

Received: 2004.11.05
Accepted: 2005.02.08
Published: 2005.03.29

Fosfolipazy A w komórkach ssaków – budowa, właściwości, rola fizjologiczna i patologiczna

Phospholipases A in mammalian cells: structure, properties, physiological and pathological role

Bożenna Sadurska, Maria Szumiło

Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie

Fosfolipazy A stanowią różnorodną grupę enzymów, które katalizują hydrolizę wiązań estrowych w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 glicerolofosfolipidów do wolnych kwasów tłuszczowych i lizofosfolipidów. W warunkach prawidłowych enzymy te regulują obrót wolnych kwasów tłuszczowych w fosfolipidach błonowych wpływając na stabilność, płynność i procesy transportu. Fosfolipazy są odpowiedzialne za tworzenie wewnątrzkomórkowych przekazników, takich jak metabolity kwasu arachidonowego. Enzymy te są regulowane przez liczne czynniki m.in. fosforylację, wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia i pH. W pracy omówiono strukturę, funkcję biologiczną fosfolipaz A₁ i A₂ oraz ich udział w chorobach człowieka.

Słowa kluczowe:

fosfolipaza A₁ • fosfolipaza A₂

Summary

Phospholipases A are a diverse group of enzymes, which catalyzes the hydrolysis of the ester bond at the *sn*-1 and *sn*-2 positions of glycerophospholipids, forming free fatty acids and lysophospholipids. In normal conditions, these enzymes regulate the turnover of free fatty acids in membrane phospholipids, affecting membrane stability, fluidity, and transport processes. Phospholipase activity is also responsible for the generation of intracellular messengers, including arachidonic acid metabolites. Phospholipases are regulated by many factors including selective phosphorylation, intracellular calcium, and pH. In this review we discuss the relationships of phospholipases A₁ and A₂, their structure, biological function, and implications in various human diseases.

Key words:

phospholipases A₁, A₂

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7078.pdf

Word count:

4268

Tables:

–

Figures:

–

References:

48

Adres autorki:

dr Bożenna Sadurska, Katedra i Zakład Biochemii AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa;
e-mail: sadurska@amwaw.edu.pl

Wykaz skrótów: **PLA₁** – fosfolipaza A₁; **PLA₂** – fosfolipaza A₂; **PLC** – fosfolipaza C; **PLD** – fosfolipaza D; **lizoPLD** – lizofosfolipaza D; **PS-PLA₁** – fosfolipaza A₁ swoista wobec fosfatydyloseryny; **Dol m I PLA₁** – fosfolipaza A₁ z jadu szerszenia; **mPA-PLA₁ α i β** – fosfolipazy A₁ swoiste wobec kwasu fosfatydowego; **EL** – lipaza endotelialna; **LIPH** – lipaza H; **PA-PLA₁, KIAA0725p, p125** – fosfolipazy A₁ wewnątrzkomórkowe; **PS** – fosfatydyloseryna; **PA** – kwas fosfatydowy; **LPA** – kwas lizofosfatydowy; **PE** – fosfatydyloetanoloamina; **HDL** – lipoproteiny o dużej gęstości; **Sec23p** – białko wiążące się z fosfolipazą p125; **CADs** – leki o strukturze kationowej i lipofilowej (cationic amphiphilic drugs); **sPLA₂** – wydzielnicza fosfolipaza A₂ (secretory PLA₂); **cPLA₂** – cytosolowa fosfolipaza A₂ zależna od Ca⁺² (cytosolic Ca⁺² – dependent PLA₂); **iPLA₂** – cytosolowa fosfolipaza A₂ niezależna od Ca⁺² (cytosolic Ca⁺² – independent PLA₂); **PAF** – płytkowy czynnik aktywujący (platelet-activating factor); **CaLB** – domena wiążąca lipid zależna od Ca⁺² (calcium dependent lipid binding domain); **PKC** – kinaza białkowa C; **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; **PtdInsP₂** – 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu; **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor α); **CHO** – komórki jajnika chomika chińskiego; **cAMP** – cykliczny 3'-5' adenozy-no-mono-fosforan

WSTĘP

Fosfolipazy tworzą dużą grupę enzymów, które katalizują hydrolizę fosfolipidów. Głównymi substratami tych enzymów są glicerolofosfolipidy, które z cholesterolem, glikolipidami i białkami wchodzi w skład błon biologicznych. Złożoność struktur fosfolipidów wpływa na ich różną rolę w stabilności, płynności i przepuszczalności błon, a w konsekwencji odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie kanałów jonowych i receptorów, czy tworzenie pęcherzyków wydzielniczych. Glicerol w pozycji *sn-1* najczęściej jest zestryfikowany nasyconymi kwasami tłuszczowymi, podczas gdy nienasycone kwasy tłuszczowe (głównie kwas arachidonowy) zajmują pozycję *sn-2*.

W warunkach prawidłowych homeostaza glicerolofosfolipidów jest utrzymywana dzięki równowadze między syntezą *de novo*, resyntezą przez recylację, katabolizmem oraz transportem fosfolipidów. W tych złożonych procesach zaangażowane są liczne enzymy.

Fosfolipazy hydrolizujące glicerolofosfolipidy dzielimy na dwie grupy. Jedną grupę stanowią acylohydrolazy, do których należą fosfolipazy A₁ i A₂, odpowiednio rozkładające wiązania estrowe w pozycji *sn-1* i *sn-2* fosfolipidów, a drugą grupę fosfodiesterazy – fosfolipaza C hydrolizująca wiązanie glicerolo-fosforanowe i fosfolipaza D katalizująca powstawanie kwasu fosfatydowego.

1. FOSFOLIPAZY A₁

Fosfolipazy A₁ (PLA₁ – EC 3.1.1.32) są grupą enzymów, które hydrolizują wiązanie estrowe w pozycji *sn-1* glicerolofosfolipidów uwalniając wolny kwas tłuszczowy i lizofosfolipidy. Aktywność PLA₁ wykazano w wielu komórkach i tkankach różnych organizmów, m.in. w płytkach krwi szczura, mózgu i jądrach wołu, wątrobie człowieka, jądzie szerszeni czy grzybach. Dotąd opisano i zidentyfikowano wiele białek o aktywności PLA₁ różniących się budową, lokalizacją komórkową, swoistością substratową czy optimum pH. W zależności od lokalizacji komórkowej wyróżniamy dwie grupy izoenzymów PLA₁: wydzielnicze (zewnątrzkomórkowe) i wewnątrzkomórkowe.

1.1. Fosfolipazy A₁ wydzielnicze

Do fosfolipaz wydzielniczych należą: PLA₁ – swoista wobec fosfatydyloseryny (PS-PLA₁), PLA₁ z jadu szerszenia

(Dol m I PLA₁), fosfolipazy związane z błoną – swoiste wobec kwasu fosfatydowego (mPA-PLA₁ α i β), a także lipaza endotelialna (EL). Wszystkie te enzymy należą do dużej rodziny lipaz, kodowanych w organizmach zwierzęcych przez co najmniej 8 genów.

Analizując budowę strukturalną lipaz wykazano udział w katalizie reakcji hydrolizy dwóch niezależnych domen. Jedną jest domena w N-terminalnej sekwencji łańcucha polipeptydowego zwana „lid”, zawierająca centrum aktywne z katalityczną triadą Ser-Asp-His. W większości lipaz, takich jak: lipaza trzustkowa, wątrobową czy lipoproteinową, domena ta jest zbudowana z 22 lub 23 aminokwasów. Natomiast fosfolipazy: PS-PLA₁, mPA-PLA₁ α, Dol m I PLA₁ i EL zawierają jej krótszą wersję tzw. „short lid”, składającą się odpowiednio z 12, 12, 7 i 18 aminokwasów.

Drugą domeną charakterystyczną dla lipaz jest tzw. „β9 loop”, umiejscowiona blisko miejsca katalitycznego enzymu. Domena ta jest obecna w lipazie trzustkowej, wątrobowej i lipoproteinowej, a nie ma jej w fosfolipazach A₁ sekrecyjnych. Znajomość tych molekularnych właściwości, tzn. obecność domeny „short lid” i brak domeny „β9 loop” pozwoli w przyszłości na identyfikację nowych izoenzymów podrodziny fosfolipaz A₁ i wyjaśnienie ich funkcji fizjologicznych.

Najlepiej poznaną fosfolipazą wydzielniczą A₁ jest fosfolipaza swoista wobec fosfatydyloseryny (PS-PLA₁). Jest glikoproteiną zbudowaną z 456 aminokwasów i masie cząsteczkowej około 55 kDa [3]. Enzym wykazuje 30% homologię z lipazą trzustkową, lipoproteinową i wątrobową. Gen ludzkiej PS-PLA₁ jest umiejscowiony na chromosomie 3 w *locus* q13.13-q13.2 [34]. Dużą aktywność enzymu obserwuje się w płytkach krwi, sercu i płucach szczura, w wątrobie i jądrach człowieka, a śladową w płytkach krwi ludzkich i mysich [2]. W płytkach krwi szczura PS-PLA₁ jest magazynowana w alfa-ziarnistościach, skąd jest uwalniana w czasie aktywacji płytek przez trombinę i kolagen. Może to wskazywać, że enzym jest wydzielany podczas koagulacji krwi. PS-PLA₁ jest wydzielana z komórek i wykazuje powinowactwo do heparyny, tak jak inne enzymy z rodziny lipaz [34].

Fosfolipaza PS-PLA₁ hydrolizuje swoiste fosfolipidy serynowe: fosfatydyloserynę (PS) oraz 1-acylo-2-lizofosfatydy-

loserynę. Fosfatydyloseryna jest rozkładana do 2-acylo-1-lizofosfatydyloseryny i kwasu tłuszczowego. Wykazano, że uwalniany lizofosfolipid uczestniczy m.in. w aktywacji komórek sutkowych i w hamowaniu wzrostu limfocytów T [2].

Drugim substratem dla fosfolipazy PS-PLA₁ jest powstająca z fosfatydyloseryny pod wpływem działania fosfolipazy wydzielniczej A₂ (s-PLA₂) 1-acylo-2-lizofosfatydyloseryna. Jest ona rozkładana do glicerolofosfoseryny i kwasu tłuszczowego. 1-acylo-2-lizofosfatydyloseryna aktywuje komórki sutkowe, a także uczestniczy w rozwoju komórek nerwowych [3].

Fosfolipidy serynowe są zaangażowane w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Fosfatydyloseryna bierze udział w procesie koagulacji krwi, fagocytozie, apoptozie, a także w aktywacji licznych enzymów wewnątrzkomórkowych, takich jak kinaza białkowa C, syntaza tlenku azotu czy kinaza diacyloglicerolowa. Fosfatydyloseryna jest umiejscowiona głównie na wewnętrznej stronie błon plazmatycznych różnych typów komórek, ale może pojawiać się po zewnętrznej stronie błony w wyniku stymulacji przez różne czynniki np. cytokiny, w stanach zapalnych czy podczas aktywacji płytek krwi. Powierzchniowa ekspozycja fosfatydyloseryny jest markerem procesu apoptozy. W świetle tych badań uważa się, że enzym PS-PLA₁ może być zaangażowany w powyższe procesy regulując syntezę i rozpad fosfolipidów serynowych [3].

Fosfolipazy mPA-PLA₁α i β są białkami związanymi z błonami, zawierającymi odpowiednio 451 i 460 aminokwasów oraz masie cząsteczkowej około 55 kDa [23]. Obie fosfolipazy charakteryzują się dużą homologią względem fosfolipazy PS-PLA₁, obie odznaczają się wrażliwością na wanad, ale wykazują różne powinowactwo do heparyny (izoenzym beta ma większe powinowactwo). Ludzki gen zlokalizowano na 21 chromosomie w *locus* q11.1 dla izoenzymu mPA-PLA₁ beta, a dla alfa na chromosomie 3.

Enzym mPA-PLA₁α jest obecny w różnych tkankach człowieka, takich jak trzustka, jajniki, jądra, prostata, ale największą aktywność wykazuje w płytkach krwi [41]. Białko mPA-PLA₁β wykryto w ludzkiej spermie, a największą aktywność enzymu stwierdzono w jądrach.

Obydwa enzymy wykazują selektywną swoistość wobec kwasu fosfatydowego, zawierającego nienasycone kwasy tłuszczowe w pozycji *sn*-1 i *sn*-2, hydrolizując go do kwasu lizofosfatydowego (LPA) [23]. Fosfolipazy mPA-PLA₁ biorą więc udział wraz z innymi enzymami (PLA₂, PLD, lizoPLD) w generowaniu kwasu lizofosfatydowego, ważnego lipidowego mediatora o różnej funkcji biologicznej. LPA bierze udział w indukcji agregacji płytek krwi, skurczu mięśni gładkich, stymuluje proliferację komórek, a także jest zaangażowany w takich procesach patologicznych jak arterioskleroza czy inwazja komórek nowotworowych [2].

Lipaza endotelialna (EL) również wykazuje aktywność katalityczną fosfolipazy A₁. Białko to jest zbudowane z 500 aminokwasów, w tym z 18-aminokwasowej domeny „short lid”, charakterystycznej dla podrodziny PLA₁. Enzym wykazuje dużą homologię do lipazy lipoproteinowej (44%) oraz lipazy wątrobowej (41%) [24]. Gen ludzkiej EL zlokalizowano na chromosomie 18 w *locus* q21.1. W organi-

zmie człowieka ekspresję EL stwierdzono w naczyniach wieńcowych, wątrobie, płucach, nerce, łożysku, tarczycy, jądrach i jajnikach [6,24,27]. Substratami EL są zarówno fosfolipidy, jak i triacyloglicerole lipoprotein o dużej gęstości (HDL). W porównaniu z lipazą lipoproteinową i wątrobową enzym wykazuje większą aktywność fosfolipazową, a mniejszą lipolityczną.

Lipaza endotelialna odgrywa ważną rolę w metabolizmie lipoprotein HDL, przez co ma wpływ na poziom cholesterolu w surowicy krwi. Synteza enzymu przez komórki endotelialne jest regulowana przez prozapalne cytokiny. Sugeruje się, że EL może być ważnym modulatorem metabolizmu lipidów, może uczestniczyć w homeostazie energetycznej ustroju, w procesach zapalnych i chorobach naczyń wieńcowych [14].

Ostatnio, w organizmie ludzkim zidentyfikowano kolejny enzym sekrecyjny, nazwany lipazą H (LIPH) [28]. Jest to białko zbudowane z 451 aminokwasów, w tym z 12-aminokwasowej domeny „short lid”, o masie cząsteczkowej 63 kDa. Wykazuje 47% homologii z PS-PLA₁ i 46% z lipazą endotelialną. Gen ludzkiej LIPH zlokalizowano na chromosomie 3 w *locus* q27-q28. W organizmie człowieka ekspresję tego białka wykazano w jelicie cienkim i grubym, płucach oraz trzustce. Enzymatyczna i fizjologiczna funkcja tego enzymu pozostaje nieznana.

1.2. Fosfolipazy A₁ wewnątrzkomórkowe

Dotychczas zidentyfikowane wewnątrzkomórkowe fosfolipazy A₁ – preferencyjnie hydrolizują kwas fosfatydowy (PA). Należą do nich trzy białka: PA-PLA₁, KIAA0725p i p125.

Analizując sekwencje genomu ludzkiego stwierdzono, że geny tych białek są umiejscowione odpowiednio na 14, 8 i 10 chromosomie. Największą ekspresję mRNA tego enzymu w organizmie człowieka wykazano w jądrach i w mózgu. Nie stwierdzono aktywności PA-PLA₁ w wątrobie, nerce i sercu.

Fosfolipaza PA-PLA₁ z jąder wołu jest białkiem zawierającym 875 aminokwasów, masie cząsteczkowej 98 kDa i optimum pH około 8,0 [20,21]. Aktywność enzymu jest regulowana za pośrednictwem modyfikacji kowalencyjnej przez fosforylację i defosforylację [18]. Przypuszcza się, że fosfolipaza PA-PLA₁ uczestniczy w przekazaniu sygnałowym z udziałem kwasu fosfatydowego, jako wtórny przekaźnik. W komórce PA może powstawać w dwójaki sposób: z fosfatydylocholino z udziałem fosfolipazy D lub z fosfatydyloinozytolu z udziałem fosfolipazy C, a następnie fosforylacji przez kinazę diacyloglicerolową. Kwas fosfatydowy powstający podczas aktywacji komórek, m.in. stymuluje rozpad 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PtdInsP₂) do 3,4,5-trisfosforanu inozytolu, uczestniczy w uwalnianiu kwasu arachidonowego przez aktywację fosfolipazy A₂, a także bierze udział w tworzeniu retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego. Sugeruje się, że PA-PLA₁ jest zaangażowana również w procesie spermatogenezy i interakcji neuronalnej [35].

Izoenzymy KIAA0725p i p125 są homologami PA-PLA₁ wszechobecnymi w komórkach organizmów zwierzę-

cych. Zbadano, że białko p125 oddziałuje z białkiem eukariotycznym Sec23p poprzez domenę N-kończącą, bogatą w prolinę i w ten sposób bierze udział w tworzeniu błon pęcherzyków retikulum endoplazmatycznego [33]. Dotychczas nie wykazano aktywności katalitycznej białka p125 [35].

KIAA0725p preferencyjnie hydrolizuje kwas fosfatydowy oraz fosfatydyloetanolinę (PE). Izoenzym KIAA0725p nie ma domeny bogatej w prolinę, a jego aktywność jest wymagana do fuzji błon i agregacji retikulum [35]. Hydroliza PA i (albo) PE do lizofosfolipidów przez KIAA0725p sprzyja więc tym procesom.

Ze względu na różną lokalizację enzymów KIAA0725p i PA-PLA₁ sugeruje się, że fosfolipaza KIAA0725p odgrywa rolę w komórkach niewyspecjalizowanych, podczas gdy fosfolipaza PA-PLA₁ przede wszystkim w komórkach wyspecjalizowanych.

W lizosomach komórek eukariotycznych występuje także fosfolipaza A₁, ale o kwaśnym optimum pH. Aktywność tego enzymu wykazano m.in. w wątrobie człowieka [31], w wątrobie i nerce szczura [31]. Lizosomalna, kwaśna fosfolipaza A₁ jest glikoproteiną, a jej aktywność nie zależy od jonów wapnia. Enzym ten uczestniczy w degradacji fosfolipidów lipoprotein surowicy, a także degradacji wewnątrzkomórkowych błon dostarczanych do lizosomów.

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia, że kwaśna fosfolipaza A₁, tak jak fosfolipaza A₂ może odgrywać ważną rolę w fosfolipidozach – chorobach polegających na akumulacji fosfolipidów w lizosomach. Wykazano brak aktywności fosfolipazy A₁ w fibroblastach pacjentów chorych na mukolipidozy II i III oraz u pacjentów z chorobą Niemann-Picka [26]. Fosfolipidozy mogą być również indukowane lekami mającymi strukturę kationową i lipofilową zwanymi CADs (cationic amphiphilic drugs) [39,46]. Jednym z mechanizmów działania tych leków jest zahamowanie aktywności lizosomalnej fosfolipazy A₁ [44].

2. FOSFOLIPAZY A₂

Fosfolipaza A₂ (PLA₂ – EC 3.1.1.4.) jest przedstawicielem dużej rodziny enzymów z klasy acylohydrolaz, które hydrolizując wiązanie estrowe w pozycji *sn*-2 glicerolofosfolipidów uwalniają wolny kwas tłuszczowy i lizofosfolipid.

W komórkach ssaków w pozycji *sn*-2 fosfolipidów szczególnie często występuje kwas arachidonowy. Fosfolipaza A₂ uwalnia kwas arachidonowy z fosfolipidów błonowych, który następnie może funkcjonować jako drugi przekaznik aktywując bezpośrednio kinazy (PKC i MAPK). Kwas arachidonowy jest wykorzystywany również jako prekursor do syntezy eikozanoidów, które są potencjalnymi mediatorami procesu zapalnego i przekazywania sygnałów w komórce. W wyniku działania cyklooksygenazy powstają z niego prostaglandyny, tromboksany i prostacykliny, a pod wpływem lipooksygenaz leukotrieny i lipoksyny.

Drugi produkt działania fosfolipazy A₂ – lizofosfolipid jest ważnym elementem komórkowego przekazywania sygnałów, przebudowy fosfolipidów czy też powstawania zaburzeń w błonach. Lizofosfolipid 1-alkilo-fosfatydylocholi-

na jest prekursorem płytkowego czynnika aktywującego – PAF (plate-activating factor).

Fosfolipaza A₂ biorąc udział w syntezie różnych efektatorów przekazywania sygnałów w komórce jest bardzo ważnym enzymem regulującym metabolizm komórki, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych (np. procesy zapalne, astma itp.) [10].

W organizmach ssaków zidentyfikowano bardzo wiele izoenzymów PLA₂ różniących się strukturą pierwszorzędową, lokalizacją tkankową, funkcją, swoistością substratową, wrażliwością na inhibitory czy wymaganiami względem jonów Ca⁺².

Dotychczas opisano 19 białek wykazujących aktywność fosfolipazy A₂, większość z nich, poza jednym wyjątkiem – IIC PLA₂, występuje także u ludzi. Podstawą klasyfikacji fosfolipaz A₂ jest sekwencja nukleotydowa ich genów oraz sekwencja aminokwasowa odpowiednich izoenzymów. W ostatniej dekadzie nastąpił wielki postęp w oczyszczaniu, sekwencjonowaniu i charakterystyce enzymów mających aktywność fosfolipazy A₂.

Dotąd sklasyfikowano 14 grup fosfolipaz A₂, zawierających liczne podgrupy [10,40]. Wśród nich dziesięć grup enzymów wykorzystuje histydynę do katalizy i wymaga milimolarnych stężeń Ca⁺² do przeprowadzenia reakcji. Są to grupy: I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII i XIV określane też jako fosfolipazy wydzielnicze. Większość z nich, poza nielicznymi wyjątkami, występuje w organizmach ssaków. Dwie grupy enzymów – IV i VI są umiejscowione wewnątrzkomórkowo, mają dużą masę cząsteczkową i serynę w miejscu aktywnym uczestniczącą w reakcji hydrolizy. Najlepiej poznany izoenzym z grupy IV – fosfolipaza IVA także znana jako cytosolowa PLA₂α jest zależna od jonów wapnia i podlega złożonej regulacji. Enzymy z grupy VI są niezależne od jonów Ca⁺².

Ze względu na pełnioną funkcję fosfolipazy A₂ ssaków dzieli się na trzy grupy: wydzielnicze – sPLA₂ (secretory PLA₂), cytosolowe zależne od Ca⁺² – cPLA₂ (cytosolic Ca⁺² – dependent PLA₂) i cytosolowe niezależne od Ca⁺² – iPLA₂ (cytosolic Ca⁺² – independent PLA₂).

2.1. Fosfolipazy wydzielnicze – sPLA₂

Do fosfolipaz wydzielniczych – sPLA₂ zaliczamy grupy: IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XI, XII, XIII i XIV. Oznaczają się one stosunkowo małą masą cząsteczkową (13-16 kDa), dużą zawartością wiązań disiarczkowych oraz wymagają obecności jonów Ca⁺² (mM) do katalizy. Wykazują niewielką swoistość substratową wobec rodzaju nienasyconego kwasu tłuszczowego w pozycji *sn*-2 fosfolipidów.

Dwie główne grupy fosfolipaz wydzielniczych ssaków to: grupa I – trzustkowe sPLA₂ i grupa II – nietrzustkowe sPLA₂.

Fosfolipaza trzustkowa sPLA₂ jest syntetyzowana i wydzielana przez trzustkę do światła jelita w postaci nieaktywnego zymogenu, który następnie ulega aktywacji w wyniku ograniczonej proteolizy. Brak wymagań wobec substratu

(nieistotny dla enzymu kwas tłuszczowy w pozycji *sn-2* ani polarny podstawnik w pozycji *sn-3*) jest wielce przydatny do pełnionej funkcji, tj. trawienia lipidów pokarmowych. Trzustkowa sPLA₂ występuje również w śledzionie i płucach [17,19].

Enzymy z grupy II – nietrzustkowe fosfolipazy sPLA₂ są szeroko rozpowszechnione w tkankach ssaków, najwięcej ich występuje w płytkach krwi, a także w maziach stawowych. Nietrzustkowe fosfolipazy sPLA₂, mimo dużego podobieństwa w strukturze do fosfolipaz trzustkowych, mają unikalne cechy, takie jak: preferencja hydrolizy fosfolipidów zawierających etanoloaminę, powinowactwo do heparyny, a ponadto są syntetyzowane od razu jako dojrzałe białka, zdolne do katalizy, magazynowane w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych. Wykazują małą swoistość wobec kwasu tłuszczowego w pozycji *sn-2*, podobnie jak trzustkowe sPLA₂.

Nietrzustkowe fosfolipazy katalizują powstawanie lipidowych mediatorów różnych procesów patologicznych, głównie o podłożu zapalnym. Lipidowymi mediatorami są zarówno lizofosfolipidy i ich pochodne, jak również kwas arachidonowy i jego pochodne, głównie eikozanoidy.

Lizofosfolipidy indukują uszkodzenia tkanek np. owróżdzenie żołądka, aktywują leukocyty zwiększając ich przenikanie przez błonę śródłonka, inicjują proliferację komórek rakowych. Mogą także funkcjonować jako czynniki wzrostu, zwłaszcza kwas lizofosfatydowy. Lizofosfatydyloseryna aktywuje sekrecję histaminy w komórkach gruczołu sutkowego.

Eikozanoidy są zaangażowane w rozwoju prawie wszystkich procesów patologicznych, zwłaszcza w przebiegu procesów zapalnych [47]. Ochrona błon komórkowych przed „enzymami procesów zapalnych” w wyniku zastosowania inhibitorów tych enzymów może mieć znaczenie terapeutyczne w leczeniu zapaleń.

Fosfolipazom wydzielniczym – sPLA₂ przypisuje się wiele funkcji, zarówno fizjologicznych, jak i w różnych stanach patologicznych. sPLA₂ uczestniczą w trawieniu fosfolipidów pokarmowych, biorą udział w metabolizmie fosfolipidów komórkowych, w naprawie uszkodzeń peroksydacyjnych lipidów błonowych, stanowią barierę dla mikroorganizmów po zniszczeniu fosfolipidów błon bakteryjnych, przeciwdziałają agregacji płytek krwi, czy wreszcie uczestniczą w procesach zapalnych, związanych z miażdżycą tętnic, reumatoidalnym zapaleniem stawów czy ostrym zawałem mięśnia sercowego [25,36,37].

Ostatnio wykazano udział fosfolipaz wydzielniczych – sPLA₂ (z grup IIA, IID, IIF, XII) w naprawie uszkodzeń w układzie nerwowym np. podczas niedokrwienia czy uszkodzenia rdzenia kręgowego, a także w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona [8].

2.2. Fosfolipazy cytosolowe – cPLA₂

Do fosfolipaz cytosolowych cPLA₂ zależnych od jonów wapnia zaliczamy enzymy z grupy IV. Enzymy te, zwłaszcza postać PLA₂α są szeroko rozpowszechnione w tkankach ssaków, w tym w tkankach ludzkich (mózg, płuca,

nerki, serce, śledziona, trzustka, łożysko). Także wiele typów komórek ma aktywność cPLA₂, np. makrofagi, neutrofile, płytki krwi, keranocyty [22].

cPLA₂ mają stosunkowo dużą masę cząsteczkową i preferencyjnie hydrolizują fosfolipidy zawierające kwas arachidonowy w pozycji *sn-2*.

Najlepiej poznanym i rozpowszechnionym enzymem z tej grupy jest fosfolipaza IVA, inaczej znana jako cPLA₂α. Jest to białko umiejscowione w cytosolu, zbudowane z 749 aminokwasów, o masie cząsteczkowej około 85 kDa, zawierające dwie katalityczne domeny hydrolityczne A i B (zwane też α i β) oraz domenę C2 ważną dla zależnego od Ca²⁺ wiązania się enzymu z błonami [22].

Domena C2 ma swoiste właściwości wiązania dwóch jonów wapnia i błony fosfolipidowej jednocześnie i najprawdopodobniej jest odpowiedzialna za translokację enzymu z cytosolu do regionu błonowego w odpowiedzi na różne aktywatory zwiększające stężenie wewnątrzkomórkowego Ca²⁺. Innym mechanizmem aktywacji fosfolipazy IVA jest fosforylacja seryny w pozycji 505 łańcucha polipeptydowego. Fosforylacja Ser-505 pod wpływem np. kinaz białkowych aktywowanych różnymi mitogenami (MAPK) wywołuje 3-krotny wzrost aktywności enzymu. Fosfolipaza IVA odgrywa główną rolę w uwalnianiu kwasu arachidonowego, w odpowiedzi zapalnej organizmu występującej np. w mózgu po urazie [11,12,13] czy w początkowych stadiach porodu [43].

Kolejnym enzymem z grupy IV jest fosfolipaza IVB (cPLA₂β). Jest to białko występujące we wszystkich tkankach człowieka, a największą aktywność enzymu stwierdza się w trzustce, wątrobie, sercu i mózgu. Enzym IVB ma masę cząsteczkową 114 kDa, jest zbudowany z 1012 aminokwasów, zawiera domenę C2 i wykazuje 30% analogię z białkiem IVA.

Fosfolipaza IVC (cPLA₂γ) jest białkiem zawierającym 541 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 61 kDa. Wykazuje mniej niż 30% homologię z fosfolipazą IVA. Nie ma domeny C2, nie wymaga Ca²⁺ do aktywacji i dlatego regulacja aktywności tej izoformy enzymu jest odmienna niż cPLA₂α i cPLA₂β. Największą aktywność enzymu obserwuje się w sercu i w mięśniach szkieletowych.

Fosfolipazy cPLA₂ IVA i IVB wymagają jonów wapnia do translokacji w błonie (μM) a nie do aktywności katalitycznej. Ponieważ izoenzym PLA₂ IVC nie wymaga obecności Ca²⁺ oraz nie ma domeny C2 niezbędnej do wiązania jonów wapnia i lipidu, wykazuje pewne biochemiczne podobieństwo z fosfolipazami iPLA₂ i coraz częściej jest zaliczany do tej grupy enzymów.

Fosfolipazy cytosolowe cPLA₂ są uważane za główne enzymy uczestniczące w uwalnianiu kwasu arachidonowego pod wpływem różnych efektorów. Uwalnianie kwasu arachidonowego i w konsekwencji synteza eikozanoidów jest procesem podlegającym bardzo złożonej regulacji, przede wszystkim ze względu na potencjalne fizjologiczne efekty.

Aktywność tych enzymów podlega kompleksowej regulacji zarówno na poziomie transkrypcji mRNA enzymu, jak i na poziomie potranslacyjnych modyfikacji białka enzymatycznego.

cPLA₂ są szybko aktywowane w następstwie wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ i fosforylacji. Jony wapnia, inaczej niż w przypadku sPLA₂, nie są wymagane do aktywności katalitycznej cPLA₂, lecz są niezbędne do wiązania się cPLA₂ z błoną lub z fosfolipidowymi pęcherzykami, w których są obecne substraty enzymu. N-koniec łańcucha peptydowego fosfolipaz cytosolowych zawiera domenę wiążącą lipid zależną od Ca²⁺ – CaLB (calcium dependent lipid binding domain) pośredniczącą w wiązaniu z błoną. Zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia indukuje translokację cPLA₂ z frakcji rozpuszczalnej do błony jądrowej i przede wszystkim retikulum endoplazmatycznego, gdzie znajdują się substraty enzymu. W błonie jądrowej są umiejscowione również cyklooksigenaza 2 (COX-2) i 5-lipooksygenaza, co umożliwia tworzenie przez te enzymy funkcjonalnego kompleksu do syntezy eikozanoidów [7].

W odpowiedzi na niektóre cytokiny i mitogeny następuje długoterminowa regulacja cPLA₂ osiągana poprzez wzrost syntezy cPLA₂, co prowadzi do przedłużonego uwalniania kwasu arachidonowego i syntezy eikozanoidów. Ten wzrost syntezy cPLA₂ jest hamowany przez glikokortykosteroidy [15].

Różnorodne mechanizmy regulacji aktywności fosfolipaz cPLA₂ pozwalają na pełnienie różnorodnych funkcji w odpowiedzi komórki, takich jak: ostry stan zapalny, mitogeneza, różnicowanie czy cytotoxyczność.

Cytosolowa grupa IV fosfolipaz A₂ jest głównym efektem różnych szlaków metabolicznych inicjowanych przez cytokiny, czynniki wzrostu, mediatory procesu zapalnego, hormony czy neuroprzekazniki [15,30].

Fosfolipazy cytosolowe mogą być również indukowane przez czynniki fizyczne i wywołujące stres np. utlenienie, hiperglikemia lub światło UV.

We wzmocnienie aktywności cPLA₂ pod wpływem różnych efektorów uczestniczą białka G (wiążące nukleotydy guaninowe); następuje wzrost stężenia jonów wapnia, aktywacja kinazy białkowej C (PKC) lub kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (MAPK), a to prowadzi do zwiększonego uwalniania kwasu arachidonowego i wzrostu syntezy eikozanoidów. Zwiększenie aktywności cPLA₂ w makrofagach indukowane różnymi agonistami polega na fosforylacji seryny (Ser 505), obecnej w centrum aktywnym enzymu pod wpływem MAPK. Stan ten może być odwrócony działaniem odpowiedniej fosfatazy [17,19].

Niedawno zaobserwowano również wpływ cytosolowego 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PtdInsP₂) na regulację aktywności cPLA₂. Stymuluje on silnie wiązanie cPLA₂ z błoną, a także zwiększa aktywność enzymu względem fosfolipidów. Odbywa się to bez wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego Ca²⁺, co wskazuje na kolejny, odmienny mechanizm regulacji aktywności cPLA₂ [9].

Wśród kwasów tłuszczowych uwalnianych w wyniku działania PLA₂ warto podkreślić szczególne, biologiczne znaczenie kwasu arachidonowego jako prekursora prostanooidów czy leukotrienów. Wykazano, że wolny kwas arachidonowy może stymulować apoptozę poprzez aktywację

enzymu – sfingomielinazy [47]. Sugeruje się również udział utlenionych metabolitów powstających z kwasu arachidonowego w wyniku działania lipooksygenazy w indukcji apoptozy.

Mimo że mechanizm udziału fosfolipaz A₂ w procesie apoptozy pozostaje niewyjaśniony, to w komórkach podlegających apoptozie, jednocześnie z obniżoną żywotnością, aktywacją kaspaz i fragmentacją DNA, obserwuje się wzrost uwalniania kwasu arachidonowego. Odbywa się to w wyniku aktywacji cytosolowej PLA₂ i/lub niezależnej od jonów wapnia – iPLA₂, w zależności od czynnika wywołującego apoptozę [42].

Kiedy czynnikiem wywołującym śmierć komórki jest czynnik martwicy nowotworu – TNF-α (tumor necrosis factor alfa), kwas arachidonowy uwalniany jest w wyniku działania cPLA₂ [16], a kiedy apoptoza jest indukowana antygenem Fas, to obserwuje się wzrost aktywności iPLA₂ [5].

Oprócz zaangażowania w procesie zaprogramowanej śmierci komórki fosfolipaz – cPLA₂ i iPLA₂, ostatnio pojawiają się prace sugerujące udział w tym procesie również sekrecyjnych PLA₂ [48].

Fosfolipazy cPLA₂ odgrywają bardzo istotną rolę podczas naprawy uszkodzonych komórek w ośrodkowym układzie nerwowym. W hodowli ludzkich komórek astrocytoma 1231N1 zaobserwowano wzrost aktywności cytosolowych fosfolipaz A₂: IVA, IVB, IVC, a także iPLA₂ – VIA w obecności interleukiny 1β i lipopolisacharydu, które są sygnałami uszkodzenia komórek nerwowych czy też rozpoczętego procesu zapalnego w mózgu [8].

2.3. Fosfolipazy cytosolowe niezależne od Ca²⁺ – iPLA₂

Do fosfolipaz cytosolowych niezależnych od Ca²⁺ (iPLA₂) zaliczamy enzymy należące do grupy VI (obecnie grupa VIA) szeroko rozpowszechnione, występujące u różnych gatunków zwierząt i w różnych komórkach (np. ludzkie limfocyty B, komórki jajnika chomika chińskiego CHO, komórki mózgu, trzustki szczura, komórki nerki królika). Obecnie, oprócz enzymów grupy VIA do fosfolipaz iPLA₂ zaliczamy grupę IVC (wcześniej była klasyfikowana jako cPLA₂-γ), oraz grupy VII i VIII [40].

Enzymy z grupy VII i VIII są acetylohydrolazami płytkowego czynnika aktywującego – PAF. Wykazują one preferencje substratowe wobec PAF i fosfolipidów zawierających krótko- lub średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe w pozycji *sn*-2.

Fosfolipazy VIA w organizmie ludzkim występują w wielu izoformach powstałych w wyniku alternatywnego splicingu pierwotnego transkrypty genu. Najlepiej poznano grupę VIA-1 (85 kDa) i VIA-2 (88 kDa). Kolejno, zidentyfikowano trzy splicingowe warianty: VIA-3, VIA-ankyrin1, VIA-ankyrin 2, ale nie wiadomo czy są aktywne enzymatycznie.

Grupa VIA fosfolipaz odgrywa główną rolę w przebudowie i homeostazie fosfolipidów przez usuwanie wolnego kwasu tłuszczowego i tworzenie 2-lizofosfolipidowych ak-

ceptorów mogących być substratami acylotransferaz w reakcjach reakcji [45].

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej danych o zaangażowaniu fosfolipaz VIA w wielu innych procesach biologicznych, przede wszystkim w powstawaniu wtórnych przekazywaczy. Wykazano ich udział w uwalnianiu kwasu arachidonowego i prostaglandyn w komórkach mezangialnych kłębków nerkowych szczura stymulowanych interleukiną 1β lub dibutyrylo- cAMP [1], w syntezie leukotrienów w ludzkich granulocytach [29], a także w rozprzestrzenianiu płytek krwi po unieruchomieniu fibrynogenu [45].

Ponadto, poza ważną rolą w przebudowie fosfolipidów i przekazywaniu informacji sugeruje się udział iPLA₂ (oprócz sPLA₂) w uszkodzeniu fosfolipidowej błony komórek przez uwalnianie kwasu arachidonowego i innych kwasów tłuszczowych do środowiska pozakomórkowego w czasie procesu apoptozy ludzkich komórek białaczkowych U937, wywołanego przez różne czynniki np. przeciwciała anti-Fas [5] czy stres oksydacyjny [4,38].

Niedawno w organizmie ludzkim zidentyfikowano kolejny enzym cytosolowy, wykazujący aktywność fosfolipazy A₂ niezależny od Ca²⁺, inny niż poznane i scharakteryzowane wcześniej fosfolipazy iPLA₂: IVC, VIA, VII i VIII. Enzym, przypisany do grupy VIB, wykazuje duże podobieństwo w budowie i właściwościach do enzymu z grupy VIA. Aktywność enzymu wykazano we wszystkich używanych w doświadczeniach tkankach – sercu, mózgu, łożysku, płucach, wątrobie, mięśniach szkieletowych, nerce i trzustce. Enzymatyczna i fizjologiczna funkcja enzymu VIB pozostaje nieznana [32].

PODSUMOWANIE

W ostatniej dekadzie nastąpił znaczący postęp w oczyszczaniu, sekwencjonowaniu i charakterystyce enzymów mających aktywność fosfolipaz z grupy A (PLA). Enzymy te, hydrolizując wiązania estrowe w pozycji *sn*-1 lub *sn*-2 glicerolofosfolipidów, są odpowiedzialne za uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych i lizofosfolipidów. W komórkach ssaków występują liczne izoformy fosfolipaz A o nie do końca wyjaśnionej lokalizacji subkomórkowej i wyjaśnionych mechanizmach regulujących ich aktywność oraz nie do końca zdefiniowanej funkcji fizjologicznej i patologicznej. Ze względu na lokalizację, budowę i funkcję fosfolipaz A podzielono je na wydzielnicze i wewnątrzkomórkowe.

Do fosfolipaz A₁ wydzielniczych zaliczamy enzymy swoiste wobec fosfatydylseryny, kwasu fosfatydowego, a także lipazę endotelialną. Enzymy te w zależności od swoistości substratowej i lokalizacji tkankowej biorą udział

w homeostazie energetycznej ustroju, w rozwoju komórek nerwowych, aktywacji płytek krwi i komórek sutkowych, hamowaniu proliferacji limfocytów, w procesie apoptozy, a także w procesach zapalnych czy chorobach naczyń wieńcowych.

Dotychczas zidentyfikowano trzy białka, które zaliczono do wewnątrzkomórkowych fosfolipaz A₁ preferencyjnie hydrolizujących kwas fosfatydowy. Przypuszcza się, że enzymy te są zaangażowane w tworzeniu retikulum endoplazmatycznego, aparatu Golgiego, w procesie spermatogenezy oraz w interakcji neuronalnej. Do enzymów wewnątrzkomórkowych należy również lizosomalna, kwaśna fosfolipaza A₁. Enzym ten uczestniczy w degradacji fosfolipidów błon i lipoprotein dostarczanych do lizosomów, a także może odgrywać ważną rolę w fosfolipidozach.

Wydzielnicze fosfolipazy A₂ (sPLA₂) nie wykazują swoistości wobec kwasu tłuszczowego, ale wymagają milimolarnego stężenia jonów wapnia do katalizy. Są obecne w jadach węży i owadów, w soku trzustkowym, a także są wydzielane przez inne typy komórek i tkanek w przebiegu procesów patologicznych, zwłaszcza o podłożu zapalnym (posocznica, reumatoidalne zapalenie stawów, ostre zapalenie trzustki). Uczestniczą również w naprawie uszkodzeń w układzie nerwowym.

Wewnątrzkomórkowe fosfolipazy A₂ dzielimy na dwie grupy – cPLA₂ i iPLA₂. Fosfolipazy cPLA₂ to enzymy o dużej swoistości do kwasu arachidonowego, występujące w większości komórek i tkanek. Ich aktywność regulowana jest m.in. mikromolarnymi stężeniami Ca²⁺, modyfikacją kowalencyjną oraz czynnikami wywołującymi stres. Odgrywają ważną rolę w wytwarzaniu prozapalnych mediatorów lipidowych, takich jak prostaglandyny i leukotrieny – metabolitów uwalnianego kwasu arachidonowego. Uczestniczą w uwalnianiu neuroprzekazywaczy, w procesie apoptozy, w regulacji płodności, odpowiedzi alergicznej czy arteriosklerozie.

Fosfolipazy iPLA₂ (najmniej poznane) są niezależne od stężenia jonów wapnia w komórce, nie wykazują swoistości wobec kwasu arachidonowego i nie wymagają modyfikacji kowalencyjnej. Uważane są za „housekeeping enzymy”, tzn. enzymy niezbędne do utrzymania prawidłowych fosfolipidowych składników błon cytoplazmatycznych, ale także przypisuje się im rolę w procesach, takich jak fagocytoza, niedokrwienie mięśnia sercowego czy sekrecja insuliny indukowana glukozą.

Dalsze badania wyjaśniające właściwości molekularne fosfolipaz A, ich funkcję i udział w procesach zapalnych pozwolą na poszukiwanie inhibitorów tych enzymów w celu farmakologicznej interwencji w różnych schorzeniach.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Akiba S., Hayama M., Sato T.: Inhibition of Ca²⁺ – independent phospholipase A₂ by bromoenol lactone attenuates prostaglandin generation induced by interleukin-1- beta and dibutyryl cAMP in rat mesangial cells. FEBS Lett., 1998; 437: 225–228
- [2] Aoki J.: Mechanisms of lysophosphatidic acid production. Semin. Cell Dev. Biol., 2004; 15: 477–489

- [3] Aoki J., Nagai Y., Hosono H., Inoue K., Arai H.: Structure and function of phosphatidylserine – specific phospholipase A₁. Biochim. Biophys. Acta, 2002; 1582: 26–32

- [4] Asai K., Hirabayashi T., Houjou T., Uozumi N., Taguchi R., Shimizu T.: Human group IVC phospholipase A₂ (cPLA₂γ). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. J. Biol. Chem., 2003; 278: 8809–8814

- [5] Atsumi G., Tajima M., Hadano A., Nakatani Y., Murakami M., Kudo I.: Fas- induced arachidonic acid release is mediated by Ca²⁺ – independent phospholipase A₂, but not cytosolic phospholipase A₂ which undergoes proteolytic inactivation. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 13870–13877
- [6] Azumi H., Hirata K., Ishida T., Kojima Y., Rikitake Y., Takeuchi S., Inoue N., Kawashima S., Hayashi Y., Itoh H., Quertermous T., Yokoyama M.: Immunohistochemical localization of endothelial cell-derived lipase in atherosclerotic human coronary arteries. *Cardiovasc. Res.*, 2003; 58: 647–654
- [7] Balboa M.A., Balsinde J.: Involvement of calcium- independent phospholipase A₂ in hydrogen peroxide – induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 40384–40389
- [8] Balboa M.A., Varela-Nieto I., Killermann Lucas K., Dennis E.A.: Expression and function of phospholipase A₂ in brain. *FEBS Lett.*, 2002; 531: 12–17
- [9] Balsinde J., Balboa M.A., Li W.H., Llopis J., Dennis E.A.: Cellular regulation of cytosolic group IV phospholipase A₂ by phosphatidylinositol biphosphate levels. *J. Immunol.*, 2000; 164: 5398–5402
- [10] Balsinde J., Winstead M.V., Dennis E.A.: Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.*, 2002; 531: 2–6
- [11] Bonventre J.V.: Roles of phospholipases A₂ in brain and tissue injury associated with ischemia and excitotoxicity. *J. Lipid Mediat.*, 1997; 16: 199–208
- [12] Bonventre J.V.: The 85-kDa cytosolic phospholipase A₂ knockout mouse. A new tool for physiology and cell biology. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999; 10: 404–412
- [13] Bonventre J.V., Huang Z., Taheri M.R., O'Leary E., Li E., Moskowitz M.A., Sapirstein A.: Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A₂. *Nature*, 1997; 390: 622–625
- [14] Broedl U.C., Jin W., Rader D.J.: Endothelial lipase: A modulator of lipoprotein metabolism upregulated by inflammation. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2004; 14: 202–206
- [15] Clark J.D., Schievella A.R., Nalefski E.A., Lin L.L.: Cytosolic phospholipase A₂. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.*, 1995; 12: 83–117
- [16] Draper D.W., Harris V.G., Culver C.A., Laster S.M.: Calcium and its role in the nuclear translocation and activation of cytosolic phospholipase A₂ in cells rendered sensitive to TNF- induced apoptosis by cycloheximide. *J. Immunol.*, 2004; 172: 2416–2423
- [17] Gijon M.A., Leslie C.H.C.: Phospholipases A₂. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 1997; 8: 297–303
- [18] Han M.H., Han D.K., Aebersold R.H., Glomset J.A.: Effects of protein kinase CK2, extracellular signal-regulated kinase 2 and protein phosphatase 2A on a phosphatidic acid- preferring phospholipase A₁. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 27698–27708
- [19] Han S.K., Yoon E.T., Scott D.L., Sigler P.B., Cho W.: Structural aspects of interfacial absorption. A crystallographic and site-directed mutagenesis study of the phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 3573–3582
- [20] Higgs H.N., Glomset J.A.: Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A₁ from bovine brain and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 9574–9578
- [21] Higgs H.N., Han M.H., Johnson G.E., Glomset J.A.: Cloning of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A₁ from bovine testis. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 5468–5477
- [22] Hirabayashi T., Shimizu T.: Localization and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1488: 124–138
- [23] Hiramatsu T., Sonoda H., Takanezawa Y., Morikawa R., Ishida M., Kasahara K., Sanai Y., Taguchi R., Aoki J., Arai H.: Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A₂s, mPA-PLA₁α and mPA-PLA₁β. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 49438–49447
- [24] Hirata K., Dichek H.L., Cioffi J.A., Choi S.Y., Leeper N.J., Quintana L., Cooper A.D., Quertermous T.: Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 14170–14175
- [25] Hurt-Camejo E., Camejo G.: Potential involvement of type II phospholipase A₂ in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1997; 132: 1–8
- [26] Jansen S. M., Groener J. E., Poorthuis B. J.: Lysosomal phospholipase activity is decreased in mucopolipidosis II I III fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1436: 363–369
- [27] Jaye M., Lynch K.J., Krawiec J., Marchadier D., Maugeais C., Doan K., South V., Amin D., Perrone M., Rader D.J.: A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat. Genet.*, 1999; 21: 424–428
- [28] Jin W., Broedl U.C., Monajemi H., Glick J.M., Rader D.J.: Lipase H, a new member of the triglyceride lipase family synthesized by the intestine. *Genomics*, 2002; 80: 268–273
- [29] Larsson Forsell K., Runarsson G., Ibrahim M., Bjorkholm M., Claesson H.E.: On the expression of cytosolic calcium- independent phospholipase A₂ (88 kDa) in immature and mature myeloid cells and its role in leukotriene synthesis in human granulocytes. *FEBS Lett.*, 1998; 434: 295–299
- [30] Leslie C.C.: Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 16709–16712
- [31] Loffler B.-M., Kunze H.: Fractionation, biochemical characterization and lysosomal phospholipases of human liver. *FEBS Lett.*, 1987; 216: 51–56
- [32] Mancuso D.J., Jenkins C.M., Gross R.W.: The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane – associated calcium- independent phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 9937–9945
- [33] Mizoguchi T., Nakajima K., Hatsuzawa K., Nagahama M., Hauri H.P., Tagaya M., Tani K.: Determination of functional regions of p125, a novel mammalian Sec23p-interacting protein. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 279: 144–149
- [34] Nagai Y., Aoki J., Sato T., Amano K., Matsuda Y., Arai H., Inoue K.: An alternative splicing form of phosphatidylserine-specific phospholipase A₁ that exhibits lysophosphatidylserine-specific lysophospholipase activity in humans. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 11053–11059
- [35] Nakajima K., Sonoda H., Mizoguchi T., Aoki J., Arai H., Nagahama M., Tagaya M., Tani K.: A novel phospholipase A₁ with sequence homology to a mammalian Sec23p-interacting protein, p125. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 11329–11335
- [36] Niessen H.W., Krijnen P.A., Visser C.A., Meijer C.J., Hack C.E.: Type II secretory phospholipase A₂ in cardiovascular disease: a mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes? *Cardiovasc. Res.*, 2003; 60: 68–77
- [37] Ohsawa K., Mori A., Horie S., Saito T., Okuma Y., Nomura Y., Murayama T.: Arachidonic acid release and prostaglandin F_{2a} formation induced by phenylarsine oxide in PC12 cells: possible involvement of secretory phospholipase A₂ activity. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 64: 117–124
- [38] Perez R., Melero R., Balboa M.A., Balsinde J.: Role of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 40385–40391
- [39] Reasor M.J., Kacew S.: Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences? *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 2001; 226: 825–830
- [40] Six D.A., Dennis E.A.: The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1488: 1–19
- [41] Sonoda H., Aoki J., Hiramatsu T., Ishida M., Bandoh K., Nagai Y., Taguchi R., Inoue K., Arai H.: A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A₁ that produces lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 34254–34263
- [42] Taketo M.M., Sonoshita M.: Phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1585: 72–76
- [43] Uozumi N., Kume K., Nagase T., Nakatani N., Ishii S., Tashiro F., Komagata Y., Maki K., Ikuta K., Ouchi Y., Miyazaki J., Shimizu T.: Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition. *Nature*, 1997; 390: 618–622
- [44] Van Bambeke F., Montenez J.-P., Piret J., Tulkens P.M., Courtoy P.J., Mingeot-Leclercq M.-P.: Interaction of the macrolide azithromycin with phospholipids. I. Inhibition of lysosomal phospholipase A₁ activity. *Eur. J. Pharmacol.*, 1996; 314: 203–214
- [45] Winstead M.V., Balsinde J., Dennis E.A.: Calcium – independent phospholipase A₂: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1488: 28–39
- [46] Xia Z., Ying G., Hansson A.L., Karlsson H., Xie Y., Bergstrand A., DePierre J.W., Nassberger L.: Antidepressant- induced lipidosis with special reference to tricyclic compounds. *Prog. Neurobiol.*, 2000; 60: 501–512
- [47] Yedgar S., Lichtenberg D., Schnitzer E.: Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1488: 182–187
- [48] Zhao S., Du X.Y., Chai M.Q., Chen J.S., Zhou Y.C., Song J.G.: Secretory phospholipase A₂ induces apoptosis via a mechanism involving ceramide generation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1581: 75–88