

Sekretorne fosfolipaze A₂ in njihova (pato)fiziološka vloga

Secretory phospholipase A₂ enzymes and their (patho)physiological role

Borut Jerman, Jože Pungerčar

Povzetek: Fosfolipaze A₂ so encimi, ki katalizirajo cepitev estrske vezi na mestu *sn*-2 v glicerofosfolipidih, pri čemer se sprostijo proste maščobne kisline in lizofosfolipidi. Pri sesalcih je bilo doslej prepoznanih 29 fosfolipaz A₂, ki delujejo znotraj- in/ali zunajcelično. Večino slednjih predstavljajo sekretorne fosfolipaze A₂, ki so kot encimi ali pa ligandi za različne receptorje vpletene v številne fiziološke in patološke procese. To je spodbudilo farmacevtska podjetja k intenzivnemu razvoju specifičnih inhibitorjev za lajšanje, preprečevanje in zdravljenje obolenj, povezanih s sekretornimi fosfolipazami A₂, pri živalih in človeku.

Ključne besede: encim, fosfolipaza A₂, sekretorna fosfolipaza A₂, patološki procesi, inhibitorji sPLA₂

Abstract: Phospholipases A₂ are enzymes that catalyze the hydrolysis of the *sn*-2 ester bond of phospholipids to form free fatty acids and lysophospholipids. In mammals, 29 enzymes with phospholipase A₂ activity, which act intra- and/or extracellularly, have been identified. Most of the latter are secretory phospholipases A₂. By their enzymatic activity or by binding to receptors, as ligands, sPLA₂s play an important role in a variety of physiological and pathological processes. This has attracted the interest of pharmaceutical companies in developing sPLA₂ inhibitors which could be helpful in sPLA₂ related diseases in animals and humans.

Keywords: enzyme, phospholipase A₂, secretory phospholipase A₂, pathological processes, sPLA₂ inhibitors

1 Uvod

Fosfolipaze A₂ (PLA₂) so proteini, ki katalizirajo hidrolizo estrske vezi na mestu dva (*sn*-2) v molekuli glicerofosfolipida, pri čemer se sprostita prosta maščobna kislina in lizofosfolipid. Pri sesalcih je bilo doslej odkritih 29 encimov PLA₂, ki so razdeljeni v pet različnih skupin (1). 1) V skupino **sekretornih fosfolipaz A₂** (sPLA₂) uvrščamo vsaj 11 encimov, ki so večinoma majhne molekulske mase in potrebujejo Ca²⁺-ion kot kofaktor (preglednica 1). Vključeni so v različne (pato)fiziološke procese, kot so npr. metabolizem fosfolipidov, produkcija eikozanoidov, vnetje in primarni obrambni odziv gostitelja. 2) Skupina **citosolnih fosfolipaz A₂** (cPLA₂) obsega 6 encimov, med katerimi je najboljše raziskana vloga encima cPLA₂, ki je ključen pri sproščanju arahidonske kisline (AA). Aktivacija cPLA₂ je tesno povezana s prisotnostjo Ca²⁺-ionov in fosforilacijo. 3) V skupini **od Ca²⁺-neodvisnih fosfolipaz A₂** (iPLA₂), ki so hkrati tudi transacilaze, je poznanih 7 encimov, ki imajo pomembno vlogo pri preurejanju membranskih fosfolipidov. 4) V skupini **PAF-acetilhidrolaz** (PAF-AH) so poznani 4 encimi, katerih edinstveni lastnosti sta substratna specifičnost za trombocitni aktivator (PAF; "platelet-activating factor") in oksidirane fosfolipide, ki imajo oksidirane maščobne kisline dolžine do 9 ogljikovih atomov. PAF-AH za razliko od ostalih PLA₂ ne delujejo učinkovito na površini lipidnih membran, temveč boljše hidrolizirajo monomerne substrate v raztopini. Cepitev PAF in oksidiranih fosfolipidov s PAF-AH

lahko vodi do zaključka vnetja ali ateroskleroze. 5) V skupino **lizosomskih fosfolipaz A₂** je zaenkrat uvrščena le ena fosfolipaza, ki ima od Ca²⁺-neodvisno fosfolipazno aktivnost in transacilazno aktivnost, podobno kot iPLA₂. Število znanih fosfolipaz A₂ morda še ni dokončno. V prispevku bodo predstavljena le najpomembnejša osnovna spoznanja o sPLA₂, njihovi vlogi v fizioloških in patoloških procesih ter možnostih uporabe inhibitorjev sPLA₂ za preprečevanje (pato)fizioloških procesov, ki jih izzovejo sPLA₂.

2 Struktura in encimsko delovanje sPLA₂

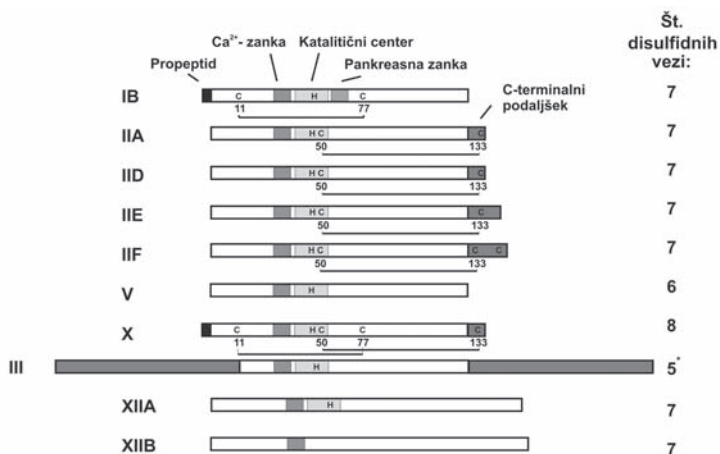
Na osnovi strukturnih značilnosti razdelimo sPLA₂ v tri večje skupine: I/II/V/X, III in XII (slika 1).

sPLA₂ skupine I/II/V/X so strukturno zelo sorodni encimi, velikosti 14–16 kDa, z visoko ohranjeno Ca²⁺-vezavno zanko in katalitično regijo. Imajo 6 evolucijsko ohranjenih disulfidnih vezi in po dve disulfidni vezi na mestih, značilnih za posamezno (pod)skupino encimov. Omenjene disulfidne vezi pomembno prispevajo k relativno visoki stabilnosti teh encimov. Za encimsko katalizo je nujno potreben Ca²⁺ (kofaktor) v mikromolarni koncentraciji, učinkovita hidroliza substrata pa poteka v območju pH 7–9. Ca²⁺-ion je preko omenjene kalcijeve vezavne zanke

Preglednica 1: Značilnosti človeških sPLA₂. ^aPodobne sPLA₂ (skupina IA) so zasledili v strupih kač iz družine stopenih gožev (*Elapidae*). ^bPodobne (skupini IIA in IIB) so v strupih kač iz družine gadov (*Viperidae*). ^cV človeškem genomu je prisoten le psevdogen, zato so v oklepajih prikazane vrednosti za homologno mišjo sPLA₂-IIC. ^dsPLA₂, podobno osrednji domeni skupine III, so najprej odkrili v čebeljem strupu. ^eHistidinski ostanek v encimskem aktivnem mestu zamenjan z levcinskim, zato je ta sPLA₂ domnevno katalitično neaktivna. N.d., nedoločeno.

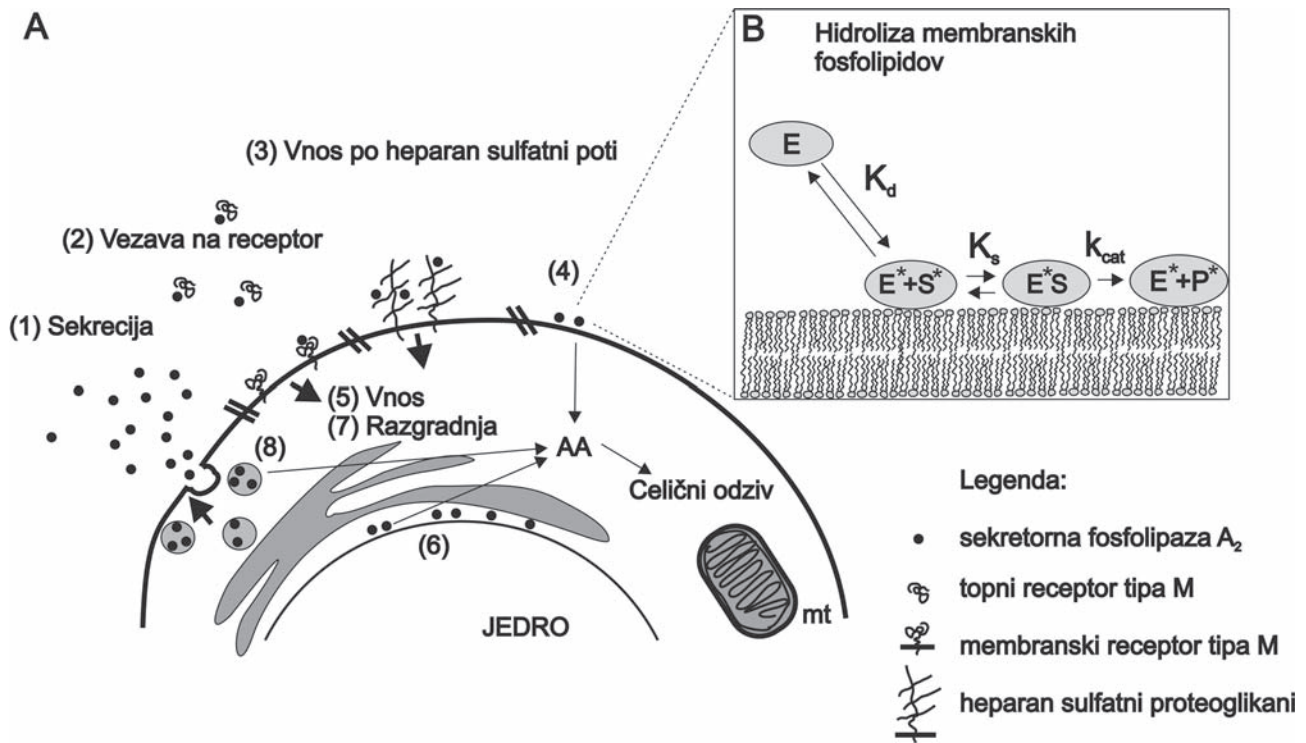
Table 1: Characteristics of human sPLA₂s. ^aSimilar sPLA₂s (group IA) occur in snake venoms of the family *Elapidae*. ^bSimilar sPLA₂s (groups IIA and IIB) occur in snake venoms of the family *Viperidae*. ^cSince only a pseudogene is present in the human genome, the values for a homologous mouse sPLA₂-IIC are shown. ^dA similar sPLA₂ has been previously identified in bee venom. ^eThe active site histidine residue is substituted with a leucine residue, hence, this sPLA₂ is presumably catalytically inactive. N.d., not determined.

Skupina sPLA ₂	Število aminokislin	Velikost (kDa)	Potreba po Ca ²⁺	Katalitično mesto	Kromosomska lokacija	Mesto odkritja oz. nahajanja; opomba
IB ^a	126	14	μM	His/Asp	12q23–24.1	trebušna slinavka
IIA ^b	131	14	μM	His/Asp	1p35	sinovialna tekočina, črevesje, srce, placenta
IIC ^c	(130)	(15)	(μM)	(His/Asp)	1p36.12	protein se ne izraža; prisoten npr. pri miški v testisih (v mejnih celicah)
IID	125	14	μM	His/Asp	1p36.12	vranica, priželjc, trebušna slinavka
IIE	123	14	μM	His/Asp	1p36.13	možgani, srce, pljuča, placenta
IIF	148	16	μM	His/Asp	1p35	placenta, testisi, priželjc
V	118	14	μM	His/Asp	1p36–34	srce, placenta, makrofagi
X	123	14	μM	His/Asp	16p13.1–12	trebušna slinavka, črevesje, levkociti, pljuča
III ^d	490	55	μM	His/Asp	22q11.2–13.2	ledvice, trebušna slinavka, jetra, pljuča
XIIA	167	19	μM	His/Glu (?)	4q25	srce, skeletne mišice, ledvice, trebušna slinavka
XIIB	176	20	N.d.	Leu/Asp ^e	10q22.1	jetra, ledvice, srce; encimsko neaktivna



Slika 1: Shematski prikaz strukture človeških sPLA₂. Na sliki so prikazane nekatere osnovne značilnosti strukture različnih skupin sPLA₂. Označene so le disulfidne vezi, značilne za posamezno skupino. sPLA₂-IB ima edinstveno, t. i. pankreasno zanko dolžine 5 aminokislinskih ostankov. Nekatere druge sPLA₂ imajo kratek C-terminalni podaljšek. Slika je delno povzeta po ref. 13. * Število disulfidnih vezi v sPLA₂-domeni; H, His; C, Cys.

Figure 1: Schematic representation of the structures of human sPLA₂s. Certain basic characteristics of different groups of sPLA₂s are shown. In the figure, only disulphide bonds typical for a particular group are presented. Members of group sPLA₂-IB have a unique 'pancreatic loop' of 5 residues. Some other sPLA₂s possess a short C-terminal extension. The figure is partly adapted from Ref. 13. * Number of disulphide bonds in the sPLA₂-domain; H, His; C, Cys.



Slika 2: Prikaz možnih načinov delovanja sPLA₂ na celičnem nivoju. A) sPLA₂ se po sintezi izločijo iz celic (1). Po sekreciji lahko pride do vezave na topni ali membranski receptor tipa M (2), ali na heparan sulfatne proteoglikane (3) ali na plazemsko membrano (4). Do vnosa sPLA₂ v celico (5) pride na vsaj dva načina: preko vezave na membranski receptor tipa M (2) ali preko vezave na heparan sulfatne proteoglikane (3). Po vnosu lahko sPLA₂ delujejo na znotrajceličnih membranah (6) ali pa se razgradijo (7). Do sproščanja AA tako lahko pride med samo sekrecijo (8) ali po vezavi na zunanjo (4) ali na notranje membrane (6); mesto, kjer pride do sproščanja AA, pa je odvisno od lastnosti posamezne sPLA₂. Izražanje določene skupine sPLA₂ je vrstno, genotipsko in tkivno-specifično ter odvisno od (patofiziološkega stanja organizma. AA, arahidonska kislina; mt, mitohondrij. B) Predpostavljene mehanizem katalitične reakcije sPLA₂ na površini membrane. Vezava sPLA₂-encima (E) na membrano agregiranih fosfolipidov (E → E*) je odvisna od afinitete vezave (K_d) na membrano in je ločena od afinitete vezave (K_s) fosfolipidne molekule v aktivnem mestu encima (E* + S ↔ E*S). S, fosfolipidni substrat; P, produkt; k_{cat}, pretvorbena število.

Figure 2: Possible cellular actions of sPLA₂s. A) sPLA₂s are synthesized and secreted from the cell (1). Following secretion, sPLA₂s can bind either to the soluble or membrane-bound M-type sPLA₂ receptor (2), or to heparan sulphate proteoglycans (3) or to the plasma membrane (4). They are internalized into the cell (5) through at least two possible pathways: by binding to the membrane-bound M-type sPLA₂ receptor (2) or to heparan sulphate proteoglycans (3). When imported, sPLA₂s act on the inner cellular membranes (6) or are degraded (7). AA can be released during secretion of sPLA₂s (8), or after binding to the outer (4) or inner (6) cellular membranes. The cellular location of AA release is in a large part dependent on the enzymatic properties of a particular sPLA₂. The expression of each sPLA₂ group member is species-, genotype- and tissue-specific, and depends on the (patho)physiological state of an organism. AA, arachidonic acid; mt, mitochondrion. B) Presumed mechanism of the catalytic reaction of an sPLA₂ enzyme at the membrane surface. Binding of the sPLA₂ enzyme (E) to the membrane of associated phospholipids (E → E*) is dependent on the membrane binding affinity (K_d), and is different from the binding affinity of the phospholipid molecule (K_s) for the enzyme active site (E* + S ↔ E*S). S, phospholipid substrate; P, product; k_{cat}, the turnover number.

in Asp49 koordinativno vezan v bližini aktivnega mesta encima ter kot kofaktor sodeluje tako pri vezavi kot pri katalizi substrata (2). Aminokislinska ostanka His48 in Asp99 tvorita t. i. katalitično diado oz. skupaj z molekulo vode "funkcionalno triado". Kristalni strukturi sPLA₂-IB in -IIA sta odkrili, da aktivno mesto sPLA₂-encimov leži na dnu hidrofobnega kanala na N-koncu molekule (3, 4). Hidrofobni kanal veže posamezno molekulo fosfolipida, tj. substrata, neposredno po vezavi encima na fosfolipidno membrano (slika 2B). sPLA₂ delujejo na stični površini med lipidno plastjo in vodnim medijem. Zanje je značilno, da imajo večjo afiniteto do agregiranih fosfolipidnih substratov, kot so miceli, vezikli in celične membrane, ki jih hidrolizirajo veliko hitreje kot monomerne fosfolipide. Večina sesalskih sPLA₂ se bolje veže na negativno nabite (anionske) lipidne površine, sestavljene iz npr. fosfatidilglicerola ali fosfatidilserina, kot na električno nevtralne, npr. fosfatidilholinske površine, medtem ko imata sPLA₂ iz skupin V in X relativno visoko afiniteto tudi do električno nevtralnih fosfolipidnih površin (5, 6). Le sPLA₂-IB in -X se izločata iz celice v encimsko manj aktivni obliki kot proencima. N-terminalni propeptid, dolžine 7 oz. 11 aminokisljin, se odstrani s proteolitično cepitvijo, pri čemer se tvori polno aktivni zreli encim (7, 8). sPLA₂-X je za razliko od ostalih N-glikoziliranih, kar pa ni pogoj za encimsko aktivnost (8).

sPLA₂-III in sPLA₂-XII sta sorodni sPLA₂-encimom iz skupine I/II/V/X predvsem v strukturi kalcijeve vezavne zanke in katalitične regije, drugače pa se od njih jasno razlikujeta. sPLA₂-III je največji protein (55 kDa) znotraj družine sPLA₂, sestavljen iz treh domen, ki kaže večjo podobnost s sPLA₂, izolirano iz čebeljega strupa, kot pa s sPLA₂ iz skupine I/II/V/X (9). sPLA₂-XIIA je encim velikosti 19 kDa, ki ima – podobno kot predstavniki skupine I/II/V/X – His v aktivnem mestu, medtem ko je na mestu, kjer je običajno Asp99, prisoten ostanek Glu, kar po naše nakazuje na možno katalitično diado His/Glu. Primerjava ohranjenega segmenta kalcijeve vezavne zanke pri sPLA₂-XIIA z drugimi sPLA₂ je pokazala, da je drugi, običajno ohranjeni, ostanek Gly v kalcijevi zanki zamenjan s Pro. Od ostalih sPLA₂ se sPLA₂-XIIA dodatno razlikuje po tem, da so nekateri cisteinski ostanki, ki tvorijo disulfidne vezi, na drugih mestih (10, 11). V letu 2003 odkrit soroden protein, sPLA₂-XIIB, pa ima zamenjan His v aktivnem mestu z Leu, kar je verjetno glavni razlog za njegovo encimsko neaktivnost (12).

3 Fiziološka vloga sPLA₂

Z *in vitro* in *in vivo* raziskavami so pokazali na vključenost sPLA₂ v mnoge fiziološke in patološke procese. sPLA₂ preko encimske aktivnosti sodelujejo pri sproščanju AA v celicah (slika 2A). Sproščena AA je substrat za konstitutivno izraženo ciklooksigenazo 1 (COX-1) v takojšnjem odzivu ali za inducibilno izraženo ciklooksigenazo 2 (COX-2) v zakasnelem odzivu organizma ali za lipoksigenazo, kar vodi v sintezo eikozanoidov pri vnetnih procesih. Drugi produkt encimske reakcije sPLA₂, lizofosfolipidi, kot npr. lizofosfatidna kislina, lizofosfatidilholin in njihovi metaboliti (npr. PAF), ki so močni bioaktivni mediatorji, delujejo preko ustreznih z G-proteini sklopljenih receptorjev. Predpostavljajo, da sPLA₂, ki sproščajo AA, prav tako regulirajo nastajanje mediatorjev, ki nastanejo iz lizofosfolipidov (8, 13). Tako lahko aktivirajo, preko produktov hidrolize, različne tarčne proteine, kot so: MAP-kinaza, PI3K, Akt, cPLA₂, COX-2 in sfingomielinaza (14–19). Na celični ravni sodelujejo sPLA₂ skupin IB, IIA, V in X pri proliferaciji,

kontrakciji, migraciji, apoptozi celic ter pri sproščanju peptidov, hormonov in citokinov (20–25). Delujejo protimikrobno na bakterije, kot tudi zaviralno na parazite in viruse, zato predvidevajo, da sPLA₂ sodelujejo pri prirojenem imunskem odzivu gostitelja (13, 26, 27). Sodelujejo tudi pri metabolizmu lipidov, zaužitih s hrano (28).

Kasneje so ugotovili, da nekateri biološki učinki sPLA₂ niso posledica njihove katalitične aktivnosti, temveč posledica vezave sPLA₂ na specifične vezavne proteine v celicah (slika 2A). Tako npr. katalitično neaktivne mutante sPLA₂ pri določenih procesih delujejo prav tako učinkovito kot divji tip fosfolipaze, ki je encimsko aktiven (26). Pri sesalcih se sPLA₂ vežejo na sPLA₂-receptorje tipov M in N ter na gliptan, dekorin in verzikan (27, 29–31). Preko vezave na receptor se sPLA₂ lahko vnesejo v celico, kjer encimsko delujejo in interagirajo z znotrajceličnimi tarčami ali pride tam do njihove razgradnje (v lizosomih). Zato predvidevajo, da sPLA₂ ne delujejo le kot encimi temveč tudi kot ligandi. Znani proteini, ki lahko interagirajo s sPLA₂, so poleg prej omenjenih še: kalmodulin in 14-3-3-proteini, pentraksin podobni protein in pentraksin vezavni proteini, krokablin, pljučni površinski proteini, receptor 2 za vaskularni endoteljski rastni dejavnik in dejavnik strjevanja krvi Xa (pregledno v 26 in 32). Med sPLA₂-vezavnimi proteini je najbolje proučena interakcija fosfolipaz s sPLA₂-receptorjem tipa M, ki pri določenih (pod)skupinah sPLA₂ tudi inhibira njihovo fosfolipazno aktivnost (26). Receptor tipa M je strukturno podoben manoznemu receptorju makrofagov, ki ga uvrščajo v nadružino lektinskih receptorjev tipa C (33). Pri človeku sta prisotni topna in membranska oblika receptorja, ki nastaneta kot posledica alternativnega izrezovanja intronov na ravni mRNA. O pomenu interakcij sPLA₂ z vezavnimi proteini je relativno malo znanega in so zato le-te predmet intenzivnih raziskav.

Kljub vsemu povedanemu pa vloga posameznih sPLA₂ še ni v celoti pojasnjena. Modeli miši s posamično okvarjenimi (izbitimi) geni za sPLA₂ iz skupine I/II/V/X so izzvali dvome o nekaterih prej predpostavljenih vlogah posameznih sPLA₂ v (pato)fizioloških procesih. Kaže, da prihaja do redundance (presežnosti), pri čemer lahko določena sPLA₂ nadomesti vlogo druge, kar prikrije fenotip, povezan z odsotnostjo te druge sPLA₂. Nekateri mišji sevi imajo naravno okvaro gena za sPLA₂-IIA, vendar ni opaziti nenormalnosti, kar kaže na možnost nadomestitve funkcij sPLA₂-IIA z neko drugo skupino sPLA₂-encima (kompenzacija) (34).

4 Patofiziološka vloga sPLA₂

Sesalske sPLA₂ igrajo pomembno vlogo pri različnih patoloških spremembah, od katerih so najboljše raziskani vnetni procesi in ateroskleroza, omeniti pa velja tudi vlogo sPLA₂ pri različnih nevrodegenerativnih in rakavih obolenjih.

4.1 Vnetje

Med sPLA₂ je, kar se vnetja tiče, najbolje proučena vloga sPLA₂-IIA. Ta encim so zasledili v povečanih količinah v tekočini na mestu vnetja (35). Njeno izražanje sprožijo različni signali, povezani z akutnim in kroničnim vnetjem (36–38), kar kaže na to, da je sPLA₂-IIA eden od glavnih dejavnikov pri sproščanju lipidnih mediatorjev med vnetjem (39). Tako so povišane koncentracije sPLA₂-IIA izmerili v serumu in tkivih pri različnih vnetnih obolenjih, kot so: revmatoidni artritis, septični

šok, luskavica, Crohnova bolezen, ulcerativni kolitis, sindrom dihalne stiske in astma (13, 40).

4.2 Ateroskleroza

Vključenost sPLA₂-IIA v proces ateroskleroze so pokazali pri študijah z uporabo transgenih miši s povečanim izražanjem gena za sPLA₂-IIA (41, 42). Takšne transgene miši so imele povečane aterosklerozne poškodbe, okoli katerih je bila nakopičena sPLA₂-IIA (42). Pri človeku so na ateroskleroznih plakih zasledili povezavo med sPLA₂-IIA in dekorinom, majhnim glikoproteinom, ki ima kovalentno vezan hondroitin sulfat ali dermatan sulfat glikozaminoglikan. Ugotovili so, da se sPLA₂-IIA veže na dekorin. Pri vezavi na dekorin se njena encimska aktivnost poveča za 2 do 3-krat. Predpostavljajo, da tako povečana aktivnost sPLA₂-IIA vpliva na spremembe plazemskih lipoproteinov in na nastanek lipidnih mediatorjev na mestu tvorbe ateroskleroznih plakov (30). Novejše študije so pokazale, da pri razvoju ateroskleroze sodeluje tudi sPLA₂-V, in sicer na drugačen način, tako da bo potrebno njeno vlogo pri razvoju ateroskleroze še natančneje proučiti (43, 44).

4.3 Neurodegenerativna obolenja

Vse več študij kaže tudi na vlogo različnih skupin sPLA₂ pri neurodegenerativnih obolenjih, kot so: Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, multipla skleroza, epilepsija, shizofrenija in depresivne motnje (45). Fosfolipaze A₂ iz skoraj vseh skupin so prisotne v centralnem živčnem sistemu (46). Predpostavljajo, da se ob indukciji sinteze sPLA₂ s citokini in kemokini poveča sproščanje AA in s tem nastanek vnetnih mediatorjev, kar privede do vnetja v centralnem živčnem sistemu. Pri omenjenih neurodegenerativnih obolenjih je značilno povišana raven citokinov in eikozanoidov (45).

4.4 Rakava obolenja

Novejše raziskave kažejo na vpletenost sPLA₂, AA in njenih metabolitov v razvoj kolorektalnega raka (47) in raka prostate (48). Pri tem se pojavi neravnovesje v izražanju sPLA₂ in neravnovesje v metabolizmu AA, kar pomembno vpliva na različne fiziološke procese v celici. Številne raziskave kažejo, da je povečano tudi izražanje COX-2 in s tem je povečana sinteza mitogenih prostaglandinov, kar pa je ključna značilnost različnih oblik rakavih obolenj, med drugimi kolorektalnega raka, raka prostate in raka dojke (49). Pomen sPLA₂, predhodnikov COX-2 v kaskadi pretvorbe AA, pri razvoju in napredovanju rakavih obolenj je priznan, a zaenkrat slabo raziskan patološki proces (50). Predpostavljajo, da bi sPLA₂ lahko bile primerne tarče za preprečevanje določenih rakavih obolenj (51).

5 Inhibitorji sPLA₂

Spoznanja o vlogi sPLA₂ pri vnetnih obolenjih in drugih patoloških procesih so spodbudila farmacevtska podjetja k razvoju inhibitorjev sPLA₂. V splošnem so najučinkovitejši inhibitorji na osnovi indolovih derivatov, kot so npr. indoksam, metilindoksam in LY311727 (52–54). Nekateri od teh so se izkazali za uspešne pri študijah na živalskih modelih vnetja, kar kaže na to, da so sPLA₂ morda ena od primernih tarč za preprečevanje vnetja, vendar pa podobnih uspehov pri študijah na ljudeh še ni (55, 56). Z odkritjem vse več novih skupin sPLA₂ se je

pokazalo, da številni inhibitorji sPLA₂, vključno z metilindoksamom, niso selektivni le za določeno (pod)skupino sPLA₂ (52–54, 57). Še več, nedavno so pokazali, da nekateri inhibitorji ne inhibirajo le encimske aktivnosti sPLA₂, temveč tudi preprečujejo vezavo s sPLA₂-receptorjem tipa M (57). Ta novejša spoznanja zahtevajo, da se ponovno opravijo določene predklinične raziskave inhibitorjev, ki bi bili lahko ustrezni za preprečevanje in zdravljenje obolenj, izzvanih s sPLA₂. Ostaja tudi odprto vprašanje, ali inhibitorji prav tako preprečijo interakcijo sPLA₂ z nekaterimi drugimi vezavnimi proteini sPLA₂. Naravni proteinski inhibitorji endogenih sPLA₂ pri človeku še niso poznani, so pa znani nekateri naravni inhibitorji kačjih nevrotoksičnih sPLA₂ (58). Poleg iskanja specifičnih naravnih inhibitorjev tudi intenzivno proučujejo delovanje peptidnih inhibitorjev in peptidomimetikov, pridobljenih na osnovi proteinske strukture in molekulskega modeliranja, ki specifično inhibirajo aktivnost sPLA₂ (59).

6 Zaključek

Vloga posameznih skupin sPLA₂ v različnih patofizioloških procesih je predmet intenzivnih raziskav. Številčnost sPLA₂, njihova relativno nizka substratna specifičnost in vključenost v različne celične procese kažejo na veliko kompleksnost delovanja teh encimov, ki ga v celoti še ne razumemo. Spoznanje, da sPLA₂ delujejo kot encimi in kot ligandi, pa nedvomno odpira nov pogled na njihovo delovanje.

7 Zahvala

Zahvaljujemo se izr. prof. dr. Igorju Križaju za kritični pregled prispevka in dr. Rogerju H. Painu za pregled angleškega dela članka.

8 Literatura

- Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761: 1246–1259.
- Verheij HM, Volwerk JJ, Jansen EHJM, Puyk WC, Dijkstra BW, Drenth J, de Haas GH. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* 1980; 19: 743–750.
- Dijkstra BW, Drenth J, Kalk KH. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A₂. *Nature* 1981; 289: 604–606.
- Scott DL, White SP, Browning JL, Rosa JJ, Gelb MH, Sigler PB. Structures of free and inhibited human secretory phospholipase A₂ from inflammatory exudate. *Science* 1991; 254: 1007–1010.
- Bezzine S, Bollinger JG, Singer AG, Veatch SL, Keller SL, Gelb MH. On the binding preference of human groups IIA and X phospholipases A₂ for membranes with anionic phospholipids. *J Biol Chem* 2002; 277: 48523–48534.
- Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadilek M, Nguyen E, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J Biol Chem* 2002; 277: 48535–48549.
- Verheij HM, Slotboom AJ, de Haas GH. Structure and function of phospholipase A₂. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1981; 91: 91–203.

8. Hanasaki K, Ono T, Saiga A, Morioka Y, Ikeda M, Kawamoto K, Higashino K, Nakano K, Yamada K, Ishizaki J, Arita H. Purified group X secretory phospholipase A2 induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 34203–34211.
9. Valentin E, Ghomashchi F, Gelb MH, Lazdunski M, Lambeau G. Novel human secreted phospholipase A2 with homology to the group III bee venom enzyme. *J Biol Chem* 2000; 275: 7492–7496.
10. Gelb MH, Valentin E, Ghomashchi F, Lazdunski M, Lambeau G. Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A2. *J Biol Chem* 2000; 275: 39823–39826.
11. Ho IC, Arm JP, Bingham III CO, Choi A, Austen KF, Glimcher LH. A novel group of phospholipase A2s preferentially expressed in type 2 helper T cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18321–18326.
12. Rouault M, Bollinger JG, Lazdunski M, Gelb, MH, Lambeau G. Novel mammalian group XII secreted phospholipase A2 lacking enzymatic activity. *Biochemistry* 2003; 42: 11494–11503.
13. Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68–69: 3–58.
14. Tada K, Murakami M, Kambe T, Kudo I. Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A2 in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions. *J Immunol* 1998; 161: 5008–5015.
15. Balsinde J, Shinohara H, Lefkowitz LJ, Johnson CA, Balboa MA, Dennis EA. Group V phospholipase A2-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J Biol Chem* 1999; 274: 25967–25970.
16. Bidgood MJ, Jamal OS, Cunningham AM, Brooks PM, Scott KF. Type IIA secretory phospholipase A2 upregulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes. *J Immunol* 2000; 165: 2790–2797.
17. Fuentes L, Hernandez M, Nieto ML, Sanchez Crespo M. Biological effects of group IIA secreted phospholipase A2. *FEBS Lett* 2002; 531: 7–11.
18. Beck S, Lambeau G, Scholz-Pedretti K, Gelb MH, Janssen MJ, Edwards SH, Wilton DC, Pfeilschifter J, Kaszkin M. Potentiation of TNFR-induced sPLA2-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving secreted phospholipase A2 and PPARR activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 29799–29812.
19. Choi YA, Lim HK, Kim JR, Lee CH, Kim YJ, Kang SS, Baek SH. Group IB secretory phospholipase A2 promotes matrix metalloproteinase-2-mediated cell migration via the phosphatidylinositol-3 kinase and Akt pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 36579–36585.
20. Rizzo MT, Nguyen E, Aldo-Benson M, Lambeau G. Secreted phospholipase A2 induces vascular endothelial cell migration. *Blood* 2000; 96: 3809–3815.
21. Boilard E, Bourgoin SG, Bernatchez C, Surette ME. Identification of an autoantigen on the surface of apoptotic human T cells as a new protein interacting with inflammatory group IIA phospholipase A2. *Blood* 2003; 102: 2901–2909.
22. Jo EJ, Lee HY, Lee YN, Kim JI, Kang HK, Park DW, Baek SH, Kwak JY, Bae YS. Group IB secretory phospholipase A2 stimulates CXC chemokine ligand 8 production via ERK and NF- κ B in human neutrophils. *J Immunol* 2004; 173: 6433–6439.
23. Lee C, Park DW, Lee J, Lee TI, Kim YJ, Lee YS, Baek SH. Secretory phospholipase A2 induces apoptosis through TNF-R and cytochrome c-mediated caspase cascade in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Eur J Pharmacol* 2006; 536: 47–53.
24. Granata F, Petraroli A, Boilard E, Bezzine S, Bollinger J, Del Vecchio L, Gelb MH, Lambeau G, Marone G, Triggiani M. Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *J Immunol* 2005; 174: 464–474.
25. Granata F, Frattini A, Loffredo S, Del Prete A, Sozzani S, Marone G, Triggiani M. Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A2 in human lung macrophages. *Eur J Immunol* 2006; 36: 1938–1950.
26. Rouault M, Le Calvez C, Boilard E, Surrel F, Singer A, Ghomashchi F, Bezzine S, Scarzello S, Bollinger J, Gelb MH, Lambeau G. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry* 2007; 46: 1647–1662.
27. Valentin E, Lambeau G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 59–70.
28. Richmond BL, Boileau AC, Zheng S, Huggins KW, Granholm NA, Tso P, Hui DY. Compensatory phospholipid digestion is required for cholesterol absorption in pancreatic phospholipase A(2)-deficient mice. *Gastroenterology* 2001; 120: 1193–1202.
29. Koduri RS, Baker SF, Snitko Y, Han SK, Cho W, Wilton DC, Gelb MH. Action of human group IIA secreted phospholipase A2 on cell membranes. Vesicle but not heparinoid binding determines rate of fatty acid release by exogenously added enzyme. *J Biol Chem* 1998; 273: 32142–32153.
30. Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Yamamoto S, Kuwata H, Kudo I. Functional association of type IIA secretory phospholipase A2 with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 29927–29936.
31. Sartipy P, Johansen B, Gasvik K, Hurt-Camejo E. Molecular basis for the association of group IIA phospholipase A2 and decorin in human atherosclerotic lesions. *Circ Res* 2000; 286: 707–714.
32. Pungerčar J, Križaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. *Toxicon* 2007; 50: 871–892.
33. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 364–386.
34. Kennedy BP, Payette P, Mudgett J, Vadas P, Pruzanski W, Kwan M, Tang C, Rancourt DE, Cromlish WA. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem* 1995; 270: 22378–22385.
35. Vadas P, Wasi S, Movat HZ, Hay JB. Extracellular phospholipase A2 mediates inflammatory hyperaemia. *Nature* 1981; 293: 583–585.

36. Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W. Extracellular phospholipase A₂ expression and inflammation: The relationship with associated disease states. *J Lipid Mediat* 1993; 8: 1–30.
37. Andreani M, Olivier JL, Berenbaum F, Raymondjean M, Berezziat G. Transcriptional regulation of inflammatory secreted phospholipases A₂. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 149–158.
38. Nevalainen TJ, Haapamaki MM, Gronroos JM. Roles of secretory phospholipases A₂ in inflammatory diseases and trauma. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 83–90.
39. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A₂: A mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* 1991; 12: 143–146.
40. Minami T, Tojo H, Shinomura Y, Matsuzawa Y, Okamoto M. Increased group II phospholipase A₂ in colon mucosa of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1994; 35: 1593–1598.
41. Ivandic B, Castellani LW, Wang XP, Qiao JH, Mehrabian M, Navab M, AJ. Role of group II secretory phospholipase A₂ in atherosclerosis. Part 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIA phospholipase A₂. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1284–1290.
42. Tietge UJ, Maugeais C, Cain W, Grass D, Glick JM, de Beer FC, Rader DJ. Overexpression of secretory phospholipase A₂ causes rapid catabolism and altered tissue uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 2000; 275: 10077–10084.
43. de Beer FC, Webb NR. Inflammation and atherosclerosis: Group IIA and Group V sPLA₂ are not redundant. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1421–1422.
44. Rosengren B, Peilot H, Umaerus M, Jonsson-Rylander AC, Mattsson-Hulten L, Hallberg C, Cronet P, Rodriguez-Lee M, Hurt-Camejo E. Secretory phospholipase A₂ group V: lesion distribution, activation by arterial proteoglycans, and induction in aorta by a Western diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1579–1585.
45. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem* 2007; 101: 577–599.
46. Molloy GY, Rattray M, Williams RJ. Genes encoding multiple forms of phospholipase A₂ are expressed in rat brain. *Neurosci Lett* 1998; 258: 139–142.
47. Murakami M, Masuda S, Shimbara S, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. Cellular distribution, post-translational modification, and tumorigenic potential of human group III secreted phospholipase A₂. *J Biol Chem* 2005; 280: 24987–24998.
48. Dong Q, Patel M, Scott KF, Graham GG, Russell PJ, Sved P. Oncogenic action of phospholipase A₂ in prostate cancer. *Cancer Lett* 2006; 240: 9–16.
49. Ulrich CM, Bigler J, Potter JD. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat Rev Cancer* 2006; 2: 130–140.
50. Nakanishi M, Rosenberg DW. Roles of cPLA₂α and arachidonic acid in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761: 1335–1343.
51. Laye JP, Gill JH. Phospholipase A₂ expression in tumours: a target for therapeutic intervention? *Drug Discov Today* 2003; 8: 710–716.
52. Reid RC. Inhibitors of secretory phospholipase A₂ group IIA. *Curr Med Chem* 2005; 12: 3011–3026.
53. Smart BP, Pan YH, Weeks AK, Bollinger JG, Bahnson BJ, Gelb MH. Inhibition of the complete set of mammalian secreted phospholipases A₂ by indole analogues: a structure-guided study. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 1737–1749.
54. Smart BP, Oslund RC, Walsh LA, Gelb MH. The first potent inhibitor of mammalian group X secreted phospholipase A₂: elucidation of sites for enhanced binding. *J Med Chem* 2006; 49: 2858–2860.
55. Bradley JD, Dmitrienko AA, Kivitz AJ, Gluck OS, Weaver AL, Wiesenhutter C, Myers SL, Sides GD. A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial of LY333013, a selective inhibitor of group II secretory phospholipase A₂, in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32: 417–423.
56. Zeiher BG, Steingrub J, Laterre PF, Dmitrienko A, Fukiishi Y, Abraham E; EZZI Study Group. LY315920NA/S-5920, a selective inhibitor of group IIA secretory phospholipase A₂, fails to improve clinical outcome for patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33: 1741–1748.
57. Boilard E, Rouault M, Surrel F, Le Calvez C, Bezzine S, Singer A, Gelb MH, Lambeau G. Secreted phospholipase A₂ inhibitors are also potent blockers of binding to the M-type receptor. *Biochemistry* 2006; 45: 13203–13218.
58. Šribar J, Kovačič L, Draškovič P, Faure G, Križaj I. The first phospholipase inhibitor from the serum of *Vipera ammodytes*. *FEBS J* 2007; 274: 6055–6064.
59. Thwin MM, Satyanarayanan SD, Nagarajaram LM, Sato K, Arjunan P, Ramapatna SL, Kumar PV, Gopalakrishnakone P. Novel peptide inhibitors of human secretory phospholipase A₂ with antiinflammatory activity: Solution structure and molecular modeling. *J Med Chem* 2007; 50: 5938–5950.