

СУПЕРСЕМЕЙСТВО ФОСФОЛИПАЗ: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

© 2020 г. С. Ю. ФИЛЬКИН*, А. В. ЛИПКИН,
А. Н. ФЕДОРОВ

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Суперсемейство фосфолипаз. III. Классификация
фосфолипаз. IV. Фосфолипаза A2. V. Экспрессия генов фосфолипаз
A2. VI. Применение фосфолипаз A2 в биотехнологии. VII. Заклю-
чение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Фосфолипазы – ферменты класса гидролаз, участвующие в метаболизме фосфолипидов (КФ 3.1.). Различают 4 основных семейства фосфолипаз: A, B, C и D, каждое из которых гидролизует определенную связь в фосфолипиде (рис. 1). Широкая представленность фосфолипаз в живых организмах обусловлена прежде всего важностью функции фосфолипаз в поддержании и регулировании липидов мембран, мембранного состава, передачи сигнала, пищеварении, регуляции

Принятые сокращения: PLA1 – фосфолипаза A1, PLA2 – фосфолипаза A2; PLB – фосфолипаза B; PLC – фосфолипаза C; PLD – фосфолипаза D; PIP2 – фосфоинозитол-4,5-бисфосфат; IP3 – инозитолтрифосфат; DAG – диацилглицерин; GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком (G-protein coupled receptor); PAF-АН – ацетил-гидролаза фактора активации тромбоцитов; PAF – фактором активации тромбоцитов; sPLA2 – секреторная фосфолипаза; sPLA2R – рецептор секреторной фосфолипазы A2; iPLA2 – кальций независимая фосфолипаза A2; cPLA2 – цитозольная фосфолипаза A2; ЦНС – Центральная нервная система; СНО – линия клеток яичников китайского хомячка; LPCAT2 – лизофосфотидилхолин ацетилтрансфераза 2.

**Адрес для корреспонденции:* s.filkin@fbras.ru.

Работа проведена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по соглашению от 31.05.2018 г. № 14.607.21.0207 (УИН RFMEFI60718X0207), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

воспалительного процесса. По мере развития технологий, возрастает значение использования фосфолипаз как биотехнологического инструмента в медицинской, химической, пищевой промышленности, а также и в агропромышленности.

Данный обзор рассматривает структурно-функциональные характеристики как фосфолипаз в целом, так и фосфолипаз A2, различные аспекты использования фосфолипаз в биотехнологии.

II. СУПЕРСЕМЕЙСТВО ФОСФОЛИПАЗ

Все ферменты, использующие фосфолипиды в качестве субстрата, относятся к суперсемейству фосфолипаз. Внутри суперсемейства они могут сильно отличаться по молекулярной массе, составу субъединиц, физиологической функции, способу регуляции и месту расщепления молекулы фосфолипида [1].

Все фосфолипазы наиболее активно катализируют гидролиз на границе раздела фаз фосфолипид-вода и медленно гидролизуют водорастворимые субстраты. Кроме фосфолипидов и фосфатидилхолина, фосфолипазы могут также расщеплять фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол, сфингомиелин, лизофосфатидилхолин и лизофосфатидилинозитол в некоторых организмах и тканях [2].

Фосфолипазы классифицируют в зависимости от сайта расщепления связи в молекуле фосфолипида (рис. 1). Фосфолипазы A1 (PLA1) и A2 (PLA2) гидролизует sn-1 или sn-2 ацильную цепь с высвобождением свободной жирной кислоты и 1- или 2-ацил-лизосффолипида, соответственно. В случае отщепления обеих жирных кислот говорят о фосфолипазе типа B (PLB). Фосфолипазы C (PLC) – фосфодиэстеразы, которые расщепляют глицерофосфатную связь с образованием диацилглицерина и фосфат-содержащей полярной группы. Наконец, фосфолипазы D (PLD) гидролизуют связь между фосфатной и спиртовой группой, при этом высвобождаются фосфатидная кислота и спирт. Рассмотрим подробнее все эти типы фосфолипаз [3].

III. КЛАССИФИКАЦИЯ ФОСФОЛИПАЗ

Фосфолипазы A1 впервые были обнаружены путем измерения гидролиза фосфатидилхолина до лизофосфатидилхолина [4]. Изоформы фосфолипазы A1 можно разделить на две группы в зависимости от их локализации: внеклеточные и внутриклеточные ферменты. Общей структурной особенностью внутриклеточных ферментов является

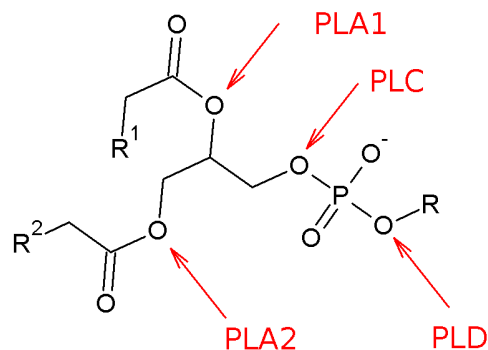


Рис. 1. Схематичное изображение молекулы фосфолипида с сайтами расщепления фосфолипаз разных семейств.

R1 и R2 – алкильные цепи жирных кислот. R – полярная группа фосфолипида (холин, серин, этаноламин, инозитол).

консенсусная последовательность липазы, Gly-x-Ser-x-Gly, где x – любая аминокислота. Внеклеточные ферменты относятся к так называемому «семейству генов липазы поджелудочной железы» и характеризуются наличием нескольких консервативных мотивов, включая консенсусную последовательность липазы, каталитическую триаду Ser-Asp-His, цистеиновые аминокислоты, ответственные за образование дисульфидных связей, и липид-связывающие поверхностные петли. Липид-связывающие поверхностные петли влияют на субстратную специфичность ферментов, ограничивая доступ к каталитическому сайту. Фосфолипазы A1 выполняют различные биологические функции. Так, например, внутриклеточный PA-PLA1 участвует в сперматогенезе, KIAA0725p помогает осуществлять везикулярный транспорт от аппарата Гольджи к плазматической мембране, а внеклеточная PS-PLA1 регулирует уровни фосфотидилсерина, участвующего в процессах свертывания крови, апоптоза и активации протеинкиназы C (табл. 1).

Фосфолипазы B выделены из растений, микроорганизмов, яда пчел, тканей млекопитающих. Ферменты этой группы крайне неспецифичны, катализируют гидролиз различных сложноэфирных связей, обладают литическим (разрушающим) действием по отношению к биологическим мембранам (что обуславливает их токсичность). Они менее стабильны, чем фосфолипазы A. Фосфолипазы B не имеют коферментов, некоторые из них ингибируются диизопропилфторфосфатом [3].

Таблица 1. Общая классификация фосфолипаз.

Тип	Источник	Организм	Название	Классификация	Локализация	Ссылки
1	2	3	4	5	6	7
PLA1	Животные	<i>Rattus norvegicus</i>	PS-PLA1	Секреторная	Тромбоциты и различные ткани	[78, 79]
		<i>Homo sapiens</i>	mPA-PLA1 α	Секреторная	Различные ткани	[78, 79]
		<i>H. sapiens</i>	mPA-PLA1 β	Мембраносвязанная	Репродуктивные ткани	[78, 79]
		<i>Bos taurus</i>	PA-PLA1	Цитозольная	Тестикулы, мозг	[78, 79]
		<i>Mus musculus</i>	p125	Цитозольная	Различные ткани	[78, 79]
		<i>H. sapiens</i>	KIAA0725p	Цитозольная	Различные ткани	[78, 79]
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	DAD1		Пыльник, Хлоропласты	[80]
		<i>A. oryzae</i>	AcPLA1	Секреторная		[80]
		<i>Thermomyces lanuginosus</i>	PLA1			[80]
		<i>Trypanosoma brucei</i>	TbPLA1	Цитозольная		[80]
	Простейшие Бактерии	<i>Serratia sp.</i>	PhlA, PlaA	Секреторная		[1, 80]
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	YplA	Секреторная		[1, 80]
		<i>Streptomyces albolavus</i>	SaPLA1	Секреторная		[81]
		<i>Escherichia coli</i>	OMPLA	Мембраносвязанная	Внешняя мембрана	[1, 80]
		<i>H. sapiens, Sus scrofa, Viperidae, Serpentes, Rattus, Muridae, Apoidea, Lacertilia, Scorpiones, Mollusca</i>	sPLA2 (группы IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XII)	Секреторная	Яды, синовиальная жидкость, панкреатический сок, различные ткани млекопитающих	[82]
PLA2	Животные	<i>H. sapiens, Muridae</i>	cPLA2 (группы IVA-IVF)	Цитозольная	Различные ткани	[83]
		<i>Mus musculus, H. sapiens</i>	iPLA2 (группы VIA-VIF)	Цитозольная	Различные ткани	[83]
		<i>Bos taurus, Mus musculus, H. sapiens, Sus scrofa</i>	PAF-AH, или Lp-PLA2 (группы VII и VIII)	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[83]
		<i>Bos taurus, Mus musculus, H. sapiens</i>	L-PLA2 (группа XV)	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[83]

Продолжение табл. 1 см. на сл. стр.

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
PLB	Растения	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Dianthus</i> spp., <i>Phaseolus</i> spp., <i>Citrus</i> spp., <i>Triticum durum</i> , <i>Ulmus</i> spp., <i>Oryza</i> spp., <i>Glycine max</i> , <i>Nicotiana</i> spp.	sPLA2 (группы XIA и XIB)	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[84]
	Дрожжи и грибы	<i>A. thaliana</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Fabaceae</i> gen., <i>Cucumis sativus</i> , <i>Piper</i> spp., <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Nicotiana</i> spp., <i>S. lycopersicum</i>	Пататин подобная фосфолипаза	Цитозольная	Различные ткани	[85, 86]
	Дрожжи и грибы	<i>Tuber borchii</i> , <i>Helicosporium</i> sp., <i>A. oryzae</i> , <i>Gibberella zeae</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Neurospora crassa</i>	sPLA2 (группа XIV)			[87]
		<i>A. fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Neurospora crassa</i>	cPLA2 (группа IVC)			[87]
	Бактерии	<i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Пататин подобная фосфолипаза			[87]
	Бактерии	<i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>S. violaceoruber</i>	sPLA2 (группа XIV)		Нет данных	[87]
	Парвовирусы	<i>Parvoviridae</i> gen.	sPLA2 (группа XIII)		Нет данных	[87]
	Животные	<i>Homo sapiens</i> , <i>Cavia porcellus</i> , <i>Rattus</i> spp., <i>Oryctolagus cuniculus</i> , <i>Apis mellifera</i> , <i>Serpentes</i> order	PLB	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[88]
	Растения	<i>Fabaceae</i> gen., <i>Ricinus communis</i>	PLB-подобный		Цитозоль клеток (ткани листа)	[89, 90]
	Дрожжи и грибы	<i>Candida albicans</i>	CaPlb1-5	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[91]
	Дрожжи и грибы	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CnPlb1	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[91]
		<i>C. gattii</i>	CgPlb1	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[91]
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PLB1-PLB3	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[91]

Продолжение табл. 1 см. на сл. стр.

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
	Амебы	<i>Dictyostelium discoideum</i>	PLB		Цитозоль клеток	[92]
	Бактерии	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pf-PLB	Секреторная		[93]
		<i>Bacillus subtilis</i>	LipC		Спора в оболочке	[94]
		<i>Streptomyces</i> sp.	PLB ₆₈₄	Секреторная		[95]
PLC	Животные	<i>Mammalia classis</i>	PI-PLC-β, PI-PLC-γ, PI-PLC-δ, PI-PLC-ξ, PI-PLC-η, PI-PLC-подобный		Цитозоль клеток (ядерный, плазмменный мембраносвязанный)	[96]
		<i>Mammalia classis</i>	PC-PLC		Цитозоль клеток (эритроциты, лимфоциты, мышечная ткань, жировая ткань, нервная система)	[97]
			PI-PLC		Цитозоль клеток (различные ткани)	[98]
	Растения	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Fabaceae</i> gen., <i>Cedrus</i> spp., <i>Poaceae</i> gen., <i>Lilium</i> spp., <i>Brachyotia phylum</i> , <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Nicotiana</i> spp., <i>S. lycopersi-</i> <i>sicum</i>				
		<i>A. thaliana</i> , <i>Persea americana</i> , <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Oryza</i> spp., <i>Glycine max</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Triticum</i> spp	NPC		Цитозоль клеток (различные ткани)	[99]
		<i>Cryptosoccus neoformans</i>	PI-PLC (CnPLC1-CnPLC2)	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[91]
	Дрожжи и грибы	<i>Candida albicans</i>	PI-PLC (CaPLC1-CaPLC3)	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[91]

Окончание табл. 1 см. на сл. стр.

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
PLD	Бактерии	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	PI-PLC	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[91]
		<i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>Legionella pneumophila</i>	PC-PLC	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[99]
	Животные	<i>Mammalia classis</i>	PLD1, PLD2, PLD3	Секреторная	Цитозоль клеток, мембраносвязанная	[100]
		<i>Mammalia classis</i>	mitoPLD		Митохондрии (различные ткани)	[100]
	Растения	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Fabaceae</i> gen., <i>Vitis vinifera</i> , <i>Jatropha curcas</i> , <i>Sinapis</i> spp., <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Populus</i> spp., <i>Papaver</i> spp., <i>Fragaria</i> spp., <i>Oryza</i> spp., <i>Helianthus annuus</i> , <i>Nicotiana</i> spp., <i>Solanum lycopersicum</i>	C2-PLD (PLD α , PLD β , PLD γ , PLD δ , PLD ϵ), PXP α -PLD (PLD ζ 1, PLD ζ 2)	Секреторная	Цитозоль клеток, мембраносвязанная	[100, 101]
	Дрожжи и грибы	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PLD1 (Spo14), PLD2	Секреторная	Цитозоль клеток и различные ткани	[100, 102]
		<i>Candida albicans</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	caPLD1		Мембран-связанная	[100]
	Бактерии	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Act bau PLD	Секреторная		[100]
		<i>Escherichia coli</i>	Bfil		Периплазма	[100]
		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NgPLD	Секреторная	Цитоплазма клеточной хозияна	[100]
		<i>Yersinia pestis</i>	YMT		Цитозоль	[100]
		<i>Chlamydiae</i>	pz PLDs		Ретикулярная формация	[100]
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PLDa		Периплазма	[100]
		<i>Streptomyces</i>	PMF PLD	Секреторная	Периплазма	[100]

Фосфолипазы С расщепляют глицерофосфатную связь фосфолипидов. Они катализируют гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата в мембране с образованием вторичных сигнальных молекул диацилглицерина и 1,4,5-трифосфата. Диацилглицерин (встроенный в мембрану) и 1,4,5-трифосфат (высвобождаемый в цитозоль) инициируют дальнейшие пути передачи сигнала через активацию протеинкиназы С и внутриклеточного Ca^{2+} [5]. Члены семейства фосфолипазы С имеют несколько консервативных участков. Структурные области, ответственные за каталитическую активность, состоят из чередующихся α -спиралей и β -листов, тогда как домен активного центра, связывающего ионы Ca^{2+} , представляет собой мотив спираль-поворот-спираль. Изоформы фосфолипазы С вовлечены во множество различных физиологических ролей в различных тканях, включая рост, дифференцировку клеток и экспрессию генов. Фосфолипазы С обнаружены у бактерий родов *Clostridium*, *Bacillus* и *Pseudomonas*, а также в клетках млекопитающих (печень, мозг, поджелудочная железа). Фосфолипаза С, гидролизующая фосфодизфирную связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой, относится к фосфодизэстеразам, также, как и фосфолипаза D (см. ниже). Фосфолипаза С является ключевым ферментом метаболизма фосфатидилинозитола и липидных сигнальных путей. Фосфолипаза С активируется $\text{G}\alpha_q$ или $\text{G}\beta\gamma$ субъединицами G-белка. Таким образом, она является частью G-белок-связанного рецептора (GPCR) и соответствующего сигнального пути. Кроме того, фосфолипаза С гидролизует фосфатидилинозитол (PIP_2) на два вторичных медиатора – инозитолтрифосфат (IP_3) и диацилглицерин (DAG). Эти медиаторы вовлечены в сигнальные пути активации кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума и протеинкиназы С [6].

Ферменты фосфолипазы D (PLD) играют важную роль в клетках: они поддерживают целостность клеточных мембран и участвуют в передаче сигналов, миграции и пролиферации клеток. Роль фосфолипаз данного семейства заключается в высвобождении фосфатидной кислоты, обладающей уникальной мембрано-связывающей функцией и во взаимодействии с различными молекулами, например, белком синдрома Вискотта-Олдрича (WASp) или киназами, благодаря чему происходит их активация [7]. Кроме того, существуют данные, предполагающие важную роль данной фосфолипазы в процессе канцерогенеза и развитии рака [8, 9].

Активность фосфолипазы D была обнаружена у вирусов, бактерий, растений и животных. Существуют две изоформы ферментов

фосфолипазы D млекопитающих, а именно фосфолипаза D1 (120 кДа) и фосфолипаза D2 (105 кДа). Фосфолипазы D и продукты их каталитической активности вовлечены в регулирование разнообразных клеточных процессов, включая воспаление, контроль транспорта внутриклеточной мембраны, нейронную и сердечную стимуляцию, миграцию клеток и химиорезистентность. Фосфолипаза D проявляет прежде всего гидролитическую активность, в результате которой происходит расщепление сложноэфирной связи между остатком фосфатидной кислоты и спирта в молекулах фосфолипидов. При этом спирт замещается на водород, но возможен перенос остатка фосфатидной кислоты на иные различные гидроксилсодержащие акцепторы, что представляет большой интерес для биотехнологии, так как трансфотидилирующая активность фосфолипазы D может быть использована для синтеза разнообразных лекарственных препаратов [10] или редких фосфолипидов, например, фосфатидилглицерина и фосфатидилсерина [11].

IV. ФОСФОЛИПАЗА A2

Фосфолипазы A2 – наиболее изученная из представленных фосфолипаз [2]. Впервые фосфолипаза A2 была обнаружена в яде змей, дальнейший интерес же был связан с ролью данного фермента в метаболизме арахидоновой кислоты. На сегодняшний день все фосфолипазы A2 разделяют на 5 групп: секреторные, цитозольные, Ca^{2+} -независимые, лизосомальные и ацетилгидролазы фактора активации тромбоцитов.

На сегодняшний день установлено, что фосфолипазы A2 играют значительную роль в развитии воспалительного процесса. Вклад фермента заключается в запуске синтеза липидных регуляторов этой реакции – так называемых химических медиаторов воспаления. Они образуются, активируются или мобилизуются в воспалительном очаге, и их соотношением определяется характер течения патологического процесса. Медиаторы воспаления липидной природы представлены жирными кислотами и их производными (простагландинами, лейкотриенами, тромбоксанами), а также фосфолипидным фактором активации тромбоцитов (PAF). В воспалительном процессе участвуют внутриклеточные цитозольные PLA2, высвобождающие полиеновые кислоты из sn-2-положения глицеринового остатка мембранных фосфолипидов [12]. Полиеновые жирные кислоты, включая и арахидоновую, обладают собственной биологической активностью, в том числе усиливают сосудистую проницаемость, вызывают агрегацию

тромбоцитов, оказывают вазоактивное действие. Другие продукты фосфолипазной реакции гидролиза – лизофосфолипиды, обладающие ярко выраженной цитотоксичностью и детергентными свойствами. Эти соединения обнаруживают при таких заболеваниях, как холецистит, инфаркт миокарда, катаракта, псориаз и др. Если жирная кислота высвобождается из фосфатидилхолина I-О-алкильного типа, образующийся лизофосфолипид служит предшественником PAF – медиатора воспаления, аллергической реакции, септического шока и астматического состояния. Это соединение в настоящее время интенсивно изучается [13].

СТРУКТУРА СЕКРЕТОРНЫХ ФОСФОЛИПАЗ A2

Секреторные фосфолипазы A2 (sPLA2) обычно представлены белками с молекулярной массой около 14 кДа, требуют ионов Ca^{2+} в миллимолярных концентрациях для каталитической активности, pH оптимум находится в интервале 7–9 [5, 14, 15]. Практически все секреторные фосфолипазы содержат консервативную кальций-связывающую петлю (XCGXGG) и каталитический сайт (DXCCXXHD). На данный момент получены кристаллические структуры множества фосфолипаз A2 яда кобр, панкреатические PLA2 из человека, свиньи и быка, растительного и микробного происхождения. При значительных отличиях в аминокислотных последовательностях, sPLA2 сохраняют каталитическую диаду His/Asp и одинаковую структурную укладку (рис. 2).

В настоящее время описано шестнадцать групп sPLA2 (IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIV), различающиеся первичной структурой и расположением дисульфидных связей (табл. 2). Все типы секреторных фосфолипаз представляют собой глобулярные белки, богатые остатками цистеина, образующими 6–8 дисульфидных связей, что обеспечивает стабильность фермента, устойчивость к протеолизу и денатурации.

Фосфолипазы A2 групп I, II, V, X содержат три длинные альфа-спирали, два бета-тяжа и консервативную Ca^{2+} -связывающую петлю. Растительные sPLA2 группы XI не содержат бета тяжей. Для групп III и XIV характерны уникальные укладки полипептидных цепей. Пространственная структура фосфолипаз группы XIA выделяется необычной кальций-связывающей петлей.

Группа IA является наиболее изученной группой фосфолипаз A2 и рассматривается как важная модель для всей энзимологии фосфолипаз A2. На её примере можно оценить, какими необычными для ферментов структурными характеристиками обладают PLA2. sPLA2 группы IA содержат 7 высоко консервативных дисульфидных мостов. Связыва-

Рис. 2. Трехмерная структура свиной панкреатической секреторной фосфолипазы A2 группы IB по данным ЯМР (PDB ID 1PIR).

Каталитический центр выделен красным, выделены остатки активного центра His48 и Asp49, зеленым выделен кальций-связывающий центр, синим цветом выделен ион Ca^{2+} .

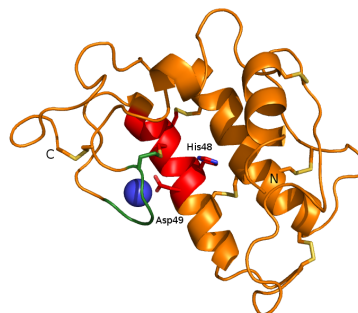


Таблица 2. Классификация секреторных PLA2 по структурным группам*

Группа	Источник	Молекулярный вес, кДа	Количество дисульфидных связей
IA	Кобра, крайты	13–15	7
IB	Человек, свинья (панкреатическая железа)	13–15	7
IIA	Гремучая змея, человек (слюнная железа)	13–15	7
IIB	Гадюка Bitis sp.	13–15	7
IIC	Крыса, мышь (яичники)	15	8
IID	Человек, мышь (поджелудочная железа, селезенка)	14–15	7
IE	Человек, мышь, (мозг, сердце, матка)	14–15	7
IF	Человек, мышь (мозг, сердце, матка)	16–17	6
III	Человек, мышь, ящерица, пчела	15–18	8
III**	Человек	55*	10
V	Человек, мышь (сердце, легкие, макрофаги)	14	6
IX	Улитка (яд)	14	6
X	Человек (селезенка, тимус, лейкоциты)	14	8
XIA	Рис	12.4	6
XIB	Рис	12.9	6
XII	Человек, мышь	19	7
XII	Вирусы семейства Parvoviridae	<10	0
XIV	Грибы, бактерии	13–19	2

* Секреторные фосфолипазы A2 найдены в растениях, грибах, насекомых, моллюсках, рептилиях и в млекопитающих [103]. У *Parvovirus* [104] обнаружена формы фосфолипазы A2, не содержащая дисульфидные мостики, а у симбиотических грибов *Tuber borchii* [105] PLA2 содержит только 2 дисульфидных мостика.

** Секреторные фосфолипазы A2 группы III млекопитающих за счет увеличения N- и C- концов имеют массу около 55 кДа [106].

ние иона кальция осуществляется за счет консервативного остатка аспартата, карбонильных кислородов тирозина и глицинов кальций-связывающей петли. Присутствие кальция критично для гидролиза. sPLA2 не образуют классического интермедиата ацил-фермент, характерного для сериновых протеаз. Гистидин при поддержке остатка аспарагиновой кислоты поляризует молекулу воды, которая атакует карбонильную группу фосфолипида. Ион кальция позволяет стабилизировать переходное состояние, координируя карбонильную группу и отрицательный заряд фосфата. Предполагается, что только 9–10 углеродов цепи sn-2 фосфолипида взаимодействуют с ферментом, остальная часть погружена в липидный бислой. Таким образом объясняется отсутствие специфичности sPLA2 к отдельным жирным кислотам в положении sn-2 фосфолипида. Гидрофобные остатки Leu-2, Phe-5, Trp-19, Tyr-52, Tyr-69 окружают ацильную цепь липида. Образуя участок, в который входит молекула фосфолипида после ее связывания с белком [16].

Активность большинства PLA2 зависит от их способности взаимодействовать с липидными агрегатами. Способность проявлять ферментативную активность на границе двух фаз – отличительная способность фосфолипаз как ферментов. PLA2 группы IA способны гидролизовать биполярно-заряженные липиды. Мембран-связывающий участок PLA2 группы IA образован прежде всего гидрофобными остатками Tyr-3, Trp-61, Tyr-63, Phe-64, проникающими в липидный бислой [16]. Это позволяет получить доступ к липидному субстрату. Показано, что ряд замен гидрофобных аминокислот в сайте связывания мембраны влечет за собой серьезные последствия. Так, замена Trp-31 в PLA2 группы V ведет к потере способности связываться с фосфолипидными везикулами [17]. Замена Tyr-67 в PLA2 группы X ведет к восьмикратному снижению способности связываться с фосфолипидными везикулами [18] и снижает скорость гидролиза.

При связывании с анионными фосфолипидными мембранами PLA2 участвуют, как и гидрофобные, так и положительно заряженные аминокислоты. Довольно большое количество положительно заряженных остатков находится на мембран-связывающем участке групп II PLA2. Показано, что Arg-6 и Arg-10 определяют специфичность группы IB PLA2 к анионным везикулам фосфолипида [19]. При этом для PLA2 яда пчелы (группа III PLA2) не характерно взаимодействие за счет положительно заряженных аминокислот. При замене пяти положительно заряженных аминокислот на нейтральные глутамины, мутанты не показывали значительных изменений при

связывании анионных везикул фосфолипидов [20]. Однако, при замене пяти положительно заряженных остатков на отрицательные глутаматы, мутанты связывали везикулы из фосфотидилхолина/фосфотидилсерина в 3000 раз слабее. Таким образом, если в данном конкретном случае положительный заряд не играет основную роль, замена его на строго отрицательный препятствует связыванию. Заряд на мембран-связывающем участке группы X PLA2 нейтральный, что объясняет их одинаковое сродство как к цвиттерионным, так и анионным фосфолипидам.

Для секреторных фосфолипаз характерно образование олигомерных структур, как при кристаллизации, так и в природных условиях. Триммеры панкреатической PLA2 в среднем имеют более положительный заряд на поверхности интерфазного взаимодействия. Для PLA2 яда гадюк, обладающих миотоксическим действием, также характерно образование олигомерных структур.

ФУНКЦИИ СЕКРЕТОРНЫХ ФОСФОЛИПАЗ A2

Ферменты sPLA2 не проявляют избирательности в отношении жирно-кислотного состава фосфолипидов, но показывают большее сродство к субстратам, содержащим отрицательно заряженные фосфолипиды (фосфатидную кислоту и фосфатидилглицерол) [20, 21].

Долгое время была известна только одна PLA2, присутствующая в панкреатической жидкости (группа IB). В 1989 г. была открыта и клонирована фосфолипаза группы IIA, содержащаяся в секреторных гранулах тромбоцитов, и концентрация которой значительно увеличивается в местах воспаления, в синовиальной жидкости при ревматоидном артрите [22]. Фосфолипазы, обнаруженные в ядах пчел и ящериц, были отнесены к группе III. Открытие белков групп IIC и V привело к пересмотру роли этого семейства белков в регуляции функций клеток и интенсивному поиску новых аналогов [23].

Конститутивную экспрессию sPLA2 можно обнаружить в различных клетках, участвующих в иммунных и воспалительных ответах: макрофагах, тучных клетках, фибробластах и тканях таких органов, как печень, селезенка, тимус, костный мозг, кишечник. Активность фермента на уровне клеток регулируется за счет его индукции различными воспалительными сигнальными молекулами (интерлейкин-1 и интерлейкин-6, факторы некроза опухоли, липополисахариды, интерферон- γ) [7].

Промотор гена IIA содержит нуклеотидные последовательности TATA и CAAT, а также последовательности связывания таких факторов транскрипции, как AP-1, C/EBP, CREB, NF- κ B, STAT, PPAR γ .

В некоторых клетках экспрессия sPLA2 зависит от предварительной активации цитозольной фосфолипазой. Глюкокортикоиды (стероидные противовоспалительные препараты) являются супрессорами экспрессии фосфолипазы ПА. Изменение экспрессии данного фермента чаще всего связано с модуляцией простагландиновой ветви каскада арахидоновой кислоты (рис. 3). Так, при стимуляции интерлейкином-1 и фактором некроза опухоли активировался как синтез и секреция фосфолипазы, так и синтез простагландина E2 и простагличина в мезангиальных или эндотелиальных клетках, соответственно [24].

Помимо участия в биосинтезе арахидоновой кислоты, секреторные фосфолипазы могут выступать в роли физиологически активных веществ. Так, в тучных клетках специфические ингибиторы секреторных фосфолипаз уменьшали стимулированную фактором роста нервов экспрессию циклооксигеназы-2. При этом неактивные мутантные варианты белка фосфолипазы также были способны вызывать экспрессию циклооксигеназы-2, независимо от ферментативных свойств фосфолипазы. В доказательство этого было показано, что существуют специфические белки, которые связываются с фосфолипазой типа IB (константа диссоциации образовавшегося комплекса 1 нмоль/л) и проявляют различные биологические эффекты [25].

За последующие 10 лет было обнаружено много белков, как растворимых, так и мембраносвязанных, способных взаимодействовать с секреторной фосфолипазой. Однако свойства «классического» рецептора, который при связывании с лигандом активирует систему внутриклеточной передачи сигнала, проявляет только один из этих белков. Это белок М-типа или sPLA2R [25]. Белковые последовательности sPLA2R показывают 75% гомологию среди разных видов млекопитающих. Молекулярная масса этих белков составляет 180–200 кДа, значительная часть белка расположена во внеклеточной области, в цитозоле находится последовательность из 40 аминокислотных остатков. Белок без этого цитозольного участка встречается в растворимой форме, показана его роль как ингибитора секреторных фосфолипаз. У человека sPLA2R экспрессирован в поджелудочной железе, лёгких и почках. Показана важная роль активации этого рецептора в развитии эндотоксического шока [5].

На рис. 4 показано, как изоформы фосфолипазы sPLA2-IB или sPLA2-X проявляют свою ферментативную активность, что приводит к появлению липидных медиаторов, а также выступают в роли высокоаффинных лигандов для рецептора, локализованного в плазматической мембране. Благодаря взаимодействию фосфолипазы с рецеп-

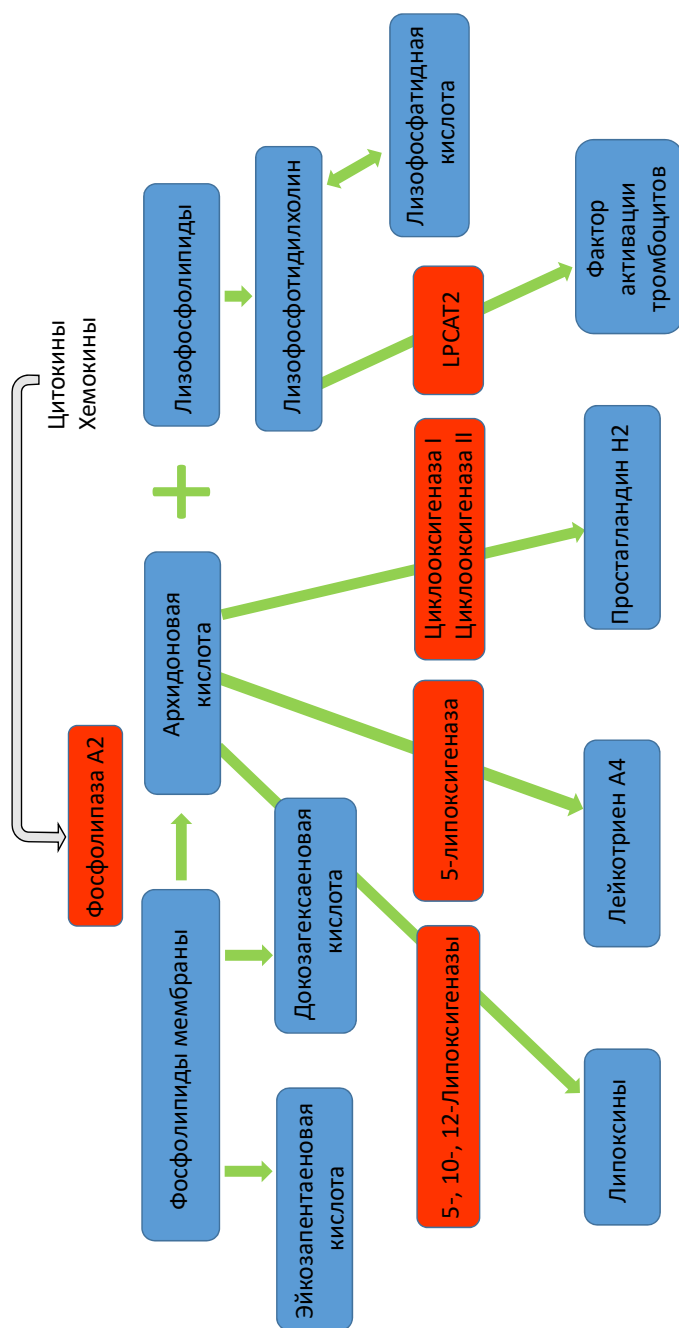


Рис. 3. Роль фосфолипаз A2 в регуляции воспалительных процессов.

Под влиянием PLA2 высвобождаются лизофосфотидилхолин, арахидоновая кислота, докозагексаеновая кислота, эйкозапентаеновая кислота, являющиеся в свою очередь предшественниками многочисленных провоспалительных медиаторов [113].

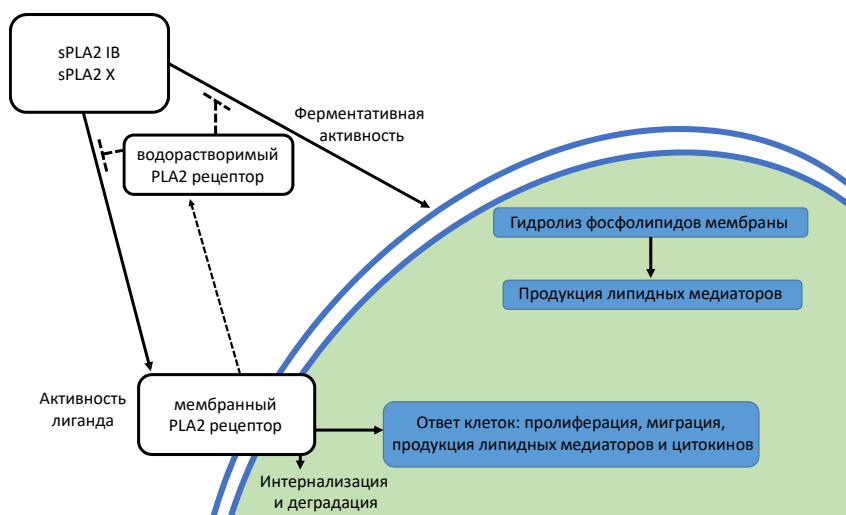


Рис. 4. Схема формирования липидных медиаторов под воздействием фосфолипазной активности [25].

тором мембраны происходит индукция митоген-активированных протеинкиназ и соответствующего внутриклеточного сигнала, что приводит к различным реакциям: пролиферации и миграции клеток, а также синтезу физиологически активных веществ. Рецептор сохраняет возможность связывать фосфолипазу даже при потере контакта с мембраной, что и позволяет ему стимулировать оба пути активации фосфолипазы [25].

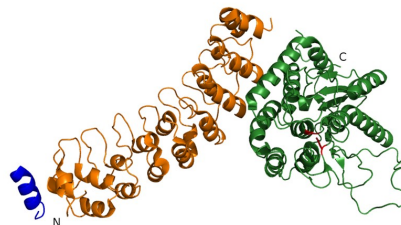
Секреторные фосфолипазы A2 являются важным компонентом змеиного яда [26]. Благодаря им обеспечиваются значительные цитотоксические эффекты, а некоторые из них обладают также нейротоксическими, гемотоксическими и антикоагулянтными активностями [27].

СТРУКТУРА КАЛЬЦИЙ-НЕЗАВИСИМЫХ ФОСФОЛИПАЗ A2

Кальций-независимые фосфолипазы A2 являются членами группы VI PLA2. Первый фермент был выделен из макрофагов в 1994 году [28]. Наиболее изученным ферментом является iVIA PLA2. Классическая кальций-независимая PLA2 (iPLA2-VIA) существует в олигомерной форме и имеет несколько вариантов, из которых, по крайней мере, два (VIA-1 и VIA-2) обладают ферментативной активностью. Белок iPLA2-VIA-1 имеет молекулярную массу 85 кДа, содержит анкириновый доменов в области N-конца, каталитический домен с харак-

Рис. 5. Трехмерная структура цитозольной человеческой фосфолипазы A2 (PDB ID 1CJY).

Структура ориентирована мембран-связывающими участками сверху. Кальций-связывающий домен C2 выделен оранжевым, каталитический домен выделен зеленым, остатки активного центра Ser228 и Asp549 выделены красным. Ионы кальция выделены синим. Подвижная «крышка» каталитического домена 415-432 выделена голубым цветом. PIP2 –связывающий участок выделен фиолетовым.



терной аминокислотной последовательностью Gly–x–Ser–x–Gly, где Ser519 действует как каталитический центр (рис. 5). Анкириновые домены встречаются у нескольких сотен белков. Обнаружено несколько вариантов сплайсинга гена iPLA2, в частности с различным количеством анкириновых повторов. Данный мотив участвует в белок-белковых взаимодействиях, позволяя интенсивно связываться с мембранными белками. С С-конца (в области аминокислотных остатков 694–705) существует связывающая область кальмодулина. Образование комплекса белка iPLA2-VIA с активированным кальмодулином (в присутствии ионов Ca^{2+}) приводит к инактивации данной фосфолипазы. VIA PLA2 проявляет как лизофосфолипазную активность, так и трансацилазную активность.

Обе формы VIA-1 и VIA-2 имеют АТФ-связывающие последовательности, однако, показано, что только у белка iPLA2-VIA-2 (но не iPLA2-VIA-1) при связывании с АТФ в несколько раз увеличивается активность [29].

Белок iPLA2-VIA присутствует в клетке в форме тетрамера. Так же показано образование димерных структур за счет взаимодействия каталитических доменов. Фосфолипаза iPLA2-VIA не специфична к жирнокислотному составу в положении sn-2 и заместителю в положении sn-3 фосфолипида; полностью активна в отсутствии кальция и способна осуществлять межфазный катализ. Фермент также проявляет лизофосфолипазную активность по положению sn-1, и, кроме этого, также трансацилазную активность.

Белок iPLA2-VIB содержит липазный мотив Gly–Val–Ser–Thr–Gly, где Ser483 находится в каталитическом центре, а АТФ-связывающий мотив и мотив сигнала локализации в пероксисомах – на С-конце молекулы. С-концы молекул, включая АТФ-связывающий

повтор и каталитический участок, белков iPLA2-VIB и iPLA2-VIA сходны. Отличия наблюдаются в N-концевой части белка, где у iPLA2-VIB нет анкириновых доменов, зато много сериновых и треониновых остатков, часть которых может фосфорилироваться протеинкиназами A и C, а также имеются пять участков Ser-Pro, которые являются мишенями для пролиновых киназ. Одна из этих последовательностей (Pro-Thr-Ser-Pro, остатки 269–272) является сайтом фосфорилирования митоген-активированными протеинкиназами. Наличие различных участков фосфорилирования у белков группы iPLA2-VI указывает на то, что роль белков iPLA2-VIA и iPLA2-VIB в клетках может отличаться. Обе кальций-независимые фосфолипазы (iPLA2-VIA и iPLA2-VIB) являются мембраносвязанными белками [30].

ФУНКЦИИ КАЛЬЦИЙ-НЕЗАВИСИМЫХ ФОСФОЛИПАЗ A2

Белки данного семейства играют большую роль в передаче трансмембранных сигналов, регулировании функций миокарда и ЦНС, апоптозе клеток [31]. Начальное представление о функциях iPLA2 было получено при помощи ингибитора iPLA2 бромоеноллактона [32]. Удалось установить, что iPLA2 играет важную роль в формировании костей, апоптозе, регуляции секреции инсулина, развитии сперматозоидов. При помощи нокаутных по iPLA2 мышей удалось прояснить роль кальций-независимой фосфолипазы A2 в развитии валлеровой дегенерации нервной ткани и регенерации аксонов [33].

СТРУКТУРА ЦИТОЗОЛЬНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ A2

Цитозольные PLA2 принадлежат к группе VI, имеют размер 85 кДа. В каталитическом центре для гидролиза используется серин, в отличие от большинства PLA2 которые используют гистидин. Внутриклеточные фосфолипазы относятся к кальций-зависимым ферментам. Как правило, это довольно крупные (700 и больше аминокислот) белковые молекулы, содержащие специфический C2 домен, участвующий в транспорте белка к клеточной мембране [34].

Изначально, фермент был выделен из человеческих нейтрофилов и тромбоцитов. Ген sPLA2 был секвенирован в 1991 году. Кристаллическая структура решена в 1999 году. Была показана роль Ca-связывающего домена C2 при взаимодействии с мембраной. Отдельный домен, представляющий из себя α/β гидролазу, содержит каталитический сайт (рис. 6). Фермент гидролизует субстрат через формирование интермедиата серин-ацил при участии каталитической диады Ser228/Asp549. Arg200 критически важен для связывания полярной головы фосфолипидного субстрата.

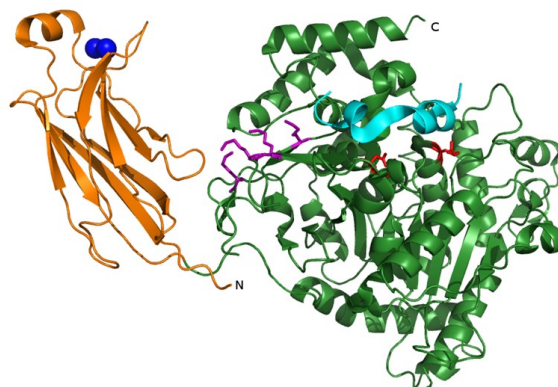


Рис. 6. Трехмерная структура кальций-независимой фосфолипазы A2 β (PDB ID 6AUN).

Каталитический домен выделен зеленым, остатки активного центра Ser465 и Asp598 выделены красным. Синим выделен неразрешенный участок анкиринового домена. Анкириновый домен выделен оранжевым.

Фермент cPLA2 – единственная известная фосфолипаза, специфичная к арахидоновой кислоте и предпочитающая субстраты, локализованные в мембране, а не находящиеся в мономерной форме в растворе. Эти свойства объясняются ее пространственной структурой: амфифильной «крышкой» (аминокислотного участка 415–432), которая не позволяет попасть в область активного центра остатку жирной кислоты фосфолипида, не локализованного на мембране. «Крышка» открывается при взаимодействии белка с анионными липидами мембраны [35].

Для того, чтобы фермент был активен, необходимо связывание с фосфолипидной мембраной. Это связывание может быть активировано тремя различными механизмами: кальций-зависимым связыванием с мембраной, связыванием липидных вторичных мессенджеров и фосфорилированием. Кальций необходим цитозольным PLA2 не для катализа, как это необходимо секреторным PLA2, а для связывания с мембраной. Консервативный кальций-связывающий C2 домен присутствует во множестве мембран-ассоциированных белков. Механизм работы кальций-связывающего домена хорошо изучен различными методами, такими как ЯМР, направленным мутагенезом, а также вычислительными методами.

Цитозольные PLA2 могут быть активированы различными вторичными мессенджерами, например, фосфотилиназитол-4,5-бисфосфатом, церамид-1-фосфатом. Сайт связывания PIP2 хорошо

идентифицирован при помощи сайт-направленного мутагенеза, за связывание ответственны остатки Lys 485, 541, 543 и 544 (рис. 6). Активация за счет PIP2 также требует C2 домена, хотя PIP2-связывающий участок полностью находится в каталитическом домене [36].

Фосфорилирование cPLA2 также играет важную роль в регуляции липид-белковых взаимодействий. Фосфорилированию подвергаются остатки Ser 505, Ser 515, Ser 727. За счет фосфорилирования cPLA2 повышается сродство к ионам Ca^{2+} , тем самым понижается концентрация кальция, необходимая для связывания с мембраной [37].

ФУНКЦИИ ЦИТОЗОЛЬНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ A2.

Несмотря на цитозольную локализацию, данный cPLA2a активно взаимодействует с мембранами цитоплазматического ретикулума и ядра. Основной его особенностью является специфичный гидролиз фосфолипидных субстратов, содержащих в sn-2 положении арахидоновую кислоту, что и определило основную функцию фермента в клетке.

Фосфолипазы данного типа в основном участвуют в клеточных сигнальных путях, в том числе, в индукции воспалительных реакций. Под действием фосфолипаз A2 в клетке может образовываться арахидоновая кислота, предшественник эйкозаноидов, лейкотриенов и простагландинов, выступающих в клетке в качестве сигнальных молекул [38].

Цитозольная фосфолипаза A2 присутствует во многих клетках и тканях: мозге, почках, селезенке, легких, макрофагах, нейтрофилах, альвеолярных эпителиальных клетках и др. Фермент активируется под действием митоген-активируемых протеинкиназ и протеинкиназы C. Различные внеклеточные цитокины, митогены, гормоны, нейромедиаторы, факторы роста, антигены, эндотоксины, а также определенные физические и стрессовые воздействия, включая ультрафиолетовый свет и окислительный стресс, индуцируют активацию и синтез данного фермента. Этому белку критично необходим Ca^{2+} для выполнения своей функции, но, в отличие от секреторных PLA2, концентрация его должна быть на три порядка ниже (0,3–2 μM). Ca^{2+} используется не для активации каталитического центра, а для гидрофобного взаимодействия фермента с мембранами или фосфолипидными мицеллами [37]. Основной особенностью cPLA2 является то, что он наиболее активно гидролизует фосфолипидные субстраты, содержащие во втором положении арахидоновую кислоту. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} индуцирует быструю миграцию cPLA2 в перинуклеарную область клетки [38]. Фермент не проявляет субстратной специфичности к функциональным группам

фосфолипида в положении sn-1, но обладает сильным сродством к фосфолипидам, содержащим арахидоновую кислоту в положении sn-2. Олеиновая (18:1) и линолевая (18:2) кислоты под действием cPLA2 слабо отщепляются от соответствующих фосфолипидов, но α -линолевая (18:3) и эйкозапентаеновая (20:5) кислоты имеют преимущество перед арахидоновой кислотой. Однако, поскольку их концентрация в клетках очень низка, то фосфолипиды с арахидоновой кислотой в положении sn-2 становятся основным субстратом.

Помимо основной активности, фермент проявляет и лизофосфолипазную активность, то есть способен отщеплять ацильную цепь из положения sn-1 лизофосфолипида. Предполагают, что это способствует защите клетки от повышенной концентрации лизофосфолипидов, при которой могут нарушаться функции мембран. Лизофосфолипазная активность не чувствительна к концентрации Ca^{2+} . Показано, что фермент может также проявлять трансацилазную активность. Биологическое значение этой активности изучается [39].

Открытие цитозольной PLA2 в конце 1980-х гг. дало толчок к изучению регуляции синтеза эйкозаноидов в организме при острой воспалительной реакции. Основными факторами, влияющими на активность цитозольной фосфолипазы, являются концентрация внутриклеточного Ca^{2+} и фосфорилирование этого фермента протеинкиназами [35]. Данные параметры меняются в течение нескольких секунд после связывания лигандов-агонистов с соответствующими клеточными рецепторами, что позволяет быстро и эффективно регулировать в клетке метаболизм арахидоновой кислоты и, соответственно, синтез эйкозаноидов [36].

Цитозольная фосфолипаза A2 имеет существенные отличия от секреторной, панкреатической фосфолипазы A2 и фермента, содержащегося в ядах змей и пчел. Молекулярная масса cPLA2 в 6 раз больше, для ее активации требуется на порядок более низкий уровень ионов кальция, чем в случае секреторной формы. Кроме того, цитозольная фосфолипаза A2 активируется под воздействием на клетки гормонов и агонистов через рецепторы, сопряженные с определенными G-белками, а также под влиянием ростовых факторов и увеличения уровня внутриклеточного кальция. Происходит транслокация фермента из цитоплазмы в мембрану с образованием вторичных метаболитов, таких как арахидоновая кислота и другие [40].

Важность cPLA2 в регуляции воспалительных процессов показана при помощи нокаута по гену GIVA PLA2 на мышах. Мыши показывали значительное снижение аллергического ответа, снижения воспаления на моделях ишемии головного мозга [41].

V. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ФОСФОЛИПАЗ A2

Выделяют следующие источники для получения природной фосфолипазы A2 [42]:

- животного происхождения (из поджелудочной железы млекопитающих – быка или свиньи), змеиного или пчелиного яда;
- микробного происхождения: *Mucor* – *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora crassa*; *Rhizomucor pusillus*; *Rhizopus* – *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia libertiana*; *Whetzelinia sclerotiorum*; *Dictyostelium*, например, *D. discoideum*; *Bacillus* – *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Escherichia*, например, *E. coli*; *Erwinia*, например, *E. herbicola*; *Streptomyces violaceoruber*;
- из штамма гифомицетов, принадлежащего к роду *Aspergillus*, например, штаммы *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. niger* или *A. oryzae*;
- от условно-патогенных для человека микроорганизмов: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Edwardsiella tarda*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*;
- от грибов рода *Fusarium*, например, штамма *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* или штамма *F. oxysporum*; *Trichophyton rubrum*, *Providencia stuartii*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*,

Предпочтительными источниками фосфолипазы A2 являются грибы рода *Fusarium* (в частности *F. venenatum* или *F. oxysporum*) и бактерии рода *Streptomyces* (например, *S. violaceoruber*).

Секреторная свиная панкреатическая фосфолипаза A2 выделялась как один из побочных продуктов при очистке инсулина и использовалась в различных технологических процессах. Однако в дальнейшем, с развитием методов белковой инженерии, появилась возможность экспрессировать рекомбинантную фосфолипазу A2 независимо.

Первые системы экспрессии рекомбинантной свиной PLA2 были созданы для *Saccharomyces cerevisiae* [14]. В дальнейшем была экспрессирована человеческая секреторная PLA2 в *E. coli* [15]. Так же был создан штамм-продуцент *A. niger*, экспрессирующий рекомбинантную свиную PLA2 с более высоким уровнем продукции, позволявшим использовать данный штамм для промышленного применения [43]. Затем была разработана система для промышленного производства человеческой фосфолипазы A2 в системе клеток яицников китайских хомячков CHO [44].

Была проведена оптимизация структуры свиной панкреатической PLA2, снижено количество дисульфидных связей, препятствующих

ее секреции. Данная конструкция была успешно экспрессирована в *Aspergillus* [45]. Введение в С-концевой участок замен триптофана N117W и тирозина D119Y позволило улучшить сродство PLA2 к мицеллам [46].

Использование системы экспрессии *Pichia pastoris* является успешной альтернативой экспрессии в клетках *E. coli* при промышленном получении рекомбинантной фосфолипазы A2. Применение экспрессионных систем грибов в целом показывают себя лучше именно в случае фосфолипаз A2, а гены грибов также проявляли себя лучше при рекомбинантной экспрессии [47].

На данный момент разработаны различные экспрессионные системы для синтеза секреторной фосфолипазы A2 в *Streptomyces violaceoruber* [48]. В 2015 году была охарактеризована рекомбинантная PLA2 из *Streptomyces*, экспрессированная в *P. pastoris* [49]. Для повышения эффективности производства были разработаны штаммы-продуценты с высоким числом копий гена, позволившие увеличить продукцию фермента в 1.4 раза [50].

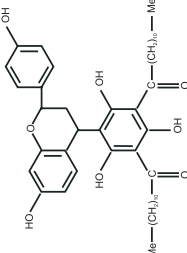
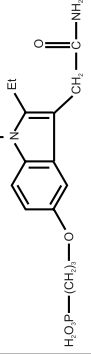
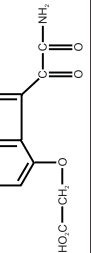
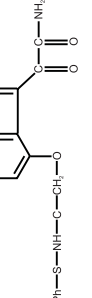
VI. ПРИМЕНЕНИЕ ФОСФОЛИПАЗ A2 В БИОТЕХНОЛОГИИ

РОЛЬ ФОСФОЛИПАЗ A2 В ТЕРАПИИ.

Потенциальное использование PLA2 в качестве фармакологической мишени связано с широким спектром процессов, в которых участвует PLA2 (рис. 3). Ингибиторы PLA2 могут использоваться для регуляции воспалительных процессов, лечения атеросклероза, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Показано увеличение экспрессии PLA2 при развитии различных патологий, связанных с усилением воспалительных процессов, прежде всего таких как артрит и атеросклероз [51, 52]. Разработка селективных ингибиторов ферментативной активности фосфолипаз может создать совершенно новый класс эффективных противовоспалительных веществ [53]. Для поиска ингибиторов секреторных фосфолипаз перспективно применение методов компьютерного моделирования, так как эти белки уже получены в кристаллическом состоянии и известны их трёхмерные структуры [54 [55]. Сложность потенциального терапевтического применения ингибиторов PLA2 связана с недостаточной эффективностью, демонстрируемой в доклинических и клинических исследованиях [56] (см. также ссылки в табл. 3).

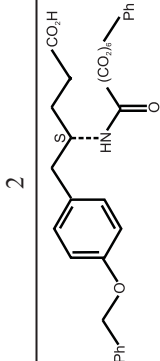
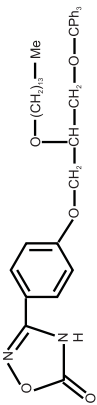
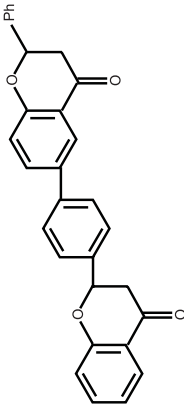
Наиболее значимые, специфичные и аффинные ингибиторы секреторных фосфолипаз A2 приведены в табл. 3.

Таблица 3. Ингибиторы секреторных PLA2.

Ингибитор	Структура	CAS	IC50 (nM)				Ссылки
			Группа IB sPLA2	Группа IIA sPLA2	Группа V sPLA2	Группа X sPLA2	
1	2	3	4	5	6	7	8
YM-2673		144337-18-8	Не тести- ровано	80	110	>1,600	[107, 108]
LY311727		164083-84-5	8,000	36	36	Не тести- ровано	[51]
LY315920 (Вареспладиб)		172732-68-2	Не тести- ровано	9-14	77	15	[51]
Ингибиторы производные индола (Com- round 11c)		258262-50-9	>1600	250	100	15	[109]

Окончание табл. 3 см. на сл. стр.

Окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6	7	8
KN064		393569-31-8	Не тести- ровано	29	>5,000	Не тести- ровано	[110]
(+)-3-O-[4-(4,5-dihydro-5-oxo-1,2,4-H-oxadiazol-3-yl)phenyl]-2-Otetradecyl-1-Otriphenylmethyl-glycerol		935851-73-3	575	900	660	1,250	[111]
2,2'-biphenyl-3,4'-diylbis(4H-chromen-4-one)		20081-60-1	>100,000	23,200	6,500	>100,000	[112]

*Структуры сгенерированы при помощи SciFinder по номеру CAS.

Известна роль повышенной концентрации фосфолипазы PAF-АН (Lp-PLA2) в качестве маркера ранних стадий сердечно-сосудистых заболеваний и атеросклероза [57, 58]. Представление о роли фосфолипазы PAF-АН как маркера сердечно-сосудистых заболеваний постоянно расширяется, показано отсутствие простой зависимости повышенной концентрации PAF-АН и течением соответствующего заболевания [59]. Ингибирование PAF-АН, как ацилгидролазы – фактора активации тромбоцитов, также испытывалось для лечения атеросклероза. Использование селективных ингибиторов PAF-АН, таких как дарапладиб, не продемонстрировало достаточной клинической эффективности в терапии атеросклероза [60].

Также существуют новые варианты использования PLA2 в фармацевтике. Предложен механизм доставки пролекарств внутрь клетки в виде жирорастворимых веществ, которые затем активируются фосфолипазами A2 [61].

ФОСФОЛИПАЗЫ В ПИЩЕВОЙ И АГРОПРОМЫШЛЕННОЙ ОТРАСЛИ

Фосфолипазы имеют важное значение для пищевой промышленности [62]. Наиболее типичные области использования фосфолипаз – производство пищевых масел, молочных продуктов и хлебобулочных изделий или эмульгаторов [63, 64, 65].

Использование секретируемой PLA2 из свиной поджелудочной железы или ядов змей имеет давние традиции в производстве яичного желтка для эмульгирования в майонезе, соусах, хлебопекарной промышленности или очистке растительных масел (табл. 4).

В настоящее время коммерческие продукты, содержащие фосфолипазы A2, можно найти под разными торговыми названиями:

- Lecitase® 10 L (Novozyme A/S, Denmark), фосфолипаза животного происхождения (из свиной поджелудочной железы), изначально разработанная для дегуммирования растительных масел;
- микробные фосфолипазы Rohalase® MPL (AB Enzymes, Germany) и Maxapal® A2 (DSM Food Specialties, The Netherlands) из штамма *A. niger* для улучшения эмульгирующих свойств яиц и яичного желтка;
- микробные фосфолипазы CakeZyme® и BakeZyme® DMS Food Specialties (The Netherlands) для пекарных целей;
- LysoMax® (Genencor, USA) из бактериального штамма *Streptomyces violaceoruber* для увеличения эмульгирующих свойств.

Наиболее распространенными штаммами для крупнотоннажного производства являются *Streptomyces sp.* и экспрессионная система *A. niger*. Эти штаммы занимают 80% всего производственного рынка дегуммирования масла [66].

Таблица 4. Использование фосфолипаз в пищевой промышленности.

Продуцент	Источник	Фосфолипаза	Применение
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>A. oryzae</i>	Фосфолипаза A1	Молочная промышленность
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Фосфолипаза A1	Молочная промышленность
<i>A. niger</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Фосфолипаза A1	Переработка масел и жиров, яичного желтка
<i>A. niger</i>	<i>Serratia sp.</i>	Фосфолипаза A1	Переработка масел и жиров, яичного желтка
<i>A. niger</i>	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	Фосфолипаза A2	Хлебобулочные изделия, переработка яичного желтка, масел и жиров, молочная промышленность
<i>A. niger</i>	<i>Sus scrofa</i>	Фосфолипаза A2	Хлебобулочные изделия, переработка яичного желтка, масел и жиров, молочная промышленность
Свиная поджелудочная железа	Свиная поджелудочная железа	Фосфолипаза A2	Переработка яичного желтка, масел и жиров
<i>A. niger</i>	<i>S. violaceoruber</i>	Фосфолипаза D	Получение модифицированного лецитина, переработка масел и жиров
<i>A. niger</i>	<i>S. netropsis</i>	Фосфолипаза D	Переработка масел и жиров
<i>P. pastoris</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	Фосфолипаза C	Переработка масел и жиров

ПРОИЗВОДСТВО ПИЩЕВЫХ МАСЕЛ.

При производстве масла из таких масличных культур, как подсолнечник, кукуруза, рапс, арахис, вне зависимости от способа экстракции, продукт после отжима неизбежно содержит примеси, такие как стеролы, токоферолы, углеводороды, пигменты, витамины, глюкозиды, гликолипиды, фрагменты белков и следы пестицидов и металлов. Данные примеси могут повлиять на качество, вкус, запах и внешний вид конечного продукта, поэтому важным этапом производства является очистка. Двумя основными методами очистки является химическое рафинирование щелочным раствором, физическая очистка путем дистилляции.

В рамках процесса очистки дегуммирование является необходимым предварительным этапом, предполагающим обработку сырого

Таблица 5. Использование фосфолипаз для промышленного дегуммирования растительных масел.

Продуцент	Организм	Фосфолипаза	Источник масла	Остаточное значение фосфата, Р* (мг/кг)	Эффективность дегуммации, %	Время инкубации, (ч)
Химическое дегуммирование водой			Соя	120	86	0,5
<i>E. coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Фосфолипаза С	Рапс	5,66	99,3	1,5
<i>E. coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Фосфолипаза С	Соя / Рис	3,70 / 4,50	99,53	н/д
<i>P. pastoris</i>	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	Фосфолипаза А2	Рапс	20,74	97,58	6
<i>P. pastoris</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Фосфолипаза В	Соя / Арахис	4.96 / 3.54	99,42	5

* – расчет остаточного количества фосфора в очищенном масле позволяет оценить эффективность работы фосфолипазы при очистке от фосфолипидов. Изначальное значение содержания фосфора в необработанном соевом масле составляет от 720 до 1000 мг/кг в зависимости от места производства.

продукта отжима для удаления фосфатидов [66, 67]. В процессе дегуммирования фосфатиды переходят в гидратированные смолы, нерастворимые в масле и легко выпадающие в осадок. Традиционные способы включают дегуммирование водой и кислотами: многостадийный процесс, предполагающий использование кислот, большого количества воды и образование смол в качестве побочного продукта. Использование каустической соды для промышленного дегуммирования растительных масел ведет к появлению побочных эффектов на окружающую среду [66].

Ферментативное дегуммирование, проводимое с использованием фосфолипаз, имеет ряд преимуществ в сравнении с традиционным процессом [67]. Обработка сырого продукта ферментами и последующее отделение водной фракции, содержащей гидролизованные фосфатиды, намного экологичнее, проводится в мягких условиях, требует гораздо меньшего объема воды и кислот, а также снижает количество отходов. Использование ферментативного дегуммирования также позволяет добиться более высокой степени очистки масла (табл. 5).

Ферменты могут использоваться повторно, что повышает выход продукта и снижает эксплуатационные затраты. Поэтому использование фосфолипаз в масличной промышленности представляется привлекательной альтернативой используемой традиционной методике дегуммирования. Использование фосфолипаз для промышленного дегуммирования растительного масла позволяет снизить расход воды и снизить выброс CO_2 в атмосферу на 12000 тонн CO_2 ежегодно [66].

Ранее были получены результаты, указывающие на то, что использование фосфолипаз A2 позволяет улучшить выход и уменьшить потери перед рафинированием рапсового масла [68]. Существуют различные механизмы, позволяющие стабилизировать фермент и его активность при дегуммировании, например, его иммобилизация [69].

ХЛЕБОПЕКАРНАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ.

В настоящее время еще одной перспективной областью использования фосфолипаз является хлебопекарная промышленность. Для преодоления трудностей с переработкой, низкими объемами и неприемлемым качеством сырья используют различные способы, в том числе и внесение ферментов типа амилаз, оксидаз, гемицеллюлаз и протеаз в процессе приготовления теста. Важно отметить, что среди всех ферментов, используемых в пищевой промышленности, треть идет на нужды хлебопекарной промышленности.

В составе теста относительно небольшое количество липидов (2–2,8% сухого вещества в пшеничной муке), однако они сильно влияют на стабильность пузырьков воздуха в составе теста, что объясняется их способностью образовывать липидные монослои на границе фаз газ/жидкость, тем самым увеличивая воздушность теста. К сожалению, это количество липидов недостаточно для существенного влияния на качество теста и конечных продуктов. Поэтому для обеспечения качества продуктов и увеличения срока хранения хлебобулочных изделий необходимы экзогенные липиды или эмульгаторы. Эти вещества способствуют стабилизации пузырьков воздуха, что приводит к увеличению объема хлеба, усилению клейковины, укреплению структуры и увеличению срока хранения.

Фосфолипазы в производстве хлеба необходимы для расщепления фосфолипидов и галактолипидов (экзогенных или уже содержащихся в муке) с образованием лизолипидов. Последние обладают эмульгирующими свойствами, что способствует увеличению качества и срока хранения хлеба. Не все липазы одинаково эффективны, и использо-

вание фосфолипаз может быть более эффективным подходом для улучшения качества и объема хлеба. Поэтому в последние годы появляются различные исследования по использованию фосфолипаз (PLA1 и PLA2) в хлебопечении. Предполагается, что необходимое количество фермента зависит от качества пшеничной муки, типа готового выпеченного продукта, способа производства хлеба и пропорций ингредиентов [70]. Последние годы активно развиваются методы, связанные с иммобилизацией фосфолипазы A2 на различные носители, с целью увеличения продуктивности производства лизолецитина и фосфолипидов [71].

МОЛОЧНАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ.

Еще одна важная отрасль использования фосфолипаз – переработка молочных продуктов для улучшения стабильности жиров или увеличения выхода сыра, масла и мороженого. Традиционные способы применения ферментов включают ускорение процесса созревания сыра или производство липолизированного молочного жира для использования в качестве ароматизатора в сливочном масле, кофе, сыре или шоколаде.

Молоко представляет собой сложную эмульсию, основной составляющей которой является вода. Так же в состав молока входят белки, жиры, углеводы и различные соли. Липиды присутствуют в виде дисперсных капель, стабилизирующих глобулы с молочным жиром, препятствуя коагуляции. При изготовлении сухого молока молекулы фосфолипидов покрывают частицы порошка, улучшая термостабильность восстановленного молока, а мороженому (являющемуся пеной или эмульсией, включающей кристаллы льда и незамерзшую фракцию с белками) фосфолипиды придают дополнительный объем и устойчивость.

В производстве сыров типа моцарелла использование коммерческого продукта YieldMAX® компании Novozymes A/S, состоящего из фосфолипаз типа PLA1, PLA2 и PLB, на 0,7-3,8% увеличило выход сыра. Эмульгирующие свойства лизофосфолипидов в составе сыра выше, чем у фосфолипидов, вследствие чего большее количество молочного жира и белков захватывалось сырной массой, а не оставалось в сыворотке. Кроме того, было показано, что использование фосфолипаз в производстве сыров с пониженным содержанием жира (<5% в сухом веществе) также способствует увеличению выхода продукта [72].

Другой фосфолипазный препарат FoodPro CLEANLINE от Danisco A/S обладает активностью ацилтрансферазы, катализируя

перенос ацильных групп из sn-2 позиции холестерина молока, что приводит к образованию лизо-фосфолипидов и сложных эфиров. Эти лизофосфолипиды имеют высокую поверхностную активность, что приводит к уменьшению количества продуктов тепловой обработки молока (карамелизованных белков) на стенках емкостей, то есть, к уменьшению затрат на их очистку [73].

ОБРАБОТКА ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА

Эмульсии составляют отдельный класс дисперсных систем, образованных из двух несмешивающихся жидкостей, одна из которых распределена в другой в виде мельчайших капелек. В зависимости от того, какая фаза находится в диспергированном состоянии, различают прямую (масло-вода) и обратную (вода-масло) эмульсии. По концентрации дисперсной фазы эмульсии подразделяют на разбавленные, концентрированные и высококонцентрированные.

Желток яйца является хорошим эмульгатором. Эмульгирующую способность, а, следовательно, и потребительские свойства, можно увеличить, предварительно обрабатывая его препаратами фосфолипазы A2 [74].

Эффективность эмульгатора оценивают по стойкости обратной эмульсии во времени. Обработку бесхолестеринового желтка проводили с использованием разных концентраций ферментного препарата: 0,003; 0,05; 0,1% к массе желтка. Увеличение дозы до 0,1% существенно не оказывает влияния на стойкость эмульсии. Для сравнения эмульсионной стойкости эмульсии необработанного желтка и ферментированного различной концентрации фосфолипазы готовили обратную эмульсию. Стойкость эмульсии нативного желтка без обработки определяется 15-ю минутами и далее со временем теряет свои свойства. При обработке желтка фосфолипазой различной концентрации стойкость обратной эмульсии увеличивается, причем зависит от доли ферментного препарата. Исследования показали, что наиболее эффективна обработка желтка препаратом фосфолипазы в концентрации 0,003% к массе желтка, при этом стойкость эмульсии составляла более 60 минут [66].

ПРИМЕНЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА В ПРОИЗВОДСТВЕ МАЙОНЕЗА

Майонезы в основном относятся к концентрированным эмульсиям. Такие эмульсии устойчивы лишь в присутствии третьего компонента – эмульгатора, являющегося поверхностно-активным веществом (ПАВ). Согласно правилу Гиббса, ПАВ адсорбируется на поверхности раздела

фаз с образованием адсорбционной оболочки, которая резко меняет интенсивность молекулярного взаимодействия соприкасающихся частиц.

Механизм эмульгирования заключается в образовании капелек дисперсной фазы в дисперсионной среде и их стабилизации в результате адсорбции на поверхности эмульгатора. Для получения устойчивых концентрированных эмульсий эмульгаторы должны обладать одновременно поверхностной активностью и способностью образовывать структурированные коллоидно-адсорбционные слои. Отсюда следует, что правильный выбор эмульгатора во многом определяет качество и стабильность эмульсий.

Для изготовления майонезов в качестве эмульгаторов традиционно используется яичный желток, богатый лецитином и другими фосфолипидами, обладающими ярко выраженными эмульгирующими свойствами. Попытки применения замены яичного желтка различными синтетическими аналогами типа моно- и диглицеридов успехом не увенчались, так как они сильно изменяли органолептику майонеза и снижали его пищевую ценность. Однако при использовании яичного желтка в промышленном производстве возникают проблемы, связанные с недостаточной температурной и механической устойчивостью продукта. На практике это приводит к тому, что при повышении температуры процесса или увеличении давления в гомогенизаторе яичный желток начинает резко утрачивать свои эмульгирующие свойства. Кроме того, при изготовлении высокожирных майонезов не удавалось достичь достаточной вязкости продукта, и приходилось либо значительно увеличивать дозировку желтка, либо активно использовать другие структурообразователи (например, гидроколлоиды), что не всегда экономически целесообразно [75].

В связи с вышеизложенным в производстве майонеза стояла проблема поиска подходящего эмульгатора, который, сохраняя традиционный вкус и запах майонеза, позволял бы получать стойкие эмульсии в высокотемпературных условиях, с заданной вязкостью и возможностью длительного срока хранения. Таким продуктом стал яичный желток, ферментатически модифицированный фосфолипазой A2. Суть модификации состоит в превращении лецитина яичного желтка путем гидролиза в лизолецитин под действием фермента фосфолипазы A2. Лизолецитин (1-ацилглицеро-3-фосфорилхолин) – продукт отщепления от лецитина одной молекулы жирной кислоты во втором положении. Степень гидролиза может достигать 75% [76].

В настоящий момент в производственных процессах чаще всего задействовано два основных вида фосфолипаз: А2 животного происхождения (поджелудочная железа свиньи) и А1 микробного (грибы рода *A. oryzae*). Различие заключается в том, что А2 отщепляет жирную кислоту во втором положении, а А1 – в первом. Позднее было продемонстрировано, что в лизолецитине происходит ацильная миграция, и частично гидролизированный яичный желток содержит смесь лизофосфолипидов sn-1 и sn-2 в соотношении 9:1, при этом не важно, каким видом фермента желток был обработан. Однако из-за асимметричности расположения жирных кислот в фосфолипидах яичного желтка (насыщенные – в положении sn-1, ненасыщенные – в положении sn-2) майонез на основе желтка, обработанного фосфолипазой А2, имеет большую вязкость, чем обработанный фосфолипазой А1. Поэтому, несмотря на более высокую цену для производства яичных продуктов, предпочтительнее использовать фосфолипазу А2 [76].

Основные отличительные свойства ферментированного фосфолипазой желтка заключаются в его способности стабилизировать окружающие и защищающие диспергированные капли масла на поверхности раздела фаз эмульсии. Ферментация позволяет эмульсии находиться в стабильном состоянии при высоких температурах (выше 100°C), когда молекулы образующих веществ существуют в высокоэнергетическом состоянии. Это дает возможность вести производственный процесс в широком температурном диапазоне, не опасаясь нарушения образования эмульсии. Кроме того, применение ферментированного желтка позволяет проводить стерилизацию готового майонеза при высоких температурах с целью получения продукта сверхдолгого хранения. Взаимодействие ферментированного желтка со структурообразователями, такими как гуаровая и ксантановая камеди, альгинаты и модифицированные крахмалы происходит в основном по пути синергизма. Это связано с тем, что все вышеперечисленные агенты создают в растворах пространственные решетки на основе полярных групп молекул, с которыми связываются лизофосфолипиды желтка, что делает эмульсию более прочной. Такой эффект позволяет существенно снижать дозировки структурообразователей при использовании ферментированного желтка [77].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фосфолипазы A2 имеют большое биологическое значение для живых организмов. Использование фосфолипазы A2 и ее ингибиторов открывает новые возможности в терапии и диагностике сердечно-сосудистых заболеваний и артрита. Кроме того, фосфолипазы A2, являясь семейством ферментов с широким набором функций и задач, находят применение в современной биотехнологической и пищевой промышленности.

Исследование и разработка методов экспрессии новых стабильных рекомбинантных фосфолипаз имеет важное научное и прикладное значение. Использование рекомбинантных фосфолипаз ведет к улучшению качества и выхода продукции в хлебопекарной, молочной продукции. С использованием рекомбинантной фосфолипазы достигается увеличение выходов и чистоты при использовании ферментативного дегуммирования растительных масел, снижается расход использования промышленных вод и выбросов CO₂ в атмосферу.

Говоря о перспективах использования фосфолипаз A2, необходимо подчеркнуть, что с использованием методов белковой инженерии, можно создавать индивидуальные фосфолипазы, оптимизированные и стабилизированные под конкретный индустриальный процесс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aloulou, A., Ali, Y.B., Bezzine, S., Gargouri, Y., Gelb, M.H. (2012) Phospholipases: an overview. In *Lipases and phospholipases*, pp 63–85, Springer.
2. Литвиенко, Н.М., Кисель, М.А. (1991) Эндогенные фосфолипазы A2. Структура и функции, М.: Наука и техника, 17–21.
3. Woolley, P., Petersen, S. B. (1996) Lipases: their structure, biochemistry and application. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **28**, 831–832.
4. Брокерхоф, Х., Дженсен, Р. (1978) Липолитические ферменты: Москва, изд-во Мир. 396 стр.
5. Cocco, L., Follo, M.Y., Manzoli, L., Suh, P.G. (2015) Phosphoinositide-specific phospholipase C in health and disease. *Journal of Lipid Research*, **56**, 1853–1860.
6. Gresset, A., Sondek, J., Harden, T.K. (2012) The phospholipase C isozymes and their regulation. In *Phosphoinositides I: Enzymes of Synthesis and Degradation*, pp 61–94, Springer.
7. Gomez-Cambronero, J. (2014) Phospholipase D in cell signaling: from a myriad of cell functions to cancer growth and metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 22557–22566.
8. Cho, J.H., Han, J.-S. (2017) Phospholipase D and its essential role in cancer. *Molecules and Cells*, **40**, 805.
9. Bruntz, R.C., Lindsley, C.W., Brown, H.A. (2014) Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic

- acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacological Reviews*, **66**, 1033–1079.
10. Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, **15**, 29–63.
 11. Nakazawa, Y. (2012) Streptomyces phospholipase D cloning and production. In *Lipases and Phospholipases*, pp 179–200, Springer.
 12. Leslie, C.C. (2004) Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, **70**, 373–376.
 13. Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K., Kudo, I. (2017) Regulatory Functions of Phospholipase 2. *Critical Reviews in Immunology*, **37**, 121–179.
 14. van den Bergh, C.J., Bekkers, A.C., De Geus, P., Verheij, H.M., de Haas, G.H. (1987) Secretion of biologically active porcine prophospholipase A2 by *Saccharomyces cerevisiae*. Use of the prepro sequence of the alpha-mating factor. *European Journal of Biochemistry*, **170**, 241–246.
 15. Kramer, R. M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., McGray, P., Chow, E. P., Tizard, R., Pepinsky, R. B. (1989) Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 5768–5775.
 16. Burke, J.E., Karbarz, M.J., Deems, R.A., Li, S., Woods, V.L., Dennis, E.A. (2008) Interaction of Group IA Phospholipase A2 with Metal Ions and Phospholipid Vesicles Probed with Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Biochemistry*, **47**, 6451–6459.
 17. Han, S.K., Kim, K.P., Koduri, R., Bittova, L., Munoz, N.M., Leff, A.R., Wilton, D. C., Gelb, M. H., Cho, W. (1999) Roles of Trp³¹ in High Membrane Binding and Proinflammatory Activity of Human Group V Phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 11881–11888.
 18. Bezzine, S., Bollinger, J.G., Singer, A.G., Veatch, S.L., Keller, S.L., Gelb, M.H. (2002) On the Binding Preference of Human Groups IIA and X Phospholipases A2 for Membranes with Anionic Phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 48523–48534.
 19. Pan, Y.H., Bahnson, B.J. (2010) Structure of a premicellar complex of alkyl sulfates with the interfacial binding surfaces of four subunits of phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, **1804**, 1443–1448.
 20. Bollinger, J.G., Diraviyam, K., Ghomashchi, F., Murray, D., Gelb, M.H. (2004) Interfacial Binding of Bee Venom Secreted Phospholipase A2 to Membranes Occurs Predominantly by a Nonelectrostatic Mechanism. *Biochemistry*, **43**, 13293–13304.
 21. Murakami, M., Sato, H., Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y. (2015) A new era of secreted phospholipase A2 (sPLA2). *Journal of Lipid Research*, **56**, 1248–1261.
 22. Sato, H., Taketomi, Y., Murakami, M. (2016) Metabolic regulation by secreted phospholipase A 2. *Inflammation and Regeneration*, **36**, 7.
 23. Nambi, V., Ballantyne, C. M. (2006) Lipoprotein-associated phospholipase A 2: Pathogenic mechanisms and clinical utility for predicting cardiovascular events. *Current Atherosclerosis Reports*, **8**, 374–381.
 24. Ishizaki, J., Hanasaki, K., Higashino, K., Kishino, J., Kikuchi, N., Ohara, O., Arita, H. (1994) Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A2 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 5897–5904.

25. Lambeau, G., Ancian, P., Barhanin, J., Lazdunski, M. (1994) Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 1575–1578.
26. Hanasaki, K., Arita, H. (2002) Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, **68**, 71–82.
27. Fry, B.G. (2005) From genome to «venome»: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Research*, **15**, 403–420.
28. Kini, R.M. (2005) Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon*, **45**, 1147–1161.
29. Ackermann E.J., Kempner E.S., Dennis E.A., (1994) Ca(2+)-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 9227–9233.
30. Burke, J.E., Dennis, E.A. (2009) Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of Lipid Research*, **50**, S237–S242.
31. Elimam, H., Papillon, J., Takano, T., Cybulsky, A. V. (2013) Complement-mediated Activation of Calcium-independent Phospholipase A2 γ role of protein kinases and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 3871–3885.
32. Ramanadham, S., Ali, T., Ashley, J.W., Bone, R.N., Hancock, W.D., Lei, X. (2015) Calcium-independent phospholipases A2 (iPLA2s) and their roles in biological processes and diseases. *Journal of Lipid Research*, **56**(9), 1643–1668.
33. Frei, E., Zahler, P. (1979) Phospholipase A2 from sheep erythrocyte membrane Ca²⁺ dependence and localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **550**, 450–463.
34. López-Vales, R., Navarro, X., Shimizu, T., Baskakis, C., Kokotos, G., Constantinou-Kokotou, V., Stephens, D., Dennis, E.A., David, S. (2008) Intracellular phospholipase A2 group IVA and group VIA play important roles in Wallerian degeneration and axon regeneration after peripheral nerve injury. *Brain*, **131**, 2620–2631.
35. Kramer, R.M., Sharp, J.D. (1997) Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Letters*, **410**, 49–53.
36. Leslie, C. C. (2015) Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *Journal of Lipid Research*, **56**(8), 1386–1402.
37. Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J.D., Seehra, J., Somers, W. S. (1999) Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*, **97**, 349–360.
38. Lichtenbergova, L., Yoon, E.T., Cho, W. (1998) Membrane penetration of cytosolic phospholipase A2 is necessary for its interfacial catalysis and arachidonate specificity. *Biochemistry*, **37**, 14128–14136.
39. Murakami, M. (2017) Lipoquality control by phospholipase A2 enzymes. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B*, **93**, 677–702.
40. Sun, G.Y., Chuang, D.Y., Zong, Y., Jiang, J., Lee, J.C., Gu, Z., Stimonyi, A. (2014) Role of cytosolic phospholipase A2 in oxidative and inflammatory signaling pathways in different cell types in the central nervous system. *Molecular Neurobiology*, **50**, 6–14.

41. Bonventre, J.V., Huang, Z., Taheri, M.R., O'Leary, E., Li, E., Moskowitz, M.A., Sapirstein, A. (1997) Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature*, **390**, 622–625.
42. Корнеева, О.С., Анненков, В. А. (2014) Получение ферментного препарата липазы методом рекомбинантных ДНК. Технологии Пищевой И Перерабатывающей Промышленности АПК–продукты Здорового Питания. *Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК–продукты здорового питания*, **3**, 59–62.
43. Roberts, I.N., Jeenes, D.J., MacKenzie, D.A., Wilkinson, A.P., Sumner, I.G., Archer, D.B. (1992) Heterologous gene expression in *Aspergillus niger*: a glucoamylase-porcine pancreatic phospholipase A2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme. *Gene*, **122**, 155–161.
44. Stadel, J.M., Jones, C., Livi, G.P., Hoyle, K., Kurdyla, J., Roshak, A., McLaughlin, M.M., Pfarr, D.A., Comer, S., Strickler, J. (1992) Recombinant human secretory phospholipase A2: purification and characterization of the enzyme for active site studies. *Journal of Molecular Recognition*, **5**, 145–153.
45. Vind, K. (2005) Preparing modified polypeptide comprising providing a sequence encoding a parent polypeptide comprising at least two Cys residues forming a disulfide bond. *Novozymes A/S*, WO2005/024012.
46. Janssen, M.J., Burghout, P.J., Verheij, H.M., Slotboom, A.J., Egmond, M.R. (1999) Introduction of a C-terminal aromatic sequence from snake venom phospholipases A2 into the porcine pancreatic isozyme dramatically changes the interfacial kinetics. *European Journal of Biochemistry*, **263**, 782–788.
47. Nevalainen, K.M.H., Te'o, V.S.J., Bergquist, P.L. (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, **23**, 468–474.
48. Sugiyama, M., Ohtani, K., Izuhara, M., Koike, T., Suzuki, K., Imamura, S., Misaki, H. (2002) A novel prokaryotic phospholipase A2. Characterization, gene cloning, and solution structure. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 20051–20058.
49. Liu, A., Yu, X.-W., Sha, C., Xu, Y. (2015) *Streptomyces violaceoruber* phospholipase A2: expression in *Pichia pastoris*, properties, and application in oil degumming. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **175**, 3195–3206.
50. Yu, X.-W., Sun, W.-H., Wang, Y.-Z., Xu, Y. (2017) Identification of novel factors enhancing recombinant protein production in multi-copy *Komagataella phaffii* based on transcriptomic analysis of overexpression effects. *Scientific Reports*, **7**, 16249.
51. Boilard, E., Lai, Y., Larabee, K., Balestrieri, B., Ghomashchi, F., Fujioaka, D., Gobeze, R., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., et al. (2010) A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Molecular Medicine*, **2**, 172–187.
52. Rosenson, R.S., Hurt-Camejo, E. (2012) Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis. *European Heart Journal*, **33**, 2899–2909.
53. Quach, N.D., Arnold, R.D., Cummings, B.S. (2014) Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochemical Pharmacology*, **90**, 338–348.

54. Брагина, Н.А., Чупин, В.В., Булгаков, В.Г., Шальнев, А.Н. (1999) Липидные ингибиторы фосфолипазы А2. *Биоорганическая Химия*, **25**, 83–96.
55. Thompson, W., Oslund, R.C., Bollinger, J., Ewing, H., Gelb, M.H. (2012) High-Throughput Assay of Secreted Phospholipases A 2 Inhibitors. In *Lipases and Phospholipases*, pp 149–158, Springer.
56. Fraser, H., Hislop, C., Christie, R.M., Rick, H.L., Reidy, C.A., Chouinard, M.L., Eacho, P.I., Gould, K.E., Trias, J. (2009) Varespladib (A-002), a secretory phospholipase A2 inhibitor, reduces atherosclerosis and aneurysm formation in ApoE^{-/-} mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **53**, 60–65.
57. O'Donoghue, M.L., Braunwald, E., White, H.D., Steen, D.P., Lukas, M.A., Tarka, E., Steg, P.G., Hochman, J.S., Bode, C., Maggioni, A.P., et al. (2014) Effect of darapladib on major coronary events after an acute coronary syndrome: the SOLID-TIMI 52 randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association*, **312**, 1006–1015.
58. Wilensky, R.L., Macphee, C.H. (2009) Lipoprotein-associated phospholipase A2 and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, **20**, 415–420.
59. Lp-PLA(2) Studies Collaboration, Thompson, A., Gao, P., Orfei, L., Watson, S., Di Angelantonio, E., Kaptoge, S., Ballantyne, C., Cannon, C.P., Criqui, M., et al. (2010) Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet*, **375**, 1536–1544.
60. Li, J., Wang, H., Tian, J., Chen, B., Du, F. (2018) Change in lipoprotein-associated phospholipase A2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndrome. *Medicine (Baltimore)*, **97**, e11517.
61. Markovic, M., Ben-Shabat, S., Keinan, S., Aponick, A., Zimmermann, E.M., Dahan, A. (2019) Molecular Modeling-Guided Design of Phospholipid-Based Prodrugs. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 2210.
62. Fernandes, P. (2010) Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Research*, **2010**, 862537.
63. Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalya, S. B., Abraham, A., Mathew, A.K., Madhavan, A., Rebello, S., Pandey, A. (2018) Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technology and Biotechnology*, **56**, 16–30.
64. De Maria, L., Vind, J., Oxenbøll, K.M., Svendsen, A., Patkar, S. (2007) Phospholipases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**, 290–300.
65. Алексеенко, А.В. и Предыбайло, А.В. (2008) Перезтерификация масел и жиров. *Пищевые ингредиенты: сырье и добавки*, **11**, 24.
66. Borrelli, G., Trono, D. (2015) Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 20774–20840.
67. Dijkstra. (2010) Enzymatic degumming. *European Journal of Lipid Science*, **112**, 1178–1189.
68. Yang, B., Wang, Y.-H., Yang, J.-G. (2006) Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **83**, 653–658.

69. Yu, D., Ma, Y., Jiang, L., Walid, E., He, S., He, Y., Xiaoyu, Z., Zhang, J., Hu, L. (2014) Stability of soybean oil degumming using immobilized phospholipase A(2). *Journal of Oleo Science*, **63**, 25–30.
70. Casado, V., Martín, D., Torres, C., Reglero, G. (2012) Phospholipases in food industry: a review. In *Lipases and Phospholipases*, pp 495–523, Springer.
71. Madoery, R., Gattone, C.G., Fidelio, G. (1995) Bioconversion of phospholipids by immobilized phospholipase A2. *The Journal of Biotechnology*, **40**, 145–153.
72. Lilbaek, H.M., Broe, M.L., Høier, E., Fatum, T.M., Ipsen, R., Sørensen, N.K. (2006) Improving the yield of Mozzarella cheese by phospholipase treatment of milk. *Journal of Dairy Science*, **89**, 4114–4125.
73. Берестова, А.В., Зинюхин, Г.Б., Межуева, Л.В. (2014) Особенности технологии пищевых масложировых эмульсий функционального назначения. *Вестник Оренбургского Государственного Университета*, **162**, 150–155.
74. Karray, A., Gargouri, Y., Verger, R., Bezzine, S. (2012) Phospholipase A2 purification and characterization: a case study. In *Lipases and Phospholipases*, pp 283–297, Springer.
75. Käämbre, T., Tõugu, V., Käämbre, P., Vija, H., Sikk, P. (1999) Hydrolysis of emulsified mixtures of triacylglycerols by pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1431**, 97–106.
76. Старовойтова, К. В., Терещук, Л. В. (2018) Разработка рецептур майонеза с учетом основных тенденций совершенствования ассортимента. *Техника и технология пищевых производств*, **48**(1), 92–98.
77. Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 235–251.
78. Aoki, J., Inoue, A., Makide, K., Saiki, N., Arai, H. (2007) Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie*, **89**, 197–204.
79. Richmond, G. S., Smith, T. K. (2011) Phospholipases A1. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 588–612.
80. Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., Okada, K. (2001) The defective defective in anther dehiscence gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell*, **13**, 2191–2209.
81. Murayama, K., Kano, K., Matsumoto, Y., Sugimori, D. (2013) Crystal structure of phospholipase A1 from *Streptomyces albidoflavus* NA297. *Journal of Structural Biology*, **182**, 192–196.
82. Schaloske, R.H., Dennis, E.A. (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1761**, 1246–1259.
83. Verlotta, A., Liberatore, M.T., Cattivelli, L., Trono, D. (2013) Secretory Phospholipases A2 in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.): Gene Expression, Enzymatic Activity, and Relation to Drought Stress Adaptation. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 5146–5169.
84. Matos, A.R., Pham-Thi, A.-T. (2009) Lipid deacylating enzymes in plants: old activities, new genes. *Plant*

- Physiology and Biochemistry*, **47**, 491–503.
85. Scherer, G.F.E., Ryu, S.B., Wang, X., Matos, A.R., Heitz, T. (2010) Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends in Plant Science*, **15**, 693–700.
 86. Köhler, G.A., Brenot, A., Haas-Stapleton, E., Agabian, N., Deva, R., Nigam, S. (2006) Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1761**, 1391–1399.
 87. Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., Tijssen, P. (2001) A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Developmental Cell*, **1**, 291–302.
 88. Xu, S., Zhao, L., Larsson, A., Venge, P. (2009) The identification of a phospholipase B precursor in human neutrophils. *FEBS Journal*, **276**, 175–186.
 89. Kim, D.K., Lee, H.J., Lee, Y. (1994) Detection of two phospholipase A2(PLA2) activities in leaves of higher plant *Vicia faba* and comparison with mammalian PLA2's. *FEBS Letters*, **343**, 213–218.
 90. Helmy, M., Lombard, S., Piéroni, G. (1999) Ricin RCA60: evidence of its phospholipase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **258**, 252–255.
 91. Djordjevic, J.T. (2010) Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development – lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*, **1**, 125.
 92. Morgan, C.P., Insall, R., Haynes, L., Cockcroft, S. (2004) Identification of phospholipase B from *Dictyostelium discoideum* reveals a new lipase family present in mammals, flies and nematodes, but not yeast. *Biochemical Journal*, **382**, 441–449.
 93. Jiang, F., Huang, S., Imadad, K., Li, C. (2012) Cloning and expression of a gene with phospholipase B activity from *Pseudomonas fluorescens* in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, **104**, 518–522.
 94. Masayama, A., Kato, S., Terashima, T., Mølgaard, A., Hemmi, H., Yoshimura, T., Moriyama, R. (2010) *Bacillus subtilis* spore coat protein LipC is a phospholipase B. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**, 24–30.
 95. Matsumoto, Y., Mineta, S., Murayama, K., Sugimori, D. (2013) A novel phospholipase B from *Streptomyces* sp. NA684 – purification, characterization, gene cloning, extracellular production and prediction of the catalytic residues. *FEBS Journal*, **280**, 3780–3796.
 96. Gresset, A., Sondek, J., Harden, T.K. (2012) The phospholipase C isozymes and their regulation. In *Phosphoinositides I: Enzymes of Synthesis and Degradation*, pp. 61–94, Springer.
 97. Szumiło, M., Rahden-Staroń, I. (2008) [Biological role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in mammalian cells]. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **62**, 593–598.
 98. Pokotylo, I., Kolesnikov, Y., Kravets, V., Zachowski, A., Ruelland, E. (2014) Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: variations around a canonical theme. *Biochimie*, **96**, 144–157.
 99. Pokotylo, I., Pejchar, P., Potocký, M., Kocourková, D., Krčková, Z., Ruelland, E., Kravets, V., Martinec, J. (2013) The plant non-specific phospholipase C gene family. Novel

- competitors in lipid signalling. *Progress in Lipid Research*, **52**, 62–79.
100. Selvy, P.E., Lavieri, R.R., Lindsley, C.W., Brown, H.A. (2011) Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chemical Reviews*, **111**, 6064–6119.
101. Khatoon, H., Mansfeld, J., Schierhorn, A., Ulbrich-Hofmann, R. (2015) Purification, sequencing and characterization of phospholipase D from Indian mustard seeds. *Phytochemistry*, **117**, 65–75.
102. Waksman, M., Tang, X., Eli, Y., Gerst, J.E., Liscovitch, M. (1997) Identification of a novel Ca²⁺-dependent, phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in yeast bearing a disruption in PLD1. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 36–39.
103. Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magriotti, V., Kokotos, G. (2011) Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical Reviews*, **111**, 6130–6185.
104. Canaan, S., Zádori, Z., Ghomashchi, F., Bollinger, J., Sadilek, M., Moreau, M. E., Tijssen, P., Gelb, M. H. (2004) Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 14502–14508.
105. Soragni, E., Bolchi, A., Balestrini, R., Gambaretto, C., Percudani, R., Bonfante, P., Ottonello, S. (2001) A nutrient-regulated, dual localization phospholipase A(2) in the symbiotic fungus *Tuber borchii*. *EMBO Journal*, **20**, 5079–5090.
106. Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Lazdunski, M., Lambeau, G. (2000) Novel human secreted phospholipase A(2) with homology to the group III bee venom enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 7492–7496.
107. Oslund, R.C., Cermak, N., Verlinde, C.L.M.J., Gelb, M.H. (2008) Simplified YM-26734 inhibitors of secreted phospholipase A2 group IIA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **18**, 5415–5419.
108. Oslund, R. C., Cermak, N., Gelb, M.H. (2008) Highly specific and broadly potent inhibitors of mammalian secreted phospholipases A2. *Journal of Medicinal Chemistry*, **51**, 4708–4714.
109. Levick, S., Loch, D., Rolfe, B., Reid, R.C., Fairlie, D.P., Taylor, S.M., Brown, L. (2006) Antifibrotic activity of an inhibitor of group IIA secretory phospholipase A2 in young spontaneously hypertensive rats. *Journal of immunology (Baltimore)*, **176**, 7000–7007.
110. Touaibia, M., Djimdé, A., Cao, F., Boilard, E., Bezzine, S., Lambeau, G., Redeuilh, C., Lamouri, A., Massicot, F., Chau, F., et al. (2007) Inhibition of secreted phospholipase A2. 4-glycerol derivatives of 4,5-dihydro-3-(4-tetradecyloxybenzyl)-1,2,4-oxadiazol-5-one with broad activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**, 1618–1626.
111. Iyer, A., Lim, J., Poudyal, H., Reid, R.C., Suen, J.Y., Webster, J., Prins, J.B., Whitehead, J.P., Fairlie, D.P., Brown, L. (2012) An Inhibitor of Phospholipase A2 Group IIA Modulates Adipocyte Signaling and Protects Against Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Diabetes*, **61**, 2320–2329.
112. Moon, T.C., Quan, Z., Kim, J., Kim, H.P., Kudo, I., Murakami, M., Park, H., Chang, H.W. (2007) Inhibitory effect of synthetic C-C biflavones on various phospholipase A(2)s

- activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 7138–7143.
113. Quach, N.D., Arnold, R.D., Cummings, B.S. (2014) Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochemical Pharmacology*, **90**, 338–348.