

Syttoplasmisen A₂-tyypin fosfolipaasi α :n substraattispesifisyyteen vaikuttavat tekijät

Ville Rantala LK

Lääketieteellisen tiedekunnan Biokemian ja Kehitysbiologian yksikkö

Helsinki 12.6.2015

Tutkielma

ville.u.rantala@helsinki.fi

Ohjaaja: Pentti Somerharju

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution – Department	
Lääketieteellinen tiedekunta		Medicum	
Tekijä/Författare – Author			
Ville Rantala			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
Sytoplasmisen A ₂ -tyypin fosfolipaasi α :n substraattispesifisyyteen vaikuttavat tekijät			
Oppiaine /Läroämne – Subject Lääketiede			
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages	
Tutkielma	12.6.2015	38	
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Tutkimuksessa haluttiin määrittää aikaisempaa tietämystä tarkemmin sytoplasmisen A₂-tyypin fosfolipaasi α:n (cPLA₂α) substraattispesifisyys sekä sitä rajoittavat tekijät. Tätä varten entsyymien geenit ekspressoitiin bakulovirusmenetelmällä viljellyissä <i>Spodoptera frugiperda</i>-soluissa. Entsyymi eristettiin ja sen aktiivisuus määritettiin. Aktiivista puhdistettua entsyymiä käytettiin useissa pienillä unilamellaarisilla vesikkeleillä ja miselleillä (makrosubstraatteina) tehdyissä glyserofosfolipidien hydrolyysikokeissa, jotka analysoitiin massaspektrometrillä menetelmällä. Tutkimuksissa selvitettiin glyserofosfolipidien tyydyttyneisyyden, asyyliketjujen pituuden ja polaaristen pääryhmien vaikutusta hydrolyysiin. Lisäksi tutkittiin keskenään positionaalisten isomeerien hydrolyysin eroja.</p> <p>Tutkimus vahvisti, että cPLA₂α todellakin on spesifinen arakidonihappoa sisältävälle glyserofosfolipideille. Lisäksi sen todettiin hydrolysoivan merkittävästi 1,2-dilinolenoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliinia. Muita lyhytketjuisia ja tyydyttymättömiä glyserofosfolipidejä se hydrolysoi pieniä määriä. Eri glyserofosfolipidien polaarista pääryhmistä se hydrolysoi parhaiten fosfatidihappoa, toiseksi parhaiten fosfatidyylylglyserolia ja kolmanneksi parhaiten fosfatidyylikoliinia. Tärkeimmäksi hydrolyysiä rajoittavaksi tekijäksi osoittautui substraattien sitoutuminen entsyymien aktiiviseen keskukseen ja toissijaiseksi niiden kyky irtautua kalvosta/miselistä. cPLA₂α:n kohonnut aktiivisuus on yhdistetty muun muassa lukuisiin eri syöpiin, tulehduksellisiin autoimmuunisairauksiin ja neurodegeneratiivisiin sairauksiin. Tutkimuksesta saatua tietoa voitaneen käyttää tulevaisuudessa cPLA₂α:a inhiboivien täsmälääkkeiden kehittelyyn kyseisten sairauksien hoitoon.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Substrate Specificity; Phospholipases A; Phospholipids; Membranes; Mass-spectrometry			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

1 Johdanto	2
2 Kirjallisuuskatsaus	3
2.1. Glycerofosfolipidit	3
2.2 Glycerofosfolipidihomeostaasi	5
2.3 Fosfolipaasit	7
2.4 cPLA ₂ α	9
3 Menetelmät	16
3.1 Lipidit ja muut kemikaalit	16
3.2 Solujen kasvatus ja geeniekspressio	16
3.3 cPLA ₂ α:n eristys	17
3.4 SDS-elektroforeesi ja immunovärjäys	18
3.5 cPLA ₂ α:n aktiivisuuden määrittäminen	18
3.6 cPLA ₂ α:n substraattispesifisyyden määrittäminen	19
4 Tulokset	20
4.1 cPLA ₂ α-StrepIII:n puhdistus	20
4.2 PC-seoksen hydrolyysi miselleissä	22
4.3 PC-seoksen hydrolyysi vesikkeleissä	23
4.4 16:0/C _n - ja C _n /16:0-PC:n hydrolyysi vesikkeleissä	24
4.5 Polaarisen pääryhmän vaikutus hydrolyysin miselleissä	25
4.6 Polaarisen pääryhmän vaikutus hydrolyysiin vesikkeleissä	26
5 Pohdinta	27
Liitteet	35

1 Johdanto

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää aikaisempaa tarkemmin sytoplasmisen A₂-tyypin fosfolipaasi α :n (cPLA₂ α ; yleisimpien lyhenteiden selitykset liitteessä 1) substraattispesifisyys. Lisäksi haluttiin selvittää, onko entsyymin aiheuttaman hydrolyysin rajoittavana tekijänä substraatin sitoutuminen entsyymin aktiiviseen kohtaan vai substraatin irtoaminen kalvosta/misellistä (effluksi). Entsyymin spesifisyyttä selvitettiin aikaisemmin kehitetyllä massaspektrometrillä menetelmällä tutkimalla glyserofosfolipidien asyyliketjujen pituuden, tyydyttyneisyysasteen ja aseman sekä polaaristen pääryhmien vaikutusta hydrolyysiin. Kokeet tehtiin sekä miselleitä että vesikkeleitä makrosubstraattina käyttäen.

Tutkimusta varten ihmisen cPLA₂ α :aa ekspressoitiin viljellyissä *Spodoptera frugiperda*-soluissa (Sf9-soluissa), joihin entsyymin geeni siirrettiin käyttämällä bakulovirusia siirtovektoreina. Entsyymin eristykseen soluista käytettiin geeniin liitettyä Strep-III-affiniteettitarraa. Eristetyn entsyymin puhtaus arvioitiin Coomassie-sininen- ja anti-cPLA₂ α -vasta-aine-värjäyksillä (Western blotting). Entsyymin aktiivisuus määritettiin käyttämällä radioaktiivista fosfatidyylikoliinia (PC) ja ohutkerroskromatografiaa. Puhdistettua entsyymiä käytettiin substraattispesifisyyskokeissa, joissa entsyymin annettiin reagoida erilaisten glyserofosfolipidien kanssa, minkä jälkeen tutkimusten hydrolyysiasteet määritettiin massaspektrometrisesti. Massaspektrometrin antamat tulokset analysoitiin Excel-, QuanLynx- ja LIMS-ohjelmilla.

Käytetty massaspektrometrinen menetelmä sopii huomattavasti paremmin fosfolipaasien substraattispesifisyyksien määrittämiseen kuin aikaisemmin käytetyt radioaktiivisesti merkittyihin glyserofosfolipideihin perustuvat menetelmät (1-4), koska se mahdollistaa kymmenien erilaisten glyserofosfolipidien hydrolyysin määrittämisen samanaikaisesti. Näin saadaan aikaisempaa paljon kattavampi käsitys entsyymien substraattispesifisyydestä. Menetelmää on jo aikaisemmin käytetty laboratoriossamme sekretoristen A₂-tyypin fosfolipaasien (sPLA₂) sekä kalsiumista riippumattoman A₂-tyypin fosfolipaasi β :n (iPLA₂ β) substraattispesifisyyksien määrittämiseen (5,6).

Pohdinnassa vertaan tuloksia aikaisempiin cPLA₂ α :n vastaaviin tutkimuksiin sekä samalla menetelmällä saatuihin tuloksiin sPLA₂- sekä iPLA₂ β -entsyymien substraattispesifisyyksistä. Kirjallisuuskatsauksessa esitellen cPLA₂ α :n rakenne,

toiminta, säätely sekä sen yhteys erilaisiin sairauksiin. Lisäksi käsittelen yleisesti glyserofosfolipidejä ja niiden homeostaasia. cPLA₂α:n lisäksi myös muista fosfolipaaseista on lyhyet esittelyt.

cPLA₂α:n geenin siirron Sf9-soluihin bakulovirusmenetelmällä (ks. menetelmät) teki Michael Jeltschin tutkimusryhmä Helsingin yliopiston biolääketieteen laitokselta. Menetelmien optimoinnista, toteutuksesta ja tuloksissa käytetyistä kuvista olen kiitollinen MSc. Krishna Chaithanya Batchulle, jonka työ oli tutkielman kannalta korvaamaton.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1. Glyserofosfolipidit

Glyserofosfolipidit koostuvat glyseroliin sitoutuneista hydrofiilisestä polaarista pääryhmästä sekä kahdesta hydrofobisesta rasvahappotähteestä. Pääryhmä on kiinnittynyt esterisidoksella glyserolin sn3-hiileen ja rasvahappotähteet puolestaan sn1- ja sn2-hiiliin. Glyserofosfolipidit muodostavat perustan eukaryootisolujen kalvorakenteille, joita ovat solukalvo, Golgi, mitokondriot, endoplasminen kalvosto (ER), lysosomit, peroksisomit ja endosomit. (7-11)

Nisäkässolut sisältävät lukuisia erilaisia glyserofosfolipidejä, jotka eroavat toisistaan polaarisen pääryhmän ja rasvahappotähteiden suhteen. Yleisimmät glyserofosfolipidit ovat fosfatidyylikoliinit (PC), fosfatidyylietanolamiinit (PE), fosfatidyyliiseriinit (PS) sekä fosfatidyyli-inositolit (PI). Kardiolipiiniä (CL) esiintyy vain mitokondrioissa (noin 30 % sisälehden lipideistä). Pääryhmän mahdollinen varaus yhdistettynä fosfaatin negatiiviseen varaukseen antavat glyserofosfolipideille niiden kokonaisvarauksen. PC:n ja PE:n nettovaraus on neutraali, kun taas PS, PI ja CL ovat negatiivisesti varautuneita. Negatiiviset glyserofosfolipidit tekevät myös kalvoista negatiivisesti varattuja. (7-11)

Glyserofosfolipidit eroavat polaarisen pääryhmän lisäksi rasvahappotähteiden pituuden ja tyydyttyneisyyden suhteen. Rasvahapot ovat yleensä 14–24 hiiltä pitkiä ja sisältävät nollasta kuuteen kaksoissidosta. Sn1-hiileen sitoutunut rasvahappo on yleensä

tyydyttynyt, kun taas sn^2 -hiileen sitoutunut rasvahappo on yleensä tyydyttymätön. (7,10,11)

Joissakin glyserofosfolipideissä rasvahapot ovat glyserolissa kiinni esterisidoksen sijaan eetterisidoksella. Esimerkkinä tästä ovat plasmalogenit, joita on erityisen paljon aivo- ja sydänkudoksessa. Myös verihiutaleita aktivoiva tekijä (PAF) on eetterisidoksen sisältävä glyserofosfolipidi. Glyserofosfolipidien lisäksi solujen kalvoissa on sfingolipidejä, glykolipidejä, kolesterolia sekä lukuisia proteiineja, jotka toimivat muun muassa reseptoreina, aktiivisina kuljettajina tai ionikanavina. (8,10)

Glyserofosfolipidien amfipaattisuudesta johtuen ne muodostavat vesiympäristössä kaksoiskalvon, jossa hydrofiiliset pääryhmät ovat suuntautuneina vettä kohti ja hydrofobiset rasvahappotähteet kalvon sisään. Kalvot mahdollistavat sytoplasman eristämisen ympäristöstä sekä soluelinten matriksin eristämisen sytoplasmasta. Kalvoista pääsevät passiivisesti läpi ainoastaan pienet varauksettomat molekyylit (esim. O_2 ja CO_2) sekä tietyt rasvaliukoiset yhdisteet, kuten rasvahapot. Muut aineet tarvitsevat läpikäynnin spesifisiä kuljettajia tai ionikanavia. (7-9,11)

Lipidit diffundoituvat kalvon tasossa nopeasti vapaasti. Siihen, miten nopeasti lipidit diffundoituvat, vaikuttavat rasvahappotähteiden tyydyttyneisyys sekä kolesterolin määrä. Tyydyttyneet rasvahapot pakkautuvat tiiviisti, jolloin niiden välille syntyy enemmän vuorovaikutuksia, kuten dispersiovoimia. Kaksoissidos rasvahapon hiilten välillä aiheuttaa asyyliketjuun 'mutkan', joten tyydyttymättömät rasvahapot eivät voi pakkautua yhtä tiiviisti. Tyydyttyneiden rasvahappojen runsaus siis lisää kalvon jäähmyttä, kun taas tyydyttymättömät rasvahapot pienentävät sitä. Tyydyttymättömien rasvahappojen pakkausvirheet mahdollistavat pienten varauksettomien molekyyliden passiivisen diffuusion kalvon läpi. Huonompi pakkautuminen on myös välttämätöntä kalvoproteiinien toiminnalle, koska se vaatii tilaa proteiinien konformaation muutoksille. (7-9)

Eri soluelinten kalvoilla on erilaiset lipidikoostumukset, ja lipidien jakautuminen saman kalvon eri puolien välillä voi olla asymmetrinen (7-10). Esimerkiksi PE ja PS esiintyvät lähinnä solukalvon sytoplasmisessa lehdykässä (8,11). PS:n siirtyminen ekstrasellulaariseen lehdykkään toimii apoptoottisena signaalina (8). Lipidikoostumus antaa kalvoille tietyt ominaisuudet, jotka ovat välttämättömiä niiden normaalille toiminnalle, joihin vaikuttavat mm. kalvon juoksevuus, läpäisevyys ja sähkövaraus.

Lipidikoostumus vaikuttaa lipidien ja kalvoproteiinien väliseen vuorovaikutukseen ja siten proteiinien toimintaan. (7-9) Lipidien ja proteiinien asymmetrinen jakautuminen mahdollistaa lisäksi erilaisten mikrodomeenien syntymisen kalvojen sisälle. Nämä mikrodomeenit ovat ilmeisesti tärkeitä signaalinvälityksen kannalta. (8,11)

2.2 Glyserofosfolipidihomeostaasi

Kalvorakenteiden lipidikoostumus on pidettävä tiettyjen rajojen puitteissa edellä mainittujen ominaisuuksien takaamiseksi. Homeostaasin tärkeydestä kertoo se, että lähes kaikki sen ylläpitoon osallistuvien entsyymien mutaatioit ovat letaaleja. Glyserofosfolipidihomeostaasiin vaikuttavat tekijät ovat glyserofosfolipidien biosynteesi, solunsisäinen kuljetus, rasvahappokoostumuksen muokkaus sekä hajotus. Homeostaasin säätelystä tiedetään vähän mutta synteessin ja hajotuksen koordinoinnin uskotaan olevan keskeisessä asemassa. Niin sanottu hilamalli (superlattice model) ehdottaa, että synteesiä ja hajotusta säätelisi kalvojen lipidikoostumuksen äkilliset muutokset. Mallin mukaan glyserofosfolipideillä on taipumus muodostaa omaksuttuja tiettyjä energeettisesti edullisia suhteita kalvoissa. Tietyn glyserofosfolipin konsentraation kasvaessa liikaa kalvon sisällä syntyy pakkausvirheitä, jotka eivät ole energeettisesti edullisia eikä näin ollen 'hyväksytyjä'. Hilamalli ehdottaa, että syntyvät pakkausvirheet aktivoivat homeostaattisia fosfolipaaseja, jotka hajottavat ns. ylimäärin olevat glyserofosfolipidit, jolloin saavutetaan taas ns. sallittu koostumus. Pakkausvirheet voisivat myös inhiboida synteesiä. (10)

Biosynteesi

Kaikkien glyserofosfolipidien synteessin edellytyksenä on fosfatidihapon (PA) tuottaminen liittämällä kaksi rasvahappoa ja glyseroli-3-fosfaatti. PC:n, PE:n ja PS:n syntetisöimiseksi PA defosforyloidaan diasyylylglyseroliksi (DAG). Vaihtoehtoisesti PA reagoi cytidyyli trifosfaatin (CTP) kanssa muodostaen CDP-diasyylylglyserolia, joka edelleen muutetaan PI:ksi ja CL:ksi. (8,10,11)

PC:n synteesi noudattaa ns. Kennedyn reittiä (12). Ensimmäisessä vaiheessa sytoplasminen koliinikinaasi fosforyloi koliinin fosfokoliiniksi. Seuraavat kaksi vaihetta tapahtuvat ER:ssa. Ensin fosfokoliini reagoi CTP:n kanssa muodostaen CDP-koliinin.

Sitten CDP-koliini reagoi PA:sta saadun DAG:in kanssa, jolloin lopputuotteena saadaan PC:a. Maksassa PC:a voidaan valmistaa myös metyloimalla PE kolme kertaa. PE-synteesi noudattaa samaa kaavaa kuin PC:n mutta reaktioita katalysoivat eri entsyymit. Vaihtoehtoinen tapa PE:n tuottamiseksi on PS:n dekarboksylaatio mitokondriossa. PS:n valmistamiseksi PE:n tai PC:n pääryhmä vaihdetaan seriiniin. (8,10,11)

PI-synteesissä PA:n ja CTP:n reaktiotuotteena saatu CDP-diasyyliglyseroli reagoi inositolin kanssa muodostaen PI:a. Muiden glyserofosfolipidien tapaan PI-synteesi tapahtuu ER:ssä. CDP-diasyyliglyseroli voi myös reagoida glyseroli-3-fosfaatin kanssa ja muodostaa PG:a. CL muodostuu, kun PG ja CDP-diasyyliglyseroli kondensoidaan. (8,10,11,13)

Rasvahappojen koostumuksen muokkaus

Glyserofosfolipidien rasvahappokoostumuksen muokkauksessa toinen tai kumpikin rasvahappotähteistä poistetaan tyypin A fosfolipaasin (PLA) toimesta. PLA₁ poistaa rasvahapon sn1-asemasta ja PLA₂ sn2-asemasta. Seuraavaksi muodostuneeseen lysofosfolipidiin liitetään uusi rasvahappo asyylitransferraasin tai transasyylaasin avulla. Vaihtoehtoisesti lysofosfolipidistä voidaan poistaa myös toinen rasvahappotähteistä lysofosfolipaasin avulla mutta tällöin kyseessä ei ole varsinaisesti muokkaus. (7,8,10)

Rasvahappokoostumuksen muokkausta tarvitaan muun muassa, kun arakidonihappoa (AA) vapautetaan eikosanoidien tuotantoa varten ja happiradikaalien vioittamia rasvahappoja korvataan uusilla. Kaikkia muokkaukseen osallistuvia entsyymejä ei ole vielä onnistuttu tunnistamaan. (7,8,10)

Hajotus

Glyserofosfolipidien hajotus on keskeisessä osassa glyserofosfolipidien homeostaasissa. Useat tutkijat ovat havainneet, että jonkin glyserofosfolipin synteesin lisääminen lisää myös sen hajotusta, jolloin sen määrä ei nouse (10,14). Vielä ei tarkkaan tiedetä, mitkä entsyymit osallistuvat glyserofosfolipidien homeostaattiseen hajotukseen. Osa hajotuksesta tapahtuu lysosomeissa, kuten endosytosoitujen ja (auto)fagosytoitujen

kalvorakenteiden glyserofosfolipidien hajotus. Hajotukseen osallistuvia entsyymejä ovat tyypin C, D ja A fosfolipaasit. (10)

Solunsisäinen Kuljetus

Koska glyserofosfolipidit syntetisoidään (kardiolipiiniä lukuun ottamatta) ER:ssa, ne on kuljetettava toisten soluelinten kalvoille. Tumalle tarkoitettujen glyserofosfolipidien diffuuntituvat mahdollisesti ER:sta yhdistävien kalvojatkokumoiden kautta. (9) Muihin soluelimiin glyserofosfolipit kuljetetaan vesikkeleissä, jotka lähtevät ER:sta. (8-10) Mitokondrioihin ja peroksisomeihin ei kulje ER:sta vesikkeliliikennettä, joten syntetisoidut glyserofosfolipidit kuljetetaan näihin soluelimiin luultavasti erilaisten kuljetusproteiinien toimesta. (8-10)

Kaksoiskalvojen asymmetristä lipidikoostumusta ylläpitävät ns. flippaasit (p-tyypin ATPaasi) ja floppaasit (ABC-transportteri), jotka siirtävät glyserofosfolipidejä ATP-energialla konsentraatiogradientin vastaisesti kalvon puolelta toiselle. Skramblaasi siirtää glyserofosfolipidejä konsentraatiogradientin mukaisesti, joten sen toiminta ei vaadi energiaa. (13)

2.3 Fosfolipaasit

Tyypin C fosfolipaasit (PLC) katkaisevat fosfaatin ja glyserolirungon välisen sidoksen tuottaen näin DAG:in ja fosforyloidun polaarisen pääryhmän (8,10). PLC on tärkeä signaalinvälityksessä, jossa se pilkkoo fosfoinositolin (PIP₃) DAG:ksi ja IP₃:ksi (inositoli-1,4,5-trifosfaatti) (7,8). Nämä ovat molemmat tärkeitä signaalimolekyylejä monissa viestiketjuissa. Tyypin D fosfolipaasit (PLD) hydrolysoivat polaarisen pääryhmän ja fosfaatin välisen sidoksen tuottaen PA:n ja vapaan pääryhmän (8,10). PLD:n toiminnan uskotaan myös liittyvän lähinnä signaalinvälitykseen. (10)

PLA₂-perheistä keskeisimmät ovat ns. eritettävät PLA₂t (sPLA₂), sytoplasmiset PLA₂t (cPLA₂t) ja kalsiumista riippumattomat PLA₂t (iPLA₂t). sPLA₂-perheeseen kuuluu 11 entsyymiä (14). Ne ovat Ca²⁺-riippuvaisia solun ulkopuolelle erittyviä 14-19 kDa:n PLA₂-entsyymejä. Perheen eri jäsenet eroavat rakenteeltaan mutta niille on kaikille ominaista histidiinin ja asparagiinihapon muodostama katalyyttinen pari aktiivisessa

keskuksessa, joka sijaitsee hydrofobisten aminohappojen rajaamassa kanavassa. Aktiivisen keskuksen lisäksi kaikille sPLA₂-entsyymeille on yhteistä kalsiumia sitova luoppi sekä kuusi disulfididosta. Tämän lisäksi jokainen entsyymi sisältää yhden tai kaksi välttämätöntä disulfididosta. sPLA₂-entsyymit ovat rasvahappospesifisiä. Osa niistä sitoutuu parhaiten neutraaleihin ja osa negatiivisiin makrosustraateihin. (14,15)

Koska sPLA₂t ovat erittyviä entsyymejä, ne toimivat lähinnä solun ulkopuolella, missä niillä on lukuisia eri substraatteja ja tehtäviä. Haimasta ohutsuoleen eritettävä sPLA₂-IB hajottaa ruoan sekä sapon mukana tulleet glyserofosfolipidit. sPLA₂-IIA hajottaa bakteerien fosfolipidejä osallistuen siten immuunipuolustukseen. sPLA₂-V osallistuu sienten tuhoamiseen auttamalla makrofagien fagosytoosia, sPLA₂-III siittiöiden kehitykseen, ja sPLA₂-X siittiön pääsyyn munasolun sisään. sPLA₂-aktiivisuuden on osoitettu pahentavan tiettyjä keuhkosairauksia, kuten astmaa ja ARDS-oireyhtymää (acute respiratory distress syndrome) sekä ateroskleroosia. (14)

cPLA₂-perheeseen kuuluu kuusi Ca²⁺-riippuvaista entsyymiä, joilla on vaihtelevin määrin lysofosfolipaasi-, transasylaasi-, PLA₂- ja PLA₁-aktiivisuutta. Niille on yhteistä (cPLA₂γ:aa lukuun ottamatta) seriinin ja asparagiinihapon muodostama katalyyttinen pari sekä sen aktiivisuutta stabiloiva arginiini. (10,14,16) cPLA₂α on perheen tutkituin jäsen, eikä muiden perheen jäsenten funktioista juurikaan tiedetä. cPLA₂α:sta lisää alla.

iPLA₂-perheeseen kuuluu yhdeksän entsyymiä (PNPLA1-9), jotka toisin kuin sPLA₂t ja cPLA₂t, eivät tarvitse kalsiumia toimiakseen. Osa iPLA₂-perheen jäsenistä toimii lipaaseina fosfolipaasin sijaan. (10,14) iPLA₂γ osallistuu ilmeisesti kardioliipiinin homeostaasiin mitokondrioissa. (10,14) Sen puute aiheuttaa muutoksia hiirien metaboliassa, mistä seuraa kasvun, kylmänsietokyvyn ja fyysisen kestävyuden heikkenemistä. (10,14,17)

iPLA₂β:n on ehdotettu toimivan homeostaattisesti eli se hajottaa ylimäärin tuotettuja glyserofosfolipidejä. Se pitää myös solunsisäisen AA-tason matalana tarjoamalla asyyli transferaaseille lysoglyserofosfolipidejä vapaan AA:n liittämiseksi kalvoihin. Se vapauttaa lisäksi AA:n COX-reaktioihin käytettäväksi. (14,17,18)

iPLA₂β osallistuu luultavasti myös solun Ca²⁺-homeostasian ylläpitoon. Kalsiumtason ollessa korkea kalmoduliinin sitoutuminen inhiboi sitä, kun taas solunsisäisen kalsiumtason laskiessa kyseinen inhibitio poistuu (19). Aktivoitunut iPLA₂β tuottaa

lysofosfolipidejä, jotka avaavat solukalvossa olevat Ca^{2+} -kanavat. Sisään virtaava kalsium pystyy puolestaan aktivoimaan $\text{cPLA}_2\alpha$:n, joka vapauttaa AA:a (14). $\text{iPLA}_2\beta$:n indusoimaa kalsiumin sisäänvirtausta tarvitaan muun muassa insuliinin eritykseen sekä siittiöiden flagelloiden liikkeeseen. (14,17,18)

Endoplasmisen kalvon stressin on osoitettu aktivoivan $\text{iPLA}_2\beta$:n kaspasi-3:n katalysoiman pilkkomisen kautta. Katkaistu entsyymi on normaalipituista entsyymiä aktiivisempi. Sen tuottama lysofosfokoliini eritetään solunulkoiseen tilaan, missä se houkuttelee fagosytoivia soluja. Lisäksi tuotettu AA lisää mitokondrioiden kalvojen läpäisevyyttä, mikä johtaa lopulta sytokromi c:n vapautumiseen. AA voi myös aktivoida sfingomyelinaasin tuottamaan keramidia, joka pystyy indusoimaan ns. sisäisen apoptoosireitin. (20,21)

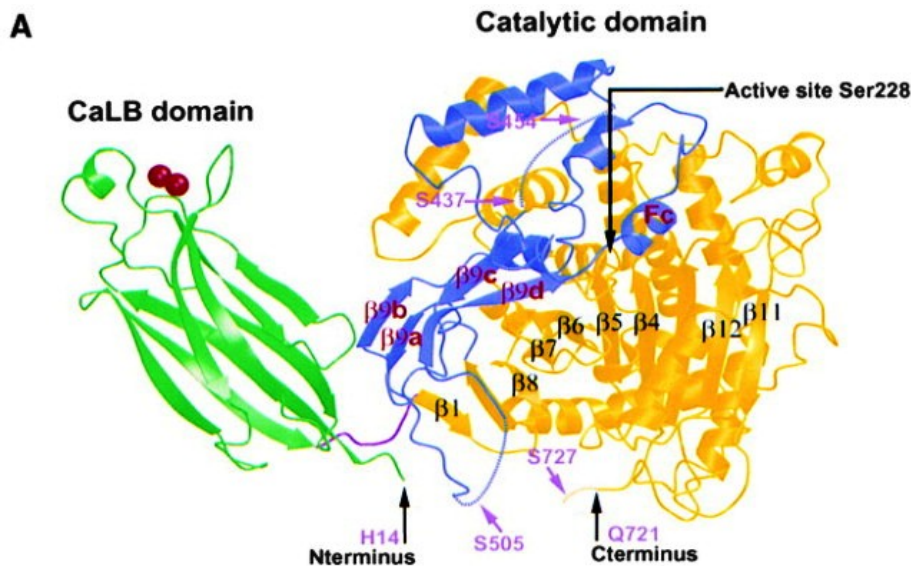
$\text{iPLA}_2\beta$:n deleetio aiheuttaa diabetesta ja hedelmättömyyttä hiiriuroksilla. (14,17,18) Ihmisellä $\text{iPLA}_2\beta$:n puute aivoissa on yhteydessä mm. Alzheimerin ja Parkinsonin tautiin sekä INAD:aan (infantiili neuroaksonaalinen dystrofia) ja NBIA:aan (aivojen rautakertymään liittyvä neurodegeneraatio). $\text{iPLA}_2\beta$:n puute johtaa neurodegeneraatioon vakuolien, raudan ja ubikitinoitujen proteiinien kertymisen seurauksena (14,17,22). $\text{iPLA}_2\beta$:n aivoja suojaava vaikutus perustuu ainakin osittain dokosaheksanoidihapon (DHA) vapauttamiseen. DHA vähentää oksidatiivista stressiä sekä NMPA-reseptorien (N-metyyli-D-aspartaatti-resptori) liiallisen stimulaation aiheuttamaa toksisuutta. (22)

2.4 $\text{cPLA}_2\alpha$

Rakenne, toiminta ja säätely

$\text{cPLA}_2\alpha$ on sytoplasminen PLA_2 , joka ilmentyy kaikissa ihmisen kudoksissa. Se on cPLA_2 -perheen tutkituin jäsen ja myös ainoa PLA_2 , jonka kolmiulotteinen rakenne on selvitetty. Lisäksi se on ainoa tunnettu PLA_2 , joka spesifisesti hydrolysoi glyserofosfolipidejä, jotka sisältävät AA:n sn2-asemassaan. Siksi se on tärkeä eikosanoidien synteesissä. (10,14-16,23-28) Ei kuitenkaan tiedetä, mistä entsyymien AA-spesifisyys johtuu. AA:n sisältävä glyserofosfolipidi voi sopia muita substraatteja paremmin aktiiviseen keskukseen tai se irtoaa helpommin solun kalvoista kuin muut glyserofosfolipidit (5,6).

cPLA₂α:n molekyylipaino on 85 kDa ja se koostuu N-terminaalisesta C2-domeenista sekä C-terminaalisesta katalyyttisestä domeenista (26) (Kuva 1). Domeenien välillä on joustava viiden aminohapon pituinen aminohappojakso (16). C2-domeeni koostuu kahdeksasta antiparalleelista β-laskoksesta ja niitä yhdistävistä luupeista (14,16,23). Kolme runsaasti aspartaattihappoa ja asparagiinia sisältävää kalsiumia sitovaa luuppia sitovat kaksi Ca²⁺-ionia, joita vaaditaan entsyymin toimintaan (16).



Kuva 1. cPLA₂α:n rakenne. Kuvassa on esitetty cPLA₂α:n kristallirakenne, jossa näkyvät α-heliksit, β-laskokset (β1, β4-8, β9a-d, β11-12) sekä toiminnan kannalta keskeiset aminohapot. Vasemmalla kuvassa on vihreällä merkitty kaksi Ca²⁺-ionia (punaisella) sitova C2-domeeni (CaLB domain). Oikealla on katalyyttinen domeeni (keltaisella). Aktiivisen keskuksen peittävä kansi on kuvassa väritetty siniseksi. C2-domeenin ja katalyyttisen domeenin välinen aminohappojakso on väritetty violetilla. Aktiivinen keskus ja siinä sijaitseva ser228 on merkitty nuolella (Active site Ser228). Fosforyloituvat ser454 (S454), ser505 (S505) ja ser727 (S727) sekä N-terminaalinen (H14 Nterminus) ja C-terminaalinen (Q721 Cterminus) pää on myös kuvattu. Selvyyden vuoksi kaikkia β-laskoksia ei ole merkitty kuvaan. (29)

Katalyyttinen domeeni käsittää 14 β-laskosta ja 13 α-heliksiä. Aktiivisen keskuksen muodostaa ser228/asp549-pari. cPLA₂α:n aktiivisuus perustuu nukleofiilisen ser228:n hyökkäykseen glyserofosfolipidien sn2-aseman esterisidokseen. Asp549 osallistuu aktiivisen keskuksen aktivointiin, ja myös arg200 on välttämätön entsyymin toiminnalle. Aktiivinen keskus sijaitsee hydrofobisten aminohappojen ympäröimän tunnelin pohjalla. Fosfolipidisubstraatti tulee tunneliin pääryhmä edellä. Tunnelia ympäröivät hydrofobiset aminohapot muodostavat hydrofobisia vuorovaikutuksia

substraatin rasvahappotähteiden kanssa stabiloiden näin substraatin sitoutumista entsyymiin. (14-16,23)

cPLA₂α:n kiinnittyminen kalvoon vaatii kahden Ca²⁺-ionin sitoutumisen C2-domeeniin (14-16,23). Riittävä soluliman Ca²⁺-taso voidaan saavuttaa lukuisten solunulkoisten signaalimolekyylien, kuten sytokiinien ja hormonien sitoutuessa reseptoreihinsa, jolloin Ca²⁺-ioneja sytoplasmaan vapauttavat signaalireitit aktivoituvat (23). Kalsiumin sitoutuminen neutraloi kalsiumluuppien negatiivisesti varautuneet aminohapot (asn, asp), jolloin C2-domeeni pääsee kiinnittymään kohdekalvon neutraaleihin PC-molekyyleihin. cPLA₂α kiinnittyy useimmiten ER-, Golgi- ja tumakalvoihin, koska niissä on enemmän PC:a kuin muissa kalvoissa. (14,16,23,30,31) Myös eikosanoideja tuottavat lipo-oksygenaasientsyymit (COX) sijaitsevat kyseisillä kalvoilla (23).

Kalsiumia sitova C2-domeeni on aluksi välttämätön cPLA₂α:n kalvoon sitoutumiselle mutta cPLA₂α pysyy kiinni kalvossa ja jatkaa hydrolyysiä, vaikka Ca²⁺-taso myöhemmin laskisi. (14,16,23,26) MAPK (mitogeeniaktivoituva proteiinikinaasi) fosforyloi domeenien välisessä jaksossa olevan ser505:n (14-16,23). Tämä aiheuttaa konformaation muutoksen, jolloin katalyyttisen domeenin hydrofobiset aminohapot pääsevät vuorovaikuttamaan kalvon neutraalien lipidien kanssa vahvistaen näin entsyymien sitoutumista kalvoon (14,16). p11-anneksiini/A2-kompleksi pystyy inhiboimaan cPLA₂α:n sitoutumista kalvoon sitoutumalla ser727-tähteeseen (14,23). MAPK:n aktivoimat kinaasit voivat estää p11-anneksiini/A2-kompleksin sitoutumisen fosforyloimalla ser727:n (14). Myös ser515:n fosforyloituminen CaMKII:n (Ca²⁺/kalmoduliini-riippuvainen proteiinikinaasi II) toimesta lisää cPLA₂α:n aktiivisuutta. Ser437 ja ser454 ovat muita fosforylaatiokohtia entsyymissä (32). Lisäksi eräs lipidi, eli keramidi-1-fosfaatti, vuorovaikuttaa C2-domeenin kationisten aminohappojen kanssa tehostaen cPLA₂α:n sitoutumista kohdekalvoon. (14-16,23,30,31) Myös vimentiniin sitoutumisen entsyymiin on osoitettu tehostavan sen toimintaa. (16,23)

cPLA₂α:n aktiivisen keskuksen tunnelin suulla on kansi (lid), joka pitää siirtää pois tieltä, jotta substraatti pääsee tunneliin (14-16,23). Entsyymien sitoutuessa kohdekalvoon kannen anionisten aminohappojen ja kalvon anionisten lipidien välinen hylkimisvoima siirtää kannen syrjään. Samalla kationisten lysiinien ryhmä lähellä aktiivista keskusta

sitoutuu kohdekalvon fosfatidyli-inositoli-4,5-bisfosfaattiin (PIP₂), mikä helpottaa entsyymien aktivoitumista ja sitoutumista. (14,16,23,30,31)

cPLA₂α:aa voidaan säädellä myös transkriptionaalisesti. Tietyt proinflammatoriset sytokiinit ja kasvutekijät lisäävät cPLA₂α:n ekspressiota. Glukokortikoideilla on päinvastainen vaikutus. Ekspression kasvu on yleensä yhteydessä lisääntyneeseen COX2-ekspression, mikä on loogista ottaen huomioon cPLA₂α:n keskeisen roolin eikosanoidituotannossa. (16)

Tehtävät

cPLA₂α:n päätehtävänä pidetään AA:n vapauttamista glyserofosfolipideistä (10,14-16,21,23-27). AA:sta voidaan tuottaa prostanoideja (prostaglandiinit ja tromboksaanit) COX-entsyymien avulla tai leukotrienejä 5-lipoksygenaasin avulla. Eikosanoidit (prostanoidit ja leukotrieenit) ovat keskeisiä tulehduksen välittäjäaineita. (33) Tästä syystä cPLA₂α liittyy useisiin tulehdussairauksiin. cPLA₂α:n katalysoimassa reaktiossa syntyy AA:n lisäksi lysofosfolipidejä, joista voidaan valmistaa PAF:iä, joka on myös keskeinen tulehdusvälittäjäaine (14,23,27).

cPLA₂α saattaa olla osallisena kalvojen glyserofosfolipidihomeostaasin ylläpidossa, koska sillä on myös korkea lysofosfolipaasiaktiivisuus PLA₂-aktiivisuuden lisäksi (10,26). Jos entsyymi todellakin osallistuu homeostaasiin, se edesauttaa todennäköisesti hajotusta hydrolysoimalla lysofosfolipidejä (10).

cPLA₂α:n C2-domeenin sitoutumisen kohdekalvoon on todettu aiheuttavan kalvon kaareutumista (30,31). Lisäksi hydrolyysin tuotteena syntyvät kartion muotoiset lysofosfolipidit voivat aiheuttaa kaareutumista (25,34). cPLA₂α:n aiheuttamaa kalvon kaareutumista vaaditaan cis- ja trans-Golgin väliseen proteiinien kuljetukseen. Kaareutuminen mahdollistaa kalvoyhteyden muodostumisen vierekkäisten cisternojen välille. cPLA₂α säätelee myös vesikkelien irtoamista trans-Golgista ja niiden kuljetusta solukalvolle. (14,25,30,31) Esimerkiksi endoteelisolujen välisten liitosten proteiinit kuljetetaan tätä reittiä pitkin. Endoteelisolujen väliset liitokset ovat tärkeitä angiogeneesille ja endoteelisolujen ja perisytyttien väliset liitokset veri-aivoesteen syntymiselle. (24,30) IgG:n (immunoglobuliini G) sitoutuminen fagosytoivien solujen

F_c-reseptoreihin aiheuttaa cPLA₂α:n aktivaation, jolloin se sitoutuu muodostuvan fagosomin pinnalle aiheuttaen sen kaareutumista. Tämä helpottaa fagosytoosia. cPLA₂α:n aiheuttama kalvojen taipuminen säätelee lisäksi endosomaalista vesikkeliliikennettä. (25,30,31)

cPLA₂α:n tuottaman AA:n on osoitettu osallistuvan hermosolujen kehittymiseen muun muassa säätelemällä dendriittien ja aksonien kasvua hermosolujen soomista. Hermosolujen kehitysvaiheessa cPLA₂α:n inhibitio on todettu neurotoksiseksi. cPLA₂α:n aktiivisuus on välttämätöntä myös muistitoiminnoille. (28) Entsyymien positiivinen vaikutus hermosolujen kehitykseen saattaa johtua sen osallistumisesta niiden solukalvojen ja tumakoteloitten juoksevuuden ja läpäisevyyden säätelyyn sekä tumahuokosten muodostumiseen. Tätä tukee se, että cPLA₂α:n puute aiheuttaa jäykkyyttä ja muita rakennemuutoksia erityisesti synapsikalvossa, mikä heikentää niiden toimintaa. Puutteeseen liittyy myös ribosomien kertyminen tumaan, mikä johtuu tumahuokosten määrän vähentymisestä. Tumahuokosia tarvitaan ribosomien kuljettamiseen ulos tumasta proteiinien translaatiota varten. Hermosoluissa proteiinisynteesi on runsasta. cPLA₂α:n toiminnasta aiheutuva taipuminen kalvossa helpottaa tumahuokosten muodostumista. (34)

Sairaudet

Koehiiret, joiden cPLA₂α:n geeni on sammutettu, kasvavat normaalisti. cPLA₂α:n AA:a vapauttavasta roolista johtuen niillä on selvästi alentunut eikosanoidituotanto, mistä aiheutuu lukuisia ongelmia (14,16,23,27). PGE₂ (prostaglandiini E₂) suojaa vatsan ja ohutsuolen epiteeliä vatsan suolahapolta (33). PGE₂:n puutteesta johtuen koehiirillä esiintyy vatsahaavoja ja haavaumia ohutsuolessa (14,16,23,25). Tromboksaanit aiheuttavat verihiutaleiden aggregaatiota, mikä on välttämätöntä verenvuodon tyrehtymiselle (33). Tromboksaanin puutteesta johtuen hiirillä on pidentyneet verenvuotoajat (14). Prostaglandiineilla on myös suuri merkitys hedelmöityksessä, alkion implantaatiossa sekä synnytyksessä (33). Nämä kaikki ovat heikentyneet hiirillä, joilta cPLA₂α puuttuu (14,16,23,27).

PGE₂ on välttämätöntä osteoklastien luunhajotukselle, sillä se on selvästi vähentynyt cPLA₂α:n puuttuessa (14). Puute aiheuttaa myös akvaporiini-1:n alentuneen ekspression

munuaisten proksimaalisissa tubuluksissa, mistä seuraa munuaisten väkevoityminen (14,16,23,27). cPLA₂α:n on todettu myös hillitsevän poikkijuovaisen lihaksen kasvua. Siksi sen puuttuminen johtaa sydämen hypertrofiaan. (14,16,27) cPLA₂α:n puutteen on osoitettu myös pahentavan ensimmäisen tyypin diabetes mellitusta sekä muita autoimmuunisairauksia (14,16,23,27).

Koska eikosanoidit ovat keskeisiä välittäjäaineita tulehduksessa, cPLA₂α edesauttaa useita tulehduksellisia sairauksia, joita ovat muun muassa allergiset reaktiot, ARDS-oireyhtymä, keuhkofibroosi, nivelreuma ja multipeliskleroosi (14,16,23,27). Leukotrieenit aiheuttavat keuhkoputkissa sileiden lihasten supistumista, mikä ahtauttaa hengitysteitä ja siten vaikeuttaa hengittämistä. cPLA₂α-puutoksen onkin todettu lieventävän muun muassa astmaa, keuhkofibroosia ja anafylaktista sokkia. (14,23)

cPLA₂α on yhdistetty myös useisiin syöpiin. Moniin syöpiin liittyy korkea PGE₂-taso, joka auttaa muun muassa syöpäkudoksen lisääntymistä ja angiogeneesiä (24,27). Ainakin keuhko-, sappitiehyt-, eturauhas-, haima-, ruokatorvi- ja ohutsuolisyövässä on havaittu cPLA₂α:n hyperaktiivisuutta, mikä johtaa lisääntyneeseen PGE₂-tuotantoon (14,16,27). cPLA₂α:n kohonnut ekspressio on yleensä yhteydessä COX-2:n lisääntyneeseen ekspressioon. cPLA₂α:n yliekspressiota aiheuttavat mm. onkogeeni Ras sekä TGF-β (tumor growth factor β). (27)

Yllättäen paksusuolen syövässä on havaittu alhainen cPLA₂α-taso, mikä on näennäisesti ristiriidassa edellä kuvattuihin syöpiin. (14,16,27) COX-2-ekspressio oli kuitenkin korkea tässä syövässä (27). Tämä voidaan selittää AA:n apoptoottisten vaikutusten vähenemisenä, mikä edistää syöpäsolujen selviytymistä (14,16,27). AA on välttämätön sytotoksisen TNF-α:n (tuumorinekroositekijä α) toiminnan kannalta (27). Sen on myös todettu vaikuttavan mitokondriokalvojen läpäisevyyteen, mikä johtaa sytokromi c:n vapautumiseen ja apoptoosiin (27,35,36). AA lisää myös apoptoottisen keramidin tasoa (16,27). cPLA₂α:n rooli eri syövässä on siis erilainen. Se voi olla hyperaktiivinen ja tuottaa runsaasti AA:a PGE₂-tuotantoa varten. Vaihtoehtoisesti sen matala aktiivisuus yhdistettynä korkeaan COX-2-aktiivisuuteen johtaa matalaan solunsisäiseen AA-tasoon, mikä vähentää AA:n apoptoottista vaikutusta.

cPLA₂ on keskeinen tekijä neurodegeneraatiossa, jota esiintyy mm. Parkinsonin ja Alzheimerin taudissa sekä trauman aiheuttaman selkäydinvaurion jälkeen (14,16,28,35-38). Selkäydinvaurion seurauksena lisääntyneet vapaat radikaalit, inflammatoriset

sytokiinit ja eksitatoriset aminohapot voivat aktivoida cPLA₂:n NMDA-reseptorin kautta, jolloin se alkaa hajottaa hermosolujen kalvorakenteita sekä tuottaa AA:a ja muita vapaita rasvahappoja sekä lysofosfolipidejä. Liiallinen kalvojen glyserofosfolipidien hajotus heikentää kalvojen eheyttä ja toimintoja, mikä johtaa hermosolujen toiminnan häiriintymiseen. (36) Vapaat rasvahapot voivat myös aktivoida NADPH-oksidaasin (nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaattioksidaasi), joka tuottaa soluille vahingollisia reaktiivisia happiradikaaleja (ROS) (35,36). Mitokondrioiden kalvojen vahingoittuminen lisää ROS-tuotantoa ja johtaa sytokromi c:n vapautumiseen ja apoptoosiin (35). Lisäksi vapaasta AA:sta valmistetaan eikosanoideja, jotka lisäävät tulehdusta, mikä edesauttaa neurodegeneraatiota. Väärin säädeltyinä Cdk25/p25:n on osoitettu aktivoivan cPLA₂:n, joka hajottaa PC:a lysofosfatidyylifokoliiniksi. Tämä indusoi gliasoluja tuottamaan inflammatorisia sytokiinejä, jotka lisäävät tulehdusta entisestään (38).

Kohonneen cPLA₂-aktiivisuuden aiheuttama neurodegeneraatio on yhdistetty myös Alzheimerin tautiin. Taudille on tyypillistä neurotoksisten oligomeeristen beeta-amyloidien (A β) muodostamat plakit aivoissa. Lisäksi aivoissa on hyperfosforyloiduista tau-proteiineista muodostuneita aggregaatteja. cPLA₂:n aiheuttama liiallinen glyserofosfolipidihajotus voi paljastaa kalvoihin sitoutuneet amyloidiesiasteproteiinit, jolloin ne voivat joutua poikkeavasti käsittelyyn, jonka seurauksena niistä syntyy haitallisia ns. A β -peptidejä (37). Lisäksi vioittuneet kalvot haittaavat muodostuneiden peptidien eksosytoosia, mikä johtaa niiden kertymiseen soluihin. Koska kyseiset peptidit ovat neurotoksisia, niiden kertyminen johtaa lopulta hermosolujen apoptoosiin. (28,38) Ekstrasellulaaritilaan eritetyt A β -peptidit voivat sitoutua NMDA-reseptoriin, mikä aiheuttaa edellä kuvattujen reittien kautta hermosolujen kuoleman (35). Alzheimerin taudissa cPLA₂:n aiheuttama tulehdustila voi mahdollisesti myötävaikuttaa tau- ja A β -aggregaattien muodostumiseen, mikä lisää edelleen neurodegeneraatiota (38).

cPLA₂α-His10-vektori. Vektorin BstBI-KpnI-fragmentti korvattiin yhteen liitetyillä (annealed) oligonukleotideilla, joiden sekvenssit olivat 5'- CGAATGGAG-CCACCCGCAGTTCGAGAAAGGAGGAGGAAGCGGAG GAGGAAGCGGAGGAGGAAGCTGGAGCCACCCGCAGTTTGAAAAATAGGTA C -3' ja 5'- CTATTTTTCAAACCTGCGGGTGGCTCCAGCTTCCTCCTCCGCTTCCTCCTCCGC TTCCTCT CCTTTCTCGAACTGCGGGTGGCTCCATT -3', jolloin saatiin pFB1-cPLA₂α-StrepIII-vektori. Lopullisen vektorin nukleotidijärjestys varmistettiin sekvensoimalla. Bakulovirusekspressiomenetelmää (Bac-to-Bac baculoviral expression system; Gibco Life Technologies) käytettiin basmidien valmistamiseen ja FuGENE®6-reagenssin (Promega) avulla tapahtuneeseen Sf9-solujen transfektioon rekombinoitujen bakulovirusten tuottamiseen.

cPLA₂α-StrepIII-proteiinin ekspressoimiseksi Sf9-soluviljelmä (500 ml, 10⁶ solua/ml) infektoitiin rekombinoidulla bakuloviruksella. Inkubaation (72 h, 27 °C:ssa) jälkeen solut erotettiin elatusaineesta sentrifugoimalla ja pestiin PBS-liuoksella. Tämän jälkeen solut säilytettiin glyseroli-PBS-liuoksessa (1:1) -80 °C:ssa.

3.3 cPLA₂α:n eristys

Pakastetut solut suspendoitiin 50 ml:aan lyysispuskuriä (puskuri A: 20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,5 % NP-40; 5 % glyseroli; pH 8,0), minkä jälkeen niitä pidettiin 0 °C:ssa 30 min. Seuraavaksi lisättiin proteaasi-inhibiittoriseos. Solususpensiosta otettiin näyte immuno-elektroforeesia varten cPLA₂α:n ekspressiotason arvioimiseksi.

Solut hajotettiin käsittelemällä ne ultraäänellä (6 x 1 min) 40 %:n teholla jokaista 50 millilitran Falcon®-putkea kohden. Jokaisen käsittelyn jälkeen pidettiin 30 s tauko ehkäisemään solususpension lämpenemistä. Tämän jälkeen seosta sentrifugoitiin (50000 g, 1 h) liukoisten proteiinien ja kalvojen erottamiseksi. Liukoinen osa otettiin talteen ja yhdistettiin puskurilla A pestyyn Strep-Tactin-hartsiin. cPLA₂α-StrepIII sitoutuu hartsiin, ja tämän tehostamiseksi suspensiota sekoitettiin 3 h 4 °C:ssa.

Seuraavassa vaiheessa suspensio siirrettiin Poly-Prep-kolonneihin (Bio-Rad). Eluentista otettiin talteen 1 ml jatkotutkimuksia varten. Seuraavaksi kolonni pestiin (5 x 1 ml)

eluutiopuskurilla (puskuri B: 20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 2,5 mM desthiobiotiini; 5 % glyseroli; pH 8,0), jonka sisältämä desthiobiotiini kilpailee StrepIII:n kanssa hartsin sitoutumisesta. Eluentit otettiin talteen ja säilytettiin -80 °C:ssa 60 % glyserolissa jatkotutkimuksia varten.

3.4 SDS-elektroforeesi ja immunovärjäys

Puhdistusfraktioiden proteiinkonsentraatio määrittäminen tehtiin Lowryn menetelmällä (41) ja cPLA₂α-ekspressio määritettiin värjäämällä 10 %:set SDS-polyakryyliamidigeelit Coomassie-sinisellä (42) ja immunovärjäyksellä (43). Proteiinit siirrettiin PVDF-kalvolle, joka käsiteltiin ensin hiiren anti- cPLA₂α-vasta-aineella (1:500) ja sitten vuohen anti-mouse-HRP-konjugaattivasta-aineella. Proteiinistandardien tunnistamiseksi käytettiin Strep-Tactin-HRP-konjugaattia (1:10 000). Värjätyt geelit/kalvot skannattiin Starionin FLA 9000-skannerilla ja visualisoitiin Image Reader FLA-9000-ohjelman avulla.

3.5 cPLA₂α:n aktiivisuuden määrittäminen

Immunovärjäyksen perusteella eniten cPLA₂α:aa sisältäneestä fraktiosta määritettiin koentsyymin aktiivisuus käyttäen misellejä makrosustraattina. Misellien valmistamiseksi sekoitettiin kloroformiin radioaktiivista (10000 cpm) 1-palmitoyyli-2-arakidonyyli-[1-¹⁴C]-PC:a sekä leimaamattomia 16:0/18:1-PC:a (250 nmol) ja 16:0/18:1-PA:a (25 nmol). Seuraavaksi kloroformi haihdutettiin typpikaasulla ja sen jälkeen näytettä pidettiin vakuuissa tunnin ajan. Tämän jälkeen kuivatut lipidit dispergoitiin 0,5 ml:aan puskuria C (50 mM Na₂PO₄; 1 mM Ca₂; 0,5 % Triton X-100; pH 7,4) vorteksoimalla (2 x 2 min).

Muodostuneeseen misellidispersioon lisättiin cPLA₂α:aa ja seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 30 min. Seoksesta otettiin näytteitä (50 µl) tietyin väliajoin, ja näytteisiin lisättiin 2 ml metanolia reaktion lopettamiseksi. Tämän jälkeen lipidit eristettiin Folchin menetelmällä (44). Eristyksen jälkeen lipidit erotettiin ohutkerroskromatografiaa käyttäen. Liikkuvana faasina käytettiin heksaania, etyylietteriä ja etikkahappoa suhteessa 70:30:1. Reaktiossa muodostuneet radioaktiiviset lysofosfokoliini ja

arakidonihappo detektoitiin Starionin FLA 9000-skannerilla, visualisoitiin Image Reader FLA-9000-ohjelmalla ja kvantifioitiin Multigauge-analyysiohjelmalla.

3.6 cPLA₂α:n substraattispesifisyyden määrittäminen

Immunovärjäyksen ja aktiivisuustestin perusteella eniten cPLA₂α:aa sisältäviä fraktiota käytettiin sen substraattispesifisyyden määrittämiseen. Erilaisia synteettisiä glyserofosfolipidiseoksia (PC-sekoitus, 16:0/C_n-PC:t ja C_n/16:0-PC:t tai polaaristen pääryhmien sekoitus), 16:0/18:1-PA, 21:0-SM (sis. standardi), sekä cPLA₂α:n kiinnittymistä syntyviin kalvoihin helpottamaan tarvittu PIP₃ sekoitettiin kloroformiin. Glyserofosfolipidien ja PA:n suhde seoksissa oli 9:1. SM:n osuus oli 5 % ja PIP:n 1 % seoksesta. Liuottimen poiston jälkeen (ks. yllä) butyloitua hydroksitolueeniä (1 mol %, antioksidantti) lisättiin, jos seos sisälsi tyydyttymättömiä glyserofosfolipidejä.

Pienten unilamellaaristen vesikkelien valmistamiseksi kuivatut lipidit liuotettiin etanoliin (20 µl) ja injektoidiin 0,5 ml:aan puskuria D (50 mM Na₂PO₄; 1 mM Ca₂; pH 7,4). Vesikkeleitä inkuboitiin cPLA₂α:n kanssa 37 °C:ssa. Tietyillä ajanhetkillä seoksesta otettiin näytteitä (50 µl), jotka sekoitettiin metanoliin (2 ml) reaktion lopettamiseksi. Seuraavaksi seokseen lisättiin 0,8 ml vettä ja 4 ml kloroformia ja se vorteksoitiin ja sentrifugoitiin. Yläfaasi imettiin pois, alafaasi pestiin Folchin teoreettisella yläfaasilla (44), seos sentrifugoitiin uudestaan ja yläfaasi poistettiin. Tämä toistettiin kolme kertaa, minkä jälkeen lipidit sisältävä alafaasi kuivattiin typpikaasulla. Lipidit liuotettiin lopuksi kloroformiin ja metanoliin suhteessa 1:2 ja niitä säilytettiin -20 °C:ssa massaspektrometrianalyysiä varten. Tutkittaessa hydrolyysiä miselleissä lipidit kuivattiin, kuten edellä kuvattiin ja ne liuotettiin puskuriin C. Hydrolyysi määritettiin, kuten edellä.

Massaspektrometrissa analyysiä varten lipidiliuokseen lisättiin 25 %:sta NH₄OH:ia siten, että NH₄OH:n loppukonsentraatioksi tuli 4 %. Tämän jälkeen näyte infusoidiin (6 µl/min) Micromass Quattro Micro kolmoiskuadropolimassaspektrometriin, jota operoitiin, kuten aiemmin (5). Glyserofosfolipidit detektoitiin käyttäen polaarille pääryhmille spesifisiä prekursori- tai neutral loss-skannauksia (45). Saatu spektri siirrettiin Microsoftin Excel-ohjelmaan ja yksittäiset glyserofosfolipidimolekyylit kvantifioitiin käyttämällä LIMSA-ohjelmistoa (46). Suhteelliset hydrolyysinopeusvakiot saatiin sovittamalla ensimmäisen asteen eksponentiaaliyhtälö

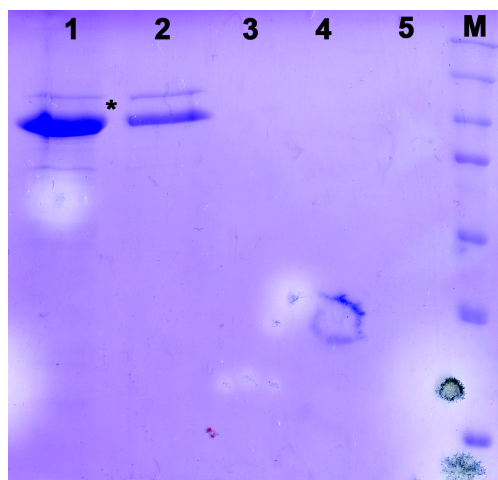
konsentraatio vs. aika-kuvaajaan. Maksimaaliseksi hydrolysoituvaksi osuudeksi hetkellä t_{∞} asetettiin miselleissä 1 ja pienissä unilamellaarisissa vesikkeleissä 0,67 (5).

Tutkittaessa glyserofosfolipidiluokkien hydrolyysiä (polaarisen pääryhmän vaikutusta) unilamellaarisissa vesikkeleissä käytettiin nestekromatografiamassaspektrometriaa (LC-MS). Glyserofosfolipidit erotettiin Waters ACQUITY BEH C₁₈-kolonnilla (1,0 x 100 mm). Pylväseluentti johdettiin ACQUITY LC-laitteistoon ja ne detektoitiin käyttäen selektiivistä monitorointia. Kunkin glyserofosfolipidin määrä määritettiin kromatogrammista käyttäen QuanLynx-ohjelmistoa (Waters). (47)

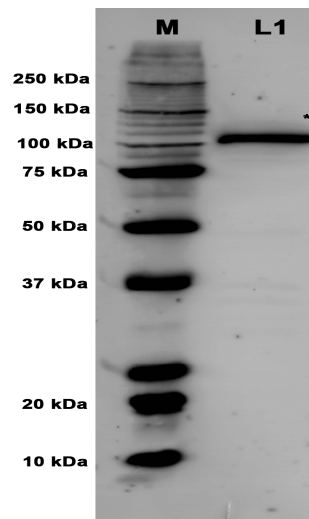
4 Tulokset

4.1 cPLA₂α-StrepIII:n puhdistus

Sf9-soluissa tuotetun cPLA₂α:n puhtausaste määritettiin käyttäen SDS-elektroforeesia. cPLA₂α:aa sisältävät affiniteettikromatografiasta saadut fraktiot erotettiin värjäämällä elektroforeesissa ajetut geelit Coomassie-sinisellä (kuva 2). Värjäyksessä havaittujen juovien varmistettiin vastaavan cPLA₂α:aa värjäämällä PVDF-kalvot anti-cPLA₂α-vasta-aineella (kuva 3).

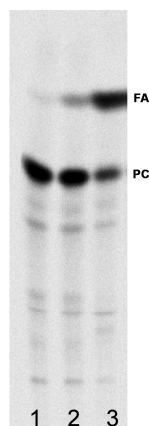


Kuva 2. cPLA₂α-StrepIII:n eluutio affiniteettikolonnista. *Affiniteettikromatografiasta saadut fraktiot (1-5) erotettiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla, minkä jälkeen geeli värjättiin Coomassie-sinisellä. Tähdellä on merkitty cPLA₂α-StrepIII:a vastaavat juovat. Substraattispesifisyyskokeissa käytettiin eluutiofraktioita yksi ja kaksi. M-sarakkeessa on molekyylipainomarkkerit, joiden molekyylipainot on esitetty kuvassa 3.*



Kuva 3. Anti- cPLA₂α-vasta-ainevärjäys. Jotta pystyttiin varmistumaan siitä, että Coomassie-sininen-värjäyksessä (ks. kuva 2) havaitut proteiinijuovat vastasivat cPLA₂α:a, värjättiin kalvo anti-cPLA₂α-vasta-aineella. Kuvassa on merkitty tähdellä sarakeessa "L1" cPLA₂α:a sisältävä juoste, jonka molekyylipaino on yhdessä StrepIII-affiniteettitaran kanssa noin 120 kDa. Molekyylipainomarkkerit on esitetty sarakeessa 'M'.

Puhdistetun cPLA₂α:n aktiivisuus määritettiin ohutkerroskromatografiolla antamalla entsyymien reagoida radioaktiivisesti merkityn PC:n kanssa (kuva 4). Kuvasta on havaittavissa, että PC:n hydrolyysin määrä oli suoraan verrannollinen lisätyn entsyymien määrään, koska hydrolysoituneen rasvahapon (FA) määrä on lähes olematon sarakeessa 1, pieni sarakeessa 2 ja suuri sarakeessa 3. Koska hydrolyysi oli selvästi suurempaa, mitä enemmän entsyymiä lisättiin, koe osoitti entsyymien olevan aktiivinen.



Kuva 4. cPLA₂α:n aktiivisuuden määrittäminen. cPLA₂α:n annettiin reagoida L-α-1-palmitoyyli-2-arakidonoyyli-[1-¹⁴C]-PC:n kanssa miselleissä. Sarakeessa 1 on kontrollinäyte, johon ei lisätty entsyymiä. Sarakeeseen 2 lisättiin 2,5 μg ja sarakeeseen 3 25 μg entsyymiä (FA = rasvahappo; PC = fosfatidyylikoliini).

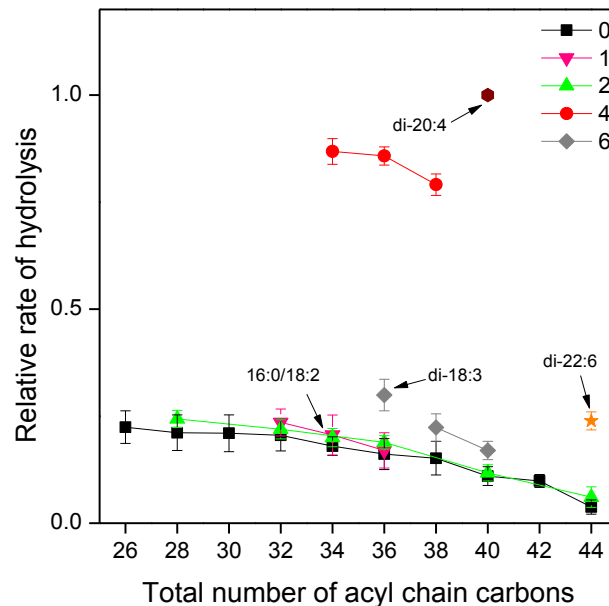
4.2 PC-seoksen hydrolyysi miselleissä

cPLA₂α:n substraattispesifisyyden määrittämiseksi tehtiin menetelmissä kuvatulla tavalla kuusi eri massaspektrometriaan perustuvaa koetta, joita jokaista toistettiin useamman kerran. Näillä kokeilla haluttiin selvittää, miten glyserofosfolipidien asyyliketjut ja polaarinen pääryhmä vaikuttavat cPLA₂α:n aktiivisuuteen. Massaspektrometrin käyttö mahdollisti useiden eri glyserofosfolipidien hydrolyysin määrittämisen samanaikaisesti. Kaikissa kokeissa käytettiin 21:0-SM:ä hydrolysoitumattomana sisäisenä standardina sekä PIP₃:a, joka lisää entsyymin sitoutumista makrosubstraattiin.

Ensimmäiseksi tutkimme glyserofosfolipidien asyyliketjun pituuden ja tyydyttyneisyysasteen vaikutusta fosfatidyylikoliinien hydrolyysiin miselleissä. Seoksessa oli yhteensä 27 eri PC-molekyylä, joista kymmenen oli saturoitunutta (26:0, 28:0, 30:0, 32:0, 34:0, 36:0, 38:0, 40:0, 42:0 ja 44:0), kolme yhden kaksoissidoksen sisältävää (32:1, 34:1 ja 36:1), kuusi kaksi kaksoissidosta sisältävää (28:2, 32:2, 34:2, 36:2, 40:2 ja 44:2), kolme neljä kaksoissidosta sisältävää (34:4, 36:4 ja 38:4), kolme kuusi kaksoissidosta sisältävää (36:6, 38:6 ja 40:6), yksi kahdeksan kaksoissidosta sisältävä (40:8) sekä yksi 12 kaksoissidosta sisältävä (44:12).

Tulokset käyvät ilmi kuvasta 5. Tyydyttyneiden glyserofosfolipidien hydrolyysi oli varsin vähäistä ja se väheni asyyliketjujen pidentyessä. Esimerkiksi 26:0-PC:n normalisoitu hydrolyysiaste oli 22,4 % ja 44:0-PC:n vain 3,8 %. Yhden tai kaksi kaksoissidosta sisältävien PC:n osalta hydrolyysi ei ollut merkityksellisesti tyydyttyneitä suurempaa ja niidenkin hydrolyysi pieneni asyyliketjujen pidentyessä. Kuusi kaksoissidosta sisältävien hydrolyysi oli hieman tehokkaampaa. Esimerkiksi 36:6-PC:n hydrolyysiaste oli 29,9 %, kun 36:2-PC:n hydrolyysiaste oli 18,9 %. Hydrolyysin aste laski tässäkin tapauksessa asyyliketjujen pidentyessä.

Arakidonihappoa sn-2-asemassaan sisältävien (neljä kaksoissidosta) hydrolyysi oli huomattavan nopeaa. Lyhyimmän eli 34:4-PC:n normalisoitu hydrolyysiaste oli 86,8 %. Tämä oli 4,8 kertaa suurempi kuin 34:0-PC:n tapauksessa. Hydrolyysi laski näidenkin PC:n osalta asyyliketjun pituuden kasvaessa. Parhaiten hydrolysoitui kaksi arakidonihappoa sisältävä 40:8-PC. Sen hydrolyysiaste oli 26,5 kertaa korkeampi kuin 44:00-PC:n.

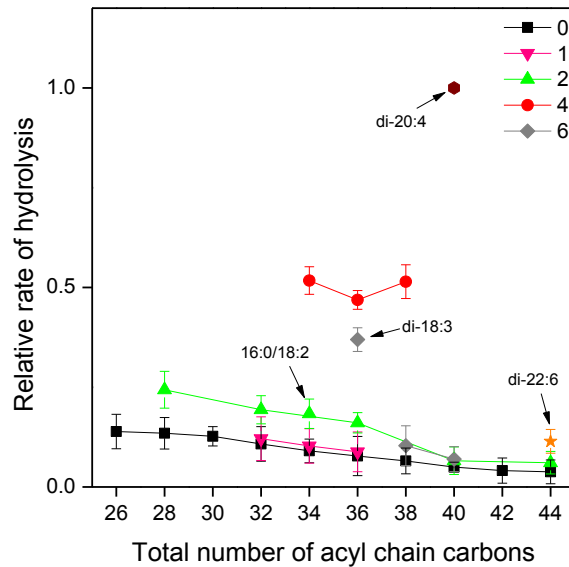


Kuva 5. Tyydyttyneiden ja tyydyttymättömien fosfatidyylikoliinien (PC) hydrolyysi miselleissä. PC-seos, PIP_3 ja 21:0-SM sekoitettiin (suhteessa 250/25/25) nmol 0,5 ml:aan puskuria C. Seokseen lisättiin 12 μ g cPLA₂a lisättiin seokseen ja sitä inkuboitii 30 min 37 °C:ssa. 50 μ l näytteitä otettiin seoksesta tietyin väliajoin ja yhdistettiin 2 ml:aan metanolia reaktion lopettamiseksi. Suhteelliset hydrolyysimäärät määritettiin, kuten menetelmissä on kuvattu. Y-akselilla on kuvattu normalisoitu hydrolyysiaste. X-akselilla on asyyliketjujen hiilten kokonaisuus. Kaksoissidosten lukumäärä on ilmaistu eri väreillä ja numeroilla oikeassa yläkulmassa. Tulos on viiden kokeen keskiarvo.

4.3 PC-seoksen hydrolyysi vesikkeleissä

Seuraavassa kokeessa tutkittiin PC:n asyyliketjun pituuden ja tyydyttyneisyysasteen vaikutusta hydrolyysiin pienissä unilamellaarisissa vesikkeleissä. Käytetyt lipidit olivat samoja kuin ensimmäisessä kokeessa. Kokeen tulokset käyvät ilmi kuvasta 6.

Arakidonihappoa sn2-asemassaan sisältävien hydrolyysi oli huomattavasti suurempaa kuin tyydyttyneiden tai kaksi kaksoissidosta sisältävien glyserofosfolipidien. Niiden hydrolyysi oli kuitenkin hieman vähäisempää kuin miselleissä. Esimerkiksi 34:4-PC:n suhteellinen hydrolyysiaste vesikkeleissä oli 51,7 %. Niiden osalta asyyliketjun pituudella ei ollut havaittavissa olevaa vaikutusta. Poiketen miselleistä 36:6-PC:n (di-18:3-PC) hydrolyysiaste oli lähes samaa tasoa arakidonihappoa sisältävien fosfolipidien kanssa. Sen hydrolyysiaste oli 36,9 %. Pidempien kuusi kaksoissidosta sisältävien PC:n hydrolyysi oli hieman vähäisempää. Kuten miselleissä, 40:8-PC parhaiten. Sen hydrolyysi oli 26,5 kertaa suurempaa kuin vähiten hydrolysoituneen 44:0-PC:n. 44:12-PC:n hydrolyysi oli matalampi kuin miselleissä eli 11,4 %.



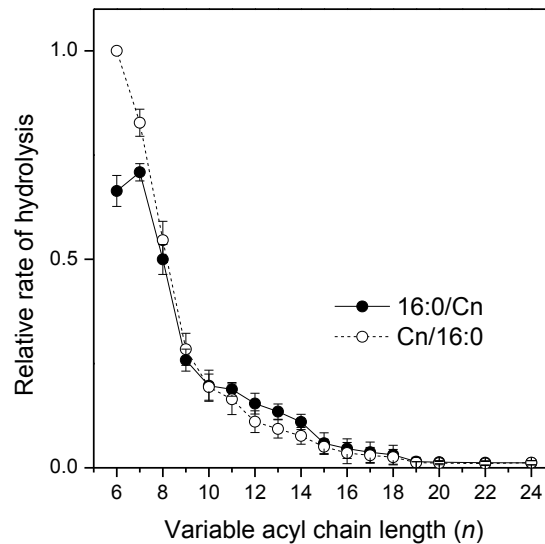
Kuva 6. Tyydyttyneiden ja tyydyttymättömien fosfatidyylikoliinien (PC) hydrolyysi pienissä unilamellaarisissa vesikkeleissä. PC-seos, PIP_3 ja 21:0-SM sekoitettiin (suhteessa 250/25/25) nmol 0,5 ml:aan puskuria D. 15 μ g cPLA $_2\alpha$:a lisättiin seokseen ja sitä inkuboitiin 30 min 37 °C:ssa. 50 μ l näytteitä otettiin seoksesta tietyin väliajoin ja yhdistettiin 2 ml:aan metanolia reaktion lopettamiseksi. Suhteelliset hydrolyysimäärät määritettiin, kuten menetelmissä on kuvattu. Y-akselilla on kuvattu normalisoitu hydrolyysiaste. X-akselilla on asyyliketjujen hiilten kokonaismäärä. Kaksoissidosten lukumäärä on ilmaistu eri väreillä ja numeroilla oikeassa yläkulmassa. Tulos on kuuden kokeen keskiarvo.

4.4 16:0/C_n- ja C_n/16:0-PC:n hydrolyysi vesikkeleissä

Seuraavaksi tutkimme, miten sn1- tai sn2-asemassa olevan asyyliketjun pituus vaikuttaa hydrolyysiin vesikkeleissä. Tätä varten laboratorioissa oli valmistettu seos, jossa oli 17 tyydyttynyttä PC-molekyyliä, joissa sn1-asemassa oli 16:0 ja sn2-ketjun hiilimäärä vaihteli välillä 6-24 (16:0/C₆₋₂₄-PC). Seokseen oli sisällytetty myös vastaavat D₉-merkityt PC:t, jotka olivat edellisten positionaalisia isomeerejä (C₆₋₂₄/16:0-PC). Tämä mahdollisti keskenään positionaalisten isomeerien hydrolyysin erojen samanaikaisen tarkastelun.

Tulokset näkyvät kuvassa 7. Molemmilla isomeerisarjoilla hydrolyysiaste laski asyyliketjun pidentyessä välillä n = 7-24. Lasku oli voimakkainta välillä n = 7-10, jonka jälkeen se tasoittui. Välillä n = 8-24 käyrien välillä ei juuri ollut eroa lukuun ottamatta väliä n = 11-14, jossa sn2-aseman hydrolyysi oli hieman nopeampaa. Kun n = 6-8, sn1-aseman hydrolyysi oli nopeampaa. 6:0/16:0-PC hydrolysoitui parhaiten, mikä oli selvä ero 16:0/6:0-PC:iin, jonka hydrolyysi oli vain 66,4 %. Käyrät poikkeavat myös siinä,

että 16:0/7:0-PC:n hydrolyysi oli nopeampaa kuin 16:0/6:0-PC:n, kun taas 7:0/16:0-PC:n hydrolyysi oli pienempi kuin 6:0/16:0-PC:n. Parhaiten hydrolysoituneen 6:0/16:0-PC:n hydrolyysi oli 83 kertaa suurempaa kuin vähiten hydrolysoituneen 16:0/24:0-PC:n.

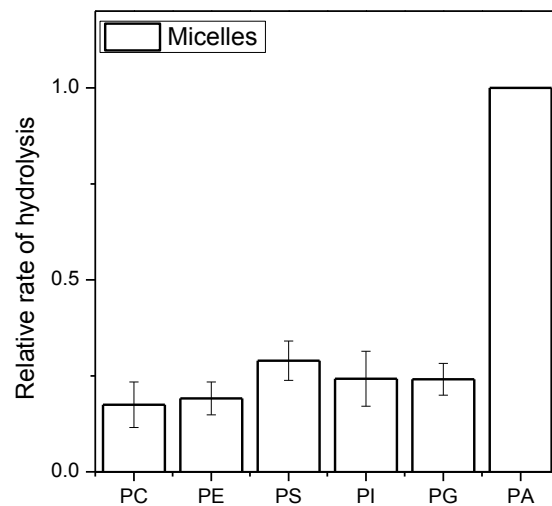


Kuva 7. PC:n sn1- vs. sn2-ketjun piteuden vaikutus hydrolyysiin vesikkeleissä. *X-akseli kuvaa vaihtelevan asyyliketjun pituutta ja y-akseli normalisoitua hydrolyysiastetta. C_n/16:0-glyserofosfolipidit olivat D₉-leimattuja. Koe tehtiin, kuten menetelmissä on kuvattu. Entsyymimäärä oli 22 µg. Tulos on viiden kokeen keskiarvo.*

PC:n sn1- ja sn2-ketjujen piteuden vaikutusta tutkittiin edellä kuvatulla tavalla myös miselleissä. Huolimatta siitä, että koe toistettiin neljä kertaa ja entsyymimäärää nostettiin, ei hydrolyysiä juurikaan havaittu.

4.5 Polaarisen pääryhmän vaikutus hydrolyysin miselleissä

Seuraavaksi tutkimme, miten glyserofosfolipidien polaariset pääryhmät vaikuttavat cPLA₂α:n välittämään hydrolyysiin miselleissä. Kokeessa käytettiin seosta, joka koostui yhtä suuresta määrästä 18:1/18:1-PC:a, -PE:a, -PS:ä, -PI:a, -PG:a ja -PA:a. Kuten kuvassa 8 käy ilmi, PA hydrolysoitui parhaiten. Muiden lipidien hydrolyysi oli huomattavasti vähäisempää eikä siinä ollut juurikaan eroa.

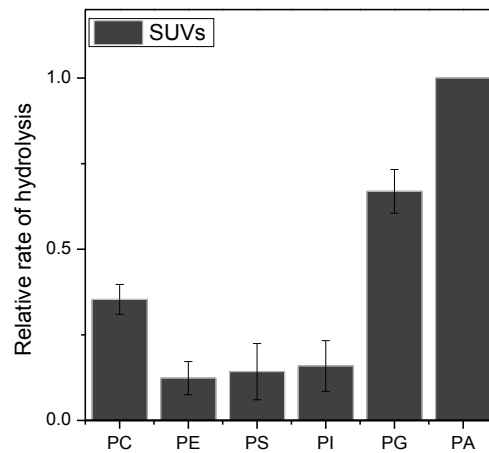


Kuva 8. Polaaristen pääryhmien vaikutus hydrolyysiin miselleissä. Yhtä suuret määrät 18:1/18:1-PC:a, -PE:a, -PS:ä, -PI:a, -PG:a ja PA:a sekä PIP₃ ja 21:0-SM sekoitettiin (suhteessa 250/25/25) nmol 0,5 ml:aan puskuria C. 20 µg cPLA₂α:a lisättiin seokseen ja inkuboitiin 30 min 37 °C:ssa. 50 µl näytteitä otettiin seoksesta tietyin väliajoin ja yhdistettiin 2 ml:aan metanolia reaktion lopettamiseksi. Suhteelliset hydrolyysimäärät määritettiin, kuten menetelmissä on kuvattu. Y-akselilla on kuvattu normalisoitu hydrolyysiaste. X-akselilla on ilmaistu polaariset pääryhmät. Tulos on viiden kokeen keskiarvo.

4.6 Polaarisen pääryhmän vaikutus hydrolyysiin vesikkeleissä

Lopuksi tutkimme, miten glyserofosfolipidin polaarinen pääryhmä vaikuttaa cPLA₂α:n välittämään hydrolyysiin vesikkeleissä. Luonnollisen kaksoiskalvon lipidikoostumuksen simuloimista varten PC:a oli 50 %, PE:a 20 % ja PS:ä, PI:a, PG:a ja PA:a jokaista 7,5 % glyserofosfolipidien kokonaismäärän ollessa 250 nmol.

Tulokset on esitetty kuvassa 9. Kuten miselleissäkin, PA hydrolysoitui parhaiten mutta miselleistä poiketen muiden lipidien välillä ilmeni selviä eroja. PG:n hydrolyysi oli huomattavasti suurempaa (66,9 %). Kolmanneksi parhaiten hydrolysoitui PC (35,3 %). PE:n, PS:n ja PI:n hydrolyysi oli noin 15 %.



Kuva 9. Polaaristen pääryhmien vaikutus hydrolyysiin pienissä unilamellaarisissa vesikkeleissä (SUVs). *18:1/18:1-PC:a, -PE:a, -PS:ä, -PI:a ja -PG:a sekä PIP₃ ja 21:0-SM sekoitettiin (suhteessa 250/25/25) nmol 0,5 ml:aan puskuria D. 15 µg cPLA₂α:a lisättiin seokseen ja inkuboitin 30 min 37 °C:ssa. 50 µl näytteitä otettiin seoksesta tietyin väliajoin ja yhdistettiin 2 ml:aan metanolia reaktion lopettamiseksi. Suhteelliset hydrolyysimäärät määritettiin, kuten menetelmissä on kuvattu. Y-akselilla on kuvattu normalisoitu hydrolyysiaste. X-akselilla on ilmaistu polaariset pääryhmät. Tulos on neljän kokeen keskiarvo.*

5 Pohdinta

A-tyypin fosfolipaasien (PLA) substraattispesifisyys on riippuvainen pääasiassa kahdesta tekijästä, jotka ovat hydrolysoitavan glyserofosfolipidisubstraatin istuvuus entsyymiin aktiiviseen keskukseen sekä glyserofosfolipidin kyky irtautua kalvosta (efluksi). Istuvuus aktiiviseen keskukseen on hyvin entsyymispesifinen, koska kullakin PLA:lla on aktiivisen keskuksen rakenne, johon tietyn rakenteen omaavat glyserofosfolipidit sopivat paremmin kuin toiset. Efluksi kalvosta taas riippuu suureksi osaksi glyserofosfolipidien asyyliketjujen pituudesta ja tyydyttyneisyysasteesta. (5,6) Mitä lyhyemmät ja tyydyttymättömämmät asyyliketjut lipidissä on, sitä heikommat lipiditähdeiden väliset attraktiiviset voimat siihen kohdistuvat (7-9) ja siksi se pääsee helpommin irtautumaan kalvosta (5,6).

Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet cPLA₂α:n hydrolysoivan parhaiten glyserofosfolipidejä, joilla on sn-2-asemassa arakidonihappo. Ero on selvä verrattuna tilanteeseen, jossa ko. asemassa on linoleolyyli- tai palmitooylihappo. (1-4) Polaarisen pääryhmäspesifisyyden suhteen tulokset ovat ristiriitaisia. Osassa entsyymi hydrolysoi

PE:a PC:a paremmin (3,4). Toisissa taas PC:a hydrolysoitui PE:a paremmin (1,2). PI:a cPLA₂α hydrolysoisi ilmeisesti yhtä paljon tai hieman vähemmän kuin PC:a mutta enemmän kuin PE:a (1,48).

Aikaisemmat cPLA₂α:n substraattispesifisyyttä koskevat tutkimukset on tehty lähinnä yhtä glyserofosfolipidisubstraattia sisältäviä vesikkeleitä, misellejä tai luonnollisia kalvoja käyttäen. Hydrolyysin asteen määrittäminen on niissä perustunut lipideihin lisättyihin radioaktiivisiin isotooppeihin tai fluoresoivaan ryhmään. (1-4) Viimeksi mainittujen kokeiden ongelmana on se, että eri glyserofosfolipidejä sisältävät misellit tai vesikkelit voivat vaihdella koonsa, muotonsa tai varauksensa suhteen. Kokeissa on myös käytetty eri määriä detergenttiä, mikä voi vaikuttaa makrosubstraatin ominaisuuksiin huomattavasti. Tällöin saadut tulokset voivat heijastaa entsyymin affiniteettia makrosubstraattiin eikä varsinaisesti substraattiin. (1,5,6)

Tässä tutkimuksessa käytetty massaspektrometrinen menetelmä mahdollistaa kymmenien lipidien hydrolyysin samanaikaisen selvittämisen, joten se antaa luotettavampia tuloksia. cPLA₂α:n substraattispesifisyysprofiilin ja sitä määrittelevien tekijöiden selvittämiseksi tehtiin kolme koetta, joissa tutkittiin: 1) glyserofosfolipidien asyyliketjujen pituuden ja tyydyttyneisyysasteen, 2) rasvahappotähteen sn-aseman ja 3) polaarisen pääryhmän rakenteen vaikutusta hydrolyysiin. Kyseiset kokeet tehtiin sekä miselleillä että vesikkeleillä makrosubstraattina käyttäen.

Ensimmäisissä kokeissa tutkittiin 27 erilaista PC:a sisältävällä seoksella, miten asyyliketjujen pituus ja tyydyttyneisyysaste vaikuttavat cPLA₂α:n hydrolyysiin tehokkuuteen miselleissä tai vesikkeleissä. Miselleissä hydrolyysin havaittiin laskevan asyyliketjun pidentyessä. Kaksoissidosten määrällä ei juuri ollut merkitystä muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Arakidonihappoa sisältävien substraattien (34:4, 36:4, 40:8) hydrolyysi oli selvästi muita nopeampaa, mikä sopii hyvin aikaisempien tutkimusten tuloksiin. Myös monityydyttyneet 18:3/18:3 ja 22:6/22:6 hydrolysoituivat hieman muita lipidejä paremmin.

Vesikkeleissäkin hydrolyysin nopeus laski asyyliketjujen pidentyessä. Poiketen miselleistä vesikkeleissä kaksi kaksoissidosta sisältävien substraattien hydrolyysi oli kuitenkin selvästi suurempaa kuin tyydyttyneiden. Tämä kertonee siitä, että efluksilla on suurempi merkitys vesikkeleissä kuin miselleissä, joissa glyserofosfolipien pakkautuminen ei ole yhtä tiivistä kuin vesikkeleissä ja siten niiden irtoaminen tapahtuu

helpommin (6). Tätä ajatusta puoltaa se, että kokonaishydrolyysi oli hitaampaa vesikkeleissä. Misellien tapaan myös vesikkeleissä arakidonihappoa sisältävät substraatit hydrolysoituivat selvästi muita nopeammin.

Arakidonihappoa sisältävät PC:t hydrolysoituivat selvästi muita enemmän sekä miselleissä että vesikkeleissä, mitä efluksi ei voi yksin selittää, joten keskeisenä tekijänä on mitä ilmeisemmin istuvuus entsyymien aktiiviseen keskukseen. Yllättäen vesikkeleillä havaittiin, että PC-18:03/18:03:n hydrolyysi oli lähes yhtä suurta kuin arakidonihappoa sisältävien substraattien. cPLA₂α:n on osoitettu hydrolysoivan sn2-asemassa arakidonihapon jälkeen eniten juuri linoleenihappoa, vaikka hydrolyysi ei ole kovin tehokasta (48). Miselleissä havaittu 22:6/22:6 suhteellisen nopea hydrolyysi poikkeaa aikaisemmista havainnoista, joissa ko. rasvahappotähteen hydrolyysi on kuvattu vähäiseksi (48). Se, että 18:3/18:3 ja 22:6/22:6 hydrolysoituivat kohtalaisesti, johtunee niiden affiniteetista entsyymien aktiiviseen keskukseen.

Kolmannessa kokeessa tutkittiin rasvahappotähteen sn-aseman ja pituuden vaikutusta hydrolyysiin miselleissä. Yllättäen hydrolyysiä ei havaittu, vaikka koetta toistettiin neljä kertaa ja entsyymiä käytettiin 32 µg eli huomattavasti enemmän kuin muissa kokeissa. Koe tehtiin vielä toisella detergentillä mutta tulos oli sama eli hydrolyysiä ei havaittu. Tulos saattaa johtua siitä, että entsyymi ei tartu miselleihin, joissa on vain tyydyttyneitä glyserofosfolipidejä. On myös mahdollista, että käytetyt detergentit inhiboivat cPLA₂α:n toimintaa.

Neljännessä kokeessa tutkittiin rasvahappotähteen sn-aseman ja pituuden vaikutusta hydrolyysiin vesikkeleissä. Kokeessa käytettiin 16:0/C_n- ja C_n/16:0-PC-seoksia (n = 6-24). Havaitimme, että hydrolyysin määrä laski molemmilla isomeerisarjoilla voimakkaasti asyyliketjun pidentyessä. Hydrolyysin voimakas lasku asyyliketjujen pidentyessä ja käyrien yhteneväisyys sopii ajatukseen, että efluksinopeus rajoittaa hydrolyysinopeutta. Käyrien poikkeavuudet selittyvät todennäköisesti sillä, että paremmin hydrolysoituneet substraatit sopivat paremmin entsyymien aktiiviseen keskukseen. Välillä n=6-8 kuvatut erot yleisestä laskevasta yhdenmukaisesta trendistä johtuvat toisin sanoen siitä, että 16:0/6:0:n ja 16:0/7:0:n sn2-ketjut ovat todennäköisesti liian lyhyet vuorovaikuttaakseen tehokkaasti aktiivisen keskuksen hydrofobisen alueen kanssa.

Lopuksi tutkimme glyserofosfolipidien polaarisen pääryhmän rakenteen vaikutusta hydrolyysiin miselleissä ja vesikkeleissä. Molemmilla makrosubstraateilla PA hydrolysoitui parhaiten. Vesikkeleissä seuraavaksi parhaiten hydrolysoitui PG ja kolmanneksi PC. Miselleissä muut kuin PA hydrolysoituivat suunnilleen yhtä tehokkaasti.

PA:n nopeampi hydrolyysi voisi johtua siitä, että siinä on vain fosfaattiryhmä pääryhmänä. Polaarisen pään pienuuden vuoksi se voisi sopia paremmin entsyymien aktiiviseen keskukseen. PG:n ja PC:n muita suurempi hydrolyysi vesikkeleissä johtuu todennäköisesti siitä, että ne irtautuvat helpommin kalvosta. Tämä voisi selittää, miksi miselleissä, joissa pakkaus on löyhempää ja efluksilla on siten pienempi merkitys, PG:n ja PC:n hydrolyysi ei ollut muita ryhmiä nopeampaa. Lisäsyynä voi olla niiden parempi istuvuus aktiiviseen keskukseen.

Yhteenvetona tuloksista voidaan todeta, että $cPLA_2\alpha$ on, kuten aikaisemmissakin tutkimuksissa havaittu, varsin spesifinen arakidonihappoa sisältäville glyserofosfolipideille. Näiden hydrolyysi oli selvästi nopeinta sekä miselleissä että vesikkeleissä. Huomattava uusi tulos oli PC-18:03/18:03:n merkittävä hydrolyysi. Samoin dokosaheksaenihapon hydrolyysi miselleissä oli kohtalaista. Polaaristen pääryhmien osalta saadut tulokset poikkeavat huomattavasti edellä kuvatuista aikaisemmista havainnoista, sillä PA:n todettiin hydrolysoituvan parhaiten. Myöskään PG:n toiseksi suurin hydrolyysi vesikkeleissä ei ole aikaisempien tutkimusten tuloksissa. PC:n todettiin hydrolysoituvan kolmanneksi eniten. Muiden osalta hydrolyysi oli yhtä suurta.

Tulokset viittaavat siihen, että keskeinen tekijä $cPLA_2\alpha$:n substraattispesifisyyden suhteen on substraattien sitoutuminen aktiiviseen kohtaan. Tähän viittaa se, että arakidonihapon sisältävät glyserofosfolipidit hydrolysoituivat sekä vesikkeleissä että miselleissä selvästi parhaiten. Toissijaisena tekijänä voidaan pitää efluksia kalvoilta, mikä kävi ilmi pääryhmillä ja positionaalisilla isomeereilla tehdyissä kokeissa.

$cPLA_2\alpha$ eroaa tämän tutkimuksen perusteella sekretorisista a-tyypin fosfolipaaseista ($sPLA_2$) ja $iPLA_2\beta$:sta, koska jälkimmäisen substraattispesifisyys riippuu suurimmaksi osaksi glyserofosfolipidien efluksinopeudesta eikä affiniteetista entsyymien aktiiviseen kohtaan. $sPLA_2$:n kohdalla PC-seoksella ja positionaalisilla isomeereilla tehdyissä kokeissa hydrolyysi laski selvästi asyyliketjujen pidentyessä ja tyydyttyneisyysaste laski

hydrolyysiä. Tämä oli nähtävissä selvemmin vesikkeleillä kuin miselleillä, mikä tukee efluksin tärkeyttä. iPLA₂β:n tapauksessa tulokset olivat samansuuntaisia. Lisäksi iPLA₂β:n polaaraisella pääryhmällä ei havaittu merkittäviä eroja misellien ja vesikkeliön välillä toisin kuin cPLA₂α:n kohdalla havaittiin. (5,6)

Tutkimuksen suorituksessa alkuvaiheessa ilmeni ongelmia, jotka johtuivat alussa käytetyistä His₆-affiniteettitarrasta ja S2-soluista. Kyseisiin soluihin entsyymien geeni siirrettiin käyttämällä plasmideja ja sen ekspressio indusoitiin kuparisulfaattilla. Tällä menetelmällä cPLA₂α:n ekspressio jäi liian alhaiseksi. His₆-affiniteettitarran omaavaa entsyymiä ei saatu eristetyksi tarpeeksi puhtaana. Näistä ongelmista johtuen päätettiin siirtyä StrepIII-affiniteettitarran ja toisenlaiseen ekspressio-organismiin ja -tapaan (ks. menetelmät).

Tästä tutkimuksesta saatuja tuloksia cPLA₂α:n substraattispesifisyydestä aiotaan täydentää käyttämällä substraattina PC-molekyylejä, joissa toisessa sn-asetassa on arakidonihappo palmitiinihapon sijaan sekä käyttämällä makrosubstraattina solukalvoja. Saaduilla tuloksilla voisi tulevaisuudessa olla hyötyä cPLA₂α:an yhdistettyjen sairauksien hoidossa kehitettäessä täsmälääkkeitä, joilla voitaisiin inhiboida cPLA₂α:n toimintaa. Kuten edellä mainittiin, cPLA₂α on yhdistetty useisiin syöpiin, kuten keuhko-, sappitiehyt-, eturauhas-, haima-, ruokatorvi- ja ohutsuolisyöpään, autoimmuunisairauksiin, kuten nivelreumaan ja MS-tautiin sekä Alzheimerin ja Parkinsonin tautiin. Entsyymiä estävistä täsmälääkkeistä saattaisi olla siis suuri lääketieteellinen hyöty.

Lähteet

- (1) Diez E, Louis-Flamberg P, Hall RH, Mayer RJ. Substrate specificities and properties of human phospholipases A2 in a mixed vesicle model. *J Biol Chem* 1992 Sep 15;267(26):18342-18348.
- (2) Diez E, Chilton FH, Stroup G, Mayer RJ, Winkler JD, Fonteh AN. Fatty acid and phospholipid selectivity of different phospholipase A2 enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate. *Biochem J* 1994 Aug 1;301 (Pt 3)(Pt 3):721-726.
- (3) Burdge GC, Creaney A, Postle AD, Wilton DC. Mammalian secreted and cytosolic phospholipase A2 show different specificities for phospholipid molecular species. *Int J Biochem Cell Biol* 1995 Oct;27(10):1027-1032.

- (4) Forsell PK, Lindberg A, Karlsson S, Lindgren JA, Claesson HE. Purification, characterization, and cDNA sequencing of cytosolic phospholipase A(2) from equine neutrophils. *J Lipid Res* 2000 Aug;41(8):1222-1230.
- (5) Haimi P, Hermansson M, Batchu KC, Virtanen JA, Somerharju P. Substrate efflux propensity plays a key role in the specificity of secretory A-type phospholipases. *J Biol Chem* 2010 Jan 1;285(1):751-760.
- (6) Batchu KC, Hokynar K, Jeltsch M, Mattonet K, Somerharju P. Substrate Efflux Propensity Is the Key Determinant of Ca²⁺-independent Phospholipase A-beta (iPLA_β)-mediated Glycerophospholipid Hydrolysis. *J Biol Chem* 2015 Apr 17;290(16):10093-10103.
- (7) Lipids - eLS - Yeagle - Wiley Online Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000711.pub2/pdf>. Accessed 12/13/2013, 2013.
- (8) Glycerophospholipids - eLS - Farooqui - Wiley Online Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000726.pub2/full>. Accessed 12/13/2013, 2013.
- (9) van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 Feb;9(2):112-124.
- (10) Hermansson M, Hokynar K, Somerharju P. Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells. *Prog Lipid Res* 2011 Jul;50(3):240-257.
- (11) Membrane Lipid Biosynthesis - eLS - Vance - Wiley Online Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0001391/pdf>. Accessed 12/13/2013, 2013.
- (12) KENNEDY EP, LEHNINGER AL. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1949 Jun;179(2):957-972.
- (13) Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 5th ed. ed. New York, NY: W. H. Freeman and Company; 2008.
- (14) Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* 2011 Apr;50(2):152-192.
- (15) Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 2009 Apr;50 Suppl:S237-42.
- (16) Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, Leslie CC. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res* 2006 Nov;45(6):487-510.

- (17) Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, Zechner R. Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res* 2009 Apr;50 Suppl:S63-8.
- (18) Ackermann EJ, Dennis EA. Mammalian calcium-independent phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 1995 Nov 16;1259(2):125-136.
- (19) Jenkins CM, Wolf MJ, Mancuso DJ, Gross RW. Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A2beta. implications for structure and function. *J Biol Chem* 2001 Mar 9;276(10):7129-7135.
- (20) Balsinde J, Perez R, Balboa MA. Calcium-independent phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2006 Nov;1761(11):1344-1350.
- (21) Lei X, Barbour SE, Ramanadham S. Group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A2 (iPLA2beta) and its role in beta-cell programmed cell death. *Biochimie* 2010 Jun;92(6):627-637.
- (22) Allyson J, Bi X, Baudry M, Massicotte G. Maintenance of synaptic stability requires calcium-independent phospholipase A(2) activity. *Neural Plast* 2012;2012:569149.
- (23) Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. *Biol Pharm Bull* 2004 Aug;27(8):1168-1173.
- (24) Alberghina M. Phospholipase A(2): new lessons from endothelial cells. *Microvasc Res* 2010 Sep;80(2):280-285.
- (25) Bechler ME, de Figueiredo P, Brown WJ. A PLA1-2 punch regulates the Golgi complex. *Trends Cell Biol* 2012 Feb;22(2):116-124.
- (26) Lucas KK, Dennis EA. The ABC's of Group IV cytosolic phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 2004 Mar 22;1636(2-3):213-218.
- (27) Nakanishi M, Rosenberg DW. Roles of cPLA2alpha and arachidonic acid in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2006 Nov;1761(11):1335-1343.
- (28) Forlenza OV, Schaeffer EL, Gattaz WF. The role of phospholipase A2 in neuronal homeostasis and memory formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2007;114(2):231-238.
- (29) Dessen A, Tang J, Schmidt H, Stahl M, Clark JD, Seehra J, et al. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* 1999 Apr 30;97(3):349-360.
- (30) Ward KE, Ropa JP, Adu-Gyamfi E, Stahelin RV. C2 domain membrane penetration by group IVA cytosolic phospholipase A(2) induces membrane curvature changes. *J Lipid Res* 2012 Dec;53(12):2656-2666.

- (31) Zizza P, Iurisci C, Bonazzi M, Cossart P, Leslie CC, Corda D, et al. Phospholipase A2IValpha regulates phagocytosis independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem* 2012 May 11;287(20):16849-16859.
- (32) Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1997 Jul 4;272(27):16709-16712.
- (33) Koulu M, Mervaala E, Tuomisto J, Airas L. *Farmakologia ja toksikologia*. 8. uud. p. ed. Kuopio: Kustannusosakeyhtiö Medicina; 2012.
- (34) Qu BX, Gong Y, Sinclair D, Fu M, Perl D, Diaz-Arrastia R. cPLA2alpha knockout mice exhibit abnormalities in the architecture and synapses of cortical neurons. *Brain Res* 2013 Feb 25;1497:101-105.
- (35) Lee JC, Simonyi A, Sun AY, Sun GY. Phospholipases A2 and neural membrane dynamics: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2011 Mar;116(5):813-819.
- (36) Liu NK, Xu XM. Phospholipase A2 and its molecular mechanism after spinal cord injury. *Mol Neurobiol* 2010 Jun;41(2-3):197-205.
- (37) Fonteh AN, Chiang J, Cipolla M, Hale J, Diallo F, Chirino A, et al. Alterations in cerebrospinal fluid glycerophospholipids and phospholipase A2 activity in Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 2013 Oct;54(10):2884-2897.
- (38) Sundaram JR, Chan ES, Poore CP, Pareek TK, Cheong WF, Shui G, et al. Cdk5/p25-induced cytosolic PLA2-mediated lysophosphatidylcholine production regulates neuroinflammation and triggers neurodegeneration. *J Neurosci* 2012 Jan 18;32(3):1020-1034.
- (39) Patel KM, Morrisett JD, Sparrow JT. A convenient synthesis of phosphatidylcholines: acylation of sn-glycero-3-phosphocholine with fatty acid anhydride and 4-pyrrolidinopyridine. *J Lipid Res* 1979 Jul;20(5):674-677.
- (40) Bartlett EM, Lewis DH. Spectrophotometric determination of phosphate esters in the presence and absence of orthophosphate. *Anal Biochem* 1970 Jul;36(1):159-167.
- (41) LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 Nov;193(1):265-275.
- (42) Fazekas de St Groth S, Webster RG, Datyner A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* 1963 May 14;71:377-391.
- (43) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-685.
- (44) FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957 May;226(1):497-509.

(45) Heikinheimo L, Somerharju P. Translocation of phosphatidylthreonine and -serine to mitochondria diminishes exponentially with increasing molecular hydrophobicity. *Traffic* 2002 May;3(5):367-377.

(46) Haimi P, Uphoff A, Hermansson M, Somerharju P. Software tools for analysis of mass spectrometric lipidome data. *Anal Chem* 2006 Dec 15;78(24):8324-8331.

(47) Hermansson M, Uphoff A, Kakela R, Somerharju P. Automated quantitative analysis of complex lipidomes by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 2005 Apr 1;77(7):2166-2175.

(48) Leslie CC. Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004 Apr;70(4):373-376.

Liitteet

Lyhenne	Selitys
AA	Arakidonihappo
arg	Arginiini
asp	Asparagiinihappo
CDP	Cytidyylidifosfaatti
CL	Kardioliipiini
COX	Syklo-oksigenaasi
cPLA ₂ α	Syttoplasmisen A ₂ -tyypin fosfolipaasi α
CTP	Cytidyylitriposfaatti
DAG	Diasyyliglyseroli
ER	Endoplasmisen kalvosto
iPLA ₂ β	Kalsiumista riippumaton A ₂ -tyypin fosfolipaasi β
PA	Fosfatidihappo
PAF	Verihiutaleita aktivoiva tekijä
PC	Fosfatidyylikoliini
PE	Fosfatidyylietanolamiini
PG	Fosfatidyyliglyseroli
PGE ₂	Prostaglandiini E ₂
PI	Fosfatidyyli-inositoli
PIP ₃	Fosfatidyyli-inositoli-3,4,5-trifosfaatti
PLA	A-tyypin fosfolipaasi
PLC	C-tyypin fosfolipaasi
PLD	D-tyypin fosfolipaasi
PS	Fosfatidyyliiseriini
ser	Seriini
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SM	Sfingomyeliini
sPLA ₂	Sekretorinen A ₂ -tyypin fosfolipaasi

Liite 1. Yleisimpien käytettyjen lyhenteiden selitykset

Lyhenne	Rasvahapot	Koko nimi
PC 26:0	13:0/13:0	1,2-tridekanoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 28:0	14:0/14:0	1,2-dimyristoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 30:0	15:0/15:0	1,2-dipentadekanoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 32:0	16:0/16:0	1,2-dipalmitoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 34:0	17:0/17:0	1,2-diheptadekanoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 36:0	18:0/18:0	1,2-distearoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 38:0	19:0/19:0	1,2-dinonadekanoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 40:0	20:0/20:0	1,2-diarakidoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 42:0	21:0/21:0	1,2-dihenarakidoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 44:0	22:0/22:0	1,2-dibehenoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 32:1	18:1/14:0	1-oleyyli-2-myristoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 34:1	18:1/16:0	1-oleyyli-2-palmitoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 36:1	18:0/18:1	1-stearoyyli-2-oleoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 28:2	14:1/14:1	1,2-dimyristoleoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 32:2	16:1/16:1	1,2-dipalmitoleoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 34:2	16:0/18:2	1-palmitoyyli-2-linoleoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 36:2	18:1/18:1	1,2-dioleoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 40:2	20:1/20:1	1,2-dieikosenoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 44:2	22:1/22:1	1,2-dierukoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 34:4	14:0/20:4	1-myristoyyli-2-arakidonoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 36:4	16:0/20:4	1-palmitoyyli-2-arakidonoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 38:4	18:0/20:4	1-stearoyyli-2-arakidonoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 36:6	18:3/18:3	1,2-dilinolenoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 38:6	16:0/22:6	1-palmitoyyli-2-dokosaheksaenoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 40:6	18:0/22:6	1-stearoyyli-2-dokosaheksaenoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 40:8	20:4/20:4	1,2-diarakidonoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini
PC 44:12	22:6/22:6	1,2-didokosaheksaenoyyli-sn-glysero-3-fosfatidyylikoliini

Liite 2. Glyserofosfolipidien lyhenteiden selitykset. Vasemmassa sarakkeessa on pelkistetty muoto, jossa PC tarkoittaa fosfatidyylikoliinia, luku ennen kaksoispistettä asyyliketjujen hiilten kokonaisuus ja luku kaksoispisteen jälkeen asyyliketjujen kaksoissidosten määrä. Fosfatidyylikoliinien lisäksi samalla tavalla lyhennetään myös muut pääryhmät. Esimerkiksi fosfatidyylietanolamiini on PE. Keskimmissä sarakkeissa on ilmoitettu rasvahappojen rakenne muodossa sn1/sn2. Oikeassa sarakkeessa on ilmoitettu jokaisen glyserofosfolipidin koko nimi.