcions (linfòcits i grànuls de zimògen).

4. Quines són les principals diferències entre la lipasa gàstrica i la lipasa pancreàtica?

Lipasa gàstrica	Lipasa pancreàtica
Plegament α/β hidrolasa.	Plegament α/β hidrolasa en el domini N-terminal i tot β (β sandwich) en el domini C-terminal.
Activitat a l'estómac.	Activitat al duodè.
Proteïna altament glicosilada	
El lid forma part del domini d'extrusió, juntament amb el cap.	
No necessita un cofactor per actuar.	Requereix la lipasa per la seva activitat.
Tríada: Ser153/His353/Asp324	Tríada: Ser152/His263/Asp176