

Utvidet studie av PLA2-uttrykk i HaCaT-keratinocytter

Kari Ellen Hansen

Biologi

Oppgaven levert: Juni 2011

Hovedveileder: Berit Johansen, IBI

Biveileder(e): Astrid Jullumstrø Feuerherm, IBI
Thuy Nguyen, IBI
Randi Sommerfelt, IBI

Utvidet studie av PLA2-uttrykk i HaCaT-keratinocytter

av Kari Ellen Hansen

15. juni 2011

Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven har blitt utført i PLA2-gruppa ved Institutt for biologi, under Fakultetet for naturvitenskap og teknologi ved Norges Tekniske- og Naturvitenskapelige Universitet (NTNU). Masteroppgaven er en del av en toåring mastergrad i celle- og molekylærbiologi. Min ansvarlige veileder har vært Berit Johansen, som har vært en inspirasjonskilde og en strukturert leder. Astrid J. Feuerherm har vært min akademiske veileder, med god bistand fra Randi M. Sommerfelt og Thuy Nguyen. Jeg vil med dette rette en stor takk til dere alle fire for å ha tatt imot meg med åpne armer og lært meg opp i god vitenskapelig ånd. Astrid, du fortjener en spesiell takk for å ha bidratt med stilig forsidebilde og for å ha stilt opp for meg til enhver tid, med godt humør og konstruktive tilbakemeldinger. Du er alle masterstudenters drømmeveileder! Randi, du fortjener også en spesiell takk, for å ha bidratt med både kropp og sjel. De øvrige medlemmene av PLA2-gruppa fortjener alle en takk for å ha skapt et godt og humørfyllt arbeidsmiljø, som det har vært veldig hyggelig å være en del av.

Jeg ønsker også å rette en takk til min familie som har bidratt med korrekturlesing, mine gode venner som har bidratt med tiltrengte oppmuntringer underveis, Mari-Anne Slåtsveen som har bidratt med verdifull Lyx-hjelp og kjæresten min som har gitt meg en smak av livet, til tross for at jeg har levd inni min egen masterboble.

Kari Ellen Hansen

15. juni 2011

Trondheim

Sammendrag

I denne masteroppgaven har det blitt utviklet primerpar for 17 humane PLA2-isotyper. Ved hjelp av primerene har vi påvist uttrykk av 17 PLA2-isotyper i HaCaT-keratinocytter, hvorav 11 av disse representerer førstegangspåvisninger i HaCaT. Funnene representerer økt kunnskap om PLA2-familien og viser at HaCaT uttrykker et mangfold av PLA2-isotyper. Primerene ble også benyttet til å kartlegge PLA2-uttrykk gjennom keratinocytters differensiering. Resultatene viser at 13 av 17 isotyper uttrykkes gjennom hele differensieringsprosessen, som indikerer at PLA2-enzymet spiller sentrale roller i lipidmetabolisme i human epidermis. PLA2G2A viste, som den eneste av de studerte isotypene, sterk oppregulering under differensieringen, som vitner om at enzymet kan spille en viktig rolle i de øvre strata i epidermis.

Under utviklingen av primerparene ble human postnatal placenta tatt i bruk som antatt positiv kontroll for uttrykk av samtlige PLA2-isotyper. 8 av 17 primerpar detekterte mRNA i placenta, hvorav PLA2 gruppe 2D, 4C, 4D og 10 representerer førstegangspåvisninger i human placenta.

Primerene utgjør et verktøy som gjør det mulig å kartlegge PLA2-uttrykk i alle humane celler og vev. Da diverse PLA2-isotyper har blitt vist å spille en sentral rolle i inflammasjonssykdommer ved å katalysere hydrolysen av arakidonsyre fra glyserofosfolipider, vil det være interessant å kartlegge PLA2-uttrykk i friskt vev versus betent vev. Primerene vil legge grunnlaget for økt forståelse av de mange PLA2-enzymenes funksjoner i inflammasjonssammenheng, og potensielt legge grunnlag for utvikling av målrettede medisiner mot kronisk inflammatoriske sykdommer.

Innhold

1	Introduksjon	1
1.1	Huden	1
1.2	Psoriasis	2
1.3	Fosfolipase A2 (PLA2)	4
1.3.1	PLA2-familien	4
1.3.2	PLA2-isotyper	5
1.3.3	sPLA2	5
1.3.4	cPLA2	8
1.3.5	iPLA2	8
1.3.6	PAF-AH	9
1.3.7	PLA2-enzymet er oppregulert i en rekke inflammatoriske sykdommer	10
1.4	HaCaT	10
1.5	Utgangspunkt for oppgaven	10
2	Materialer og metoder	13
2.1	Cellekultur	13
2.2	Tining av celler	13
2.3	Forsøksdesign	13
2.4	RNA-isolering	14
2.4.1	HaCaT	14
2.4.2	Placenta	14
2.5	cDNA-syntese	14
2.6	Førstegenerasjons PLA2-primere	15
2.7	Primerdesign	15
2.8	Andre generasjons PLA2-primere	15
2.9	Konvensjonell PCR	16
2.10	Primeroptimalisering for qPCR	16
2.11	qPCR	17
2.12	Analyse av qPCR-data med $2^{-\Delta\Delta C_q}$	17
3	Resultat	21
3.1	Nye forsøk bekrefter at mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6, og 10 er tilstede i HaCaT	21
3.2	Andre generasjons PLA2-primere detekterer unike produkt av riktig lengde	21
3.3	Andre generasjons primere detekterer mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6 og 10 i HaCaT	22

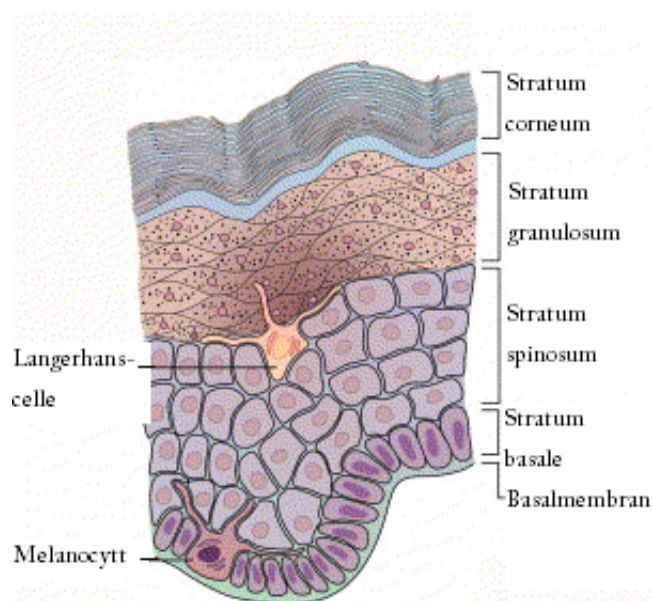
3.4	Førstegangspåvisning av mRNA fra PLA2 gruppe 2E, 3, 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A og 12A i HaCaT	22
3.5	Andre generasjonsprimere detekterer mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 3, 5 og 7A i human placenta	23
3.6	Førstegangspåvisning av mRNA fra PLA2 gruppe 2D, 4C, 4D og 10 i human placenta	23
3.7	Sterk oppregulering av PLA2G2A ved differensiering	23
3.8	HaCaT uttrykker PLA2 gruppe 5 og 10 avhengig av differensieringsgrad	24
3.9	HaCaT uttrykker PLA2 gruppe 2D, 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A, og 12A uavhengig av differensieringsgrad	24
4	Diskusjon	27
4.1	En rekke PLA2-isotyper er uttrykt i HaCaT og human placenta	27
4.1.1	PLA2-mangfold	27
4.1.2	PLA2-uttrykk gjennom HaCaT-keratinocytters differensiering	28
4.1.3	PLA2-isotyper kan vise seg å spille en sentral rolle i psoriasis	29
4.2	Primerene er et høyst aktuelt verktøy i videre PLA2-studier	29
4.3	Tekniske aspekter ved laboratoriearbeidet	30
4.4	Mål for fremtiden	31
5	Konklusjon	33
6	Referanser	35

1 Introduksjon

Denne masteroppgaven tar for seg familien av fosfolipase A2 (PLA2)-enzymmer, og forsøker å kartlegge uttrykk av disse i epidermis, som er hudens ytterste lag. Oppgaven er relevant i forhold til inflammasjonssykdommer generelt og psoriasis spesielt, ettersom den bidrar til å øke kunnskap om PLA2, som på sikt kan legge grunnlag for å utvikle målrettede medisiner i forhold til disse. Arbeidet er basert på HaCaT, som er en human keratinocyttecellelinje med egenskaper som gjør den velegnet til forskning på inflammasjonssykdommer i huden. Introduksjonen gir først en generell bakgrunn i forhold til hudens oppbygning, HaCaT-cellelinjen og psoriasis (Avsnitt 1.1-1.2), før den tar for seg PLA2-familien i mer detalj i avsnitt 1.3. Introduksjonen avsluttes i Avsnitt 1.5 med en forklaring av utgangspunkt for oppgaven.

1.1 Huden

Hudens oppgaver er å hindre væsketap og beskytte mot fysisk skade og infeksjon i tillegg til temperaturregulering, sansing og ikke-verbal kommunikasjon. Den består av tre lag: epidermis, dermis og hypodermis. I huden fins kjertelstrukturer (talg og svette), blodårer, nervefibrer og spesialiserte føleorganer. Epidermis ligger ytterst og danner en elastisk barriere mot det ytre miljø. Det fins ingen blodårer i epidermis, derfor skjer all utveksling av oksygen, næringsstoffer og avfallsstoffer ved diffusjon fra blodårene som ligger i øvre del av dermis [1, 2]. Epidermis består hovedsaklig av keratinocytter som danner et kontinuerlig lagdelt epitelvev. Lagene består, i rekkefølge fra ytterst til innerst, av stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum og stratum basale. Se Figur 1. Keratinocytene prolifererer kun i stratum basale. Dattercellene skyves deretter utover mot hudoverflaten, hvor de danner et hornlag. Dette slites med tiden av og erstattes av et nytt hornlag i en kontinuerlig prosess som sikrer at overflaten alltid er ny og slitesterk. Epidermis fornyes fullstendig på 3-4 uker. Etter hvert som keratinocytene forflyttes utover, igangsettes en differensieringsprosess og cellene mister evnen til å proliferere. Prosessen er en serie av genetisk kodede hendelser som involverer 1) tap av evnen til proliferering, 2) større og flatere celler, 3) dannelse av nye organeller samtidig som gamle organeller reorganiseres og til slutt degraderes, 4) syntese av nye proteiner og lipider, 5) endringer i plasmamembran, overflateantigener og -reseptorer og 6) dehydrering. Til slutt er keratinocytene ferdig differensierte, døde hornceller fylt med keratin, som er et intermediært filament [3]. Andre celler i epidermis er melanocytter, merkelceller, langerhansceller og lymfocytter. Langerhanscellene er dendrittceller som presenterer antigener til lymfocytene, og produserer og sender ut cytokiner, som er små proteiner som fungerer som signalstoffer mellom celler. Keratinocytter kan respondere på cytokiner og andre proinflammatoriske mediatorer. Dette er et eksempel på hvordan de ulike cellypene i huden kommuniserer med hverandre [4]



Figur 1: Epidermis består i hovedsak av keratinocytter som danner et lagdelt epitelvev, bestående av stratum corneum ytterst, stratum granulosum, stratum spinosum og stratum basale innerst. Keratinocytter prolifererer kun i stratum basale. Dattercellene skyves deretter utover mot hudoverflaten, hvor de danner et hornlag. [5]

1.2 Psoriasis

Psoriasis er en kronisk inflammatorisk hudsykdom som rammer 2-3% av verdens befolkning. Sykdommen kan forekomme i ulike former og i tidsperioder av varierende lengde. Ofte deles sykdommen opp i to hovedformer: psoriasis vulgaris (storflekket psoriasis, se Figur 2) som kjennetegnes av utslett og røde, og i blant sølvfargede, skjelldannelser, og pustuløs psoriasis hvor utslettet utvikles til synlige pussblærer med ansamlinger av hvite blodceller [4]. Psoriasis kan også forårsake inflammasjon i ledd og kalles da psoriasis artritt [6]. Skjelldannelsene oppstår som regel på albuer, knær og i hodeskallen, mens blemmene oftest oppstår i håndflater og på fotsåler. Skjelldannelsene er et resultat av en hyperprolifererende epidermis med keratinocytter som ikke er ferdig differensierte idet de når stratum corneum. Rødfargen i skjelldannelsene skyldes at kapillærer når overflaten i epidermis [4].

Psoriasis er en kompleks sykdom på både genomisk, cellulært og transkripsjonelt nivå, med inn-
 trekning av ulike typer leukocytter i huden, endret vekst- og differensieringsmønster av cellene i huden, og endret genuttrykk av mer enn 1300 gener i psoriatisk plakk, sammenlignet med normal hud [8]. Et ukjent antigen i lymfeknutene aktiverer T-celler, slik at de entrer blodbanen. De aktiverte T-cellene



Figur 2: Sølvfargede skjelldannelser som kjennetegner psoriasis vulgaris. [7]

binder til det vaskulære endotelet, migrerer ut i dermis og epidermis, og danner et infiltrat av hvite blodceller i huden. Her sender de hvite blodcellene ut proinflammatoriske cytokiner som interleukin 1 (IL-1) og tumornekrosefaktor (TNF). De hvite blodcellene sender også ut kjemokiner, som er cytokiner med kjemotaktisk virkning på celler med tilhørende kjemokinreseptorer. Cytokinene bidrar til å skape et proinflammatorisk miljø i huden, som resulterer i økt proliferasjon og endret differensieringsmønster hos keratinocytterne. Disse vekst- og differensieringsendringene er et karakteristisk kjennetegn for sårheling (regenerativ modning). Flere av nøkkelproteinene som uttrykkes av keratinocytter som gjennomgår regenerativ modning, virker kjemotaktisk på hvite blodceller. Dermed vil cytokinene og kjemokinene som de hvite blodcellene sender ut i huden resultere i at enda flere hvite blodceller infiltrerer huden. Det dannes på denne måten en positiv tilbakekobling som gjør at inflammasjonen opprettholdes som en langvarig sårhelingsrespons [8, 9].

Den utløsende årsaken til psoriasis er ikke kjent, men både genetiske faktorer og miljøfaktorer er involvert i sykdomsutviklingen. Mikrobielle infeksjoner, psykisk stress, skader i huden, overvekt, kosthold, alkohol og røyking kan forverre sykdommen [10]. Det finnes i dag flere former for medisiner og behandlinger mot psoriasis. Betennelsesdempende legemidler (NSAIDs, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs) som ibuprofen og acetylsalisylsyre virker både smertelindrende og betennelsesdempende. Ulempen er at NSAIDs kan irritere mageslimhinnen og forårsake magesår [11]. Kortikosteroider som kortison trenger gjennom stratum corneum, binder til steroidreseptorer i levende keratinocytter og påvirker DNA-syntesen, som resulterer i endret genuttrykk. Glukokortikoider virker både gjennom reseptormediert og direkte hemming av inflammatoriske celler, og kan i tillegg hemme inflammasjonsmediatorer som fosfolipase A2(PLA2)-enzymet. Ineffektiv gjennomtrengning av stratum corneum, utvikling av resistens, bivirkninger og høye kostnader er problematisk ved bruk av kortikosteroider [12]. Metotreksat er et sykdomsmodifiserende anti-revmatisk legemiddel (DMARD, Disease modifying anti-rheumatic drug) som hemmer DNA-syntese i keratinocytter ved å utkonkurrere folsyre i tymidinsyntese, som er essen-

sielt i DNA-syntese. Medikamentet kan skade blod- og leverceller og brukere må jevnlig gå til legen for å ta blodprøve og sjekke leverfunksjon [13]. Vitamin D3-analoger som Daivonex hemmer celledeling i keratinocytene og fremmer fullstendig differensiering. Daivonex® er en salve som skal smøres på de berørte områdene 2 ganger daglig [14]. Dette kan oppleves som bryderi og skape misnøye for brukerne. Sollys har vist seg å sakke celledeling i hudceller, sannsynligvis ved å modulere uttrykk av adhesjonsmolekyler og induksjon av apoptose i T-celler [13]. Derfor benyttes UVB-lys i behandling av psoriasis, ofte i kombinasjon med medikamenter. PUVA (Psoralen plus ultraviolet A) er en behandling som kombinerer UVA-lys og psoralen, som gjør huden mer lyssensitiv. Ved langvarige behandlinger med UV-lys følger en økt risiko for å få hudkreft [15].

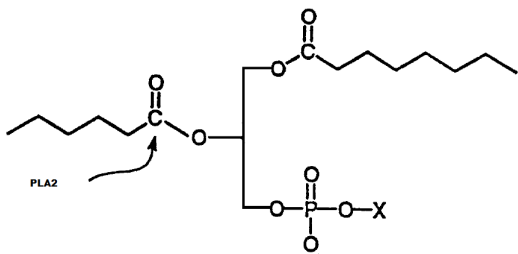
De siste 10-15 årene har en ny gren innen DMARDs skutt fart. “Biologics” er antistoffer produsert ved rekombinant DNA-teknologi for å spesifikt interagere med celleoverflatereseptorer eller cytokiner som spiller en sentral rolle i sykdomsutviklingen. Antistoffene kan blokkere aktiviteten til ett eller flere spesifikke proteiner. Eksempelvis interagerer alefacept med T-celler slik at de ikke aktiveres, og reduserer dermed infiltrasjonen av aktiverte T-celler i epidermis. Etanercept er en human rekombinant TNF-reseptor som reduserer den inflammatoriske responsen ved å hemme interaksjoner mellom TNF og TNF-reseptorer på celleoverflaten [12]. Som med alle immunosuppressive medikamenter, fører biologics til en økt risiko for infeksjoner og ondartede svulster [12, 16]. Det er derfor ønskelig å utvikle behandlinger og medikamenter som er effektive og uten uønskede bivirkninger. For å kunne gjøre det, er det nødvendig å kartlegge mekanismene som medvirker i igangsettingen av psoriasis spesielt og kronisk inflammasjon generelt. For å forstå mekanismene som medvirker til igangsettingen av hudsykdommer, er det nødvendig å først kartlegge de molekylære mekanismene i normal hud, som er et av målene i denne masteroppgaven.

1.3 Fosfolipase A2 (PLA2)

1.3.1 PLA2-familien

Fosfolipase A2 (PLA2)-familien består av en gruppe enzymer som katalyserer hydrolysen av fettsyrer i *sn2*-posisjon i glyserofosfolipider, og produserer med det lysofosfolipider og frie fettsyrer. Se Figur 1.3. Det er i dag kartlagt 34 isotyper, hvorav 28 har blitt påvist i mennesker [17]. Fettsyrene som frigis, omdannes av ulike enzymer til biologisk viktige signalmolekyler. Arakidonsyre er en fri fettsyre som initierer arakidonsyrekaskaden og leder til syntese av eikosanoider som prostaglandiner, tromboksaner, leukotriener og lipoksiner [6]. Arakidonsyre og eikosanoider spiller en sentral rolle i prosesser som intracellulær signalisering, celledeling og -differensiering, apoptose, inflammasjon, blodkoagulasjon og permeabilitet i blodårevegger [6, 18, 17]. Lysofosfolipider omdannes til lysofostfatsyre (LPA) og plateaktiverende faktor (PAF). LPA er involvert i cellers migrasjon, proliferasjon og angiogenese. PAF er involvert i inflammatoriske prosesser, og det finnes indikasjoner på at PAF også initierer en dedifferensiering av differensierte keratinocytter slik at de gjenvinner evnen til celledeling

(author?). Eikosanoider og lysofosfolipider virker gjennom binding til spesifikke G-proteinkoblede reseptorer [17, 20].



Figur 3: Fosfolipidstruktur og kuttsete for fosfolipase A2 (PLA2). Spaltingen resulterer i en fri fettsyre og lysofosfolipidprodukter. [21]

1.3.2 PLA2-isotyper

Fosfolipase A2-familien deles tradisjonelt inn i 15 grupper, med varierende antall medlemmer i hver gruppe. Disse kan deles inn i fem hovedgrupper, basert på deres katalytiske mekanisme, funksjon og struktur: sekretoriske (sPLA2), cytosoliske Ca^{2+} -avhengige (cPLA2), cytosoliske Ca^{2+} -uavhengige (iPLA2), PAF-hydrolaser (PAF-AH) og lysosomale PLA2. sPLA2 er små proteiner (14-18 kDa) med 5-8 disulfidbindinger som har histidin i sitt aktive sete. cPLA2 er store cytosoliske proteiner (61-116 kDa) med serin (avhengig av en Ser/Asp-interaksjon) i sitt aktive sete. iPLA2 er ikke avhengig av kalsium for å utføre sin katalytiske funksjon, men for translokasjon av enzym til intracellulære membraner. Ca^{2+} -uavhengige iPLA2 varierer mye i størrelse (28-146 kDa) og har i likhet med cPLA2 serin i sitt aktive sete. PLA2 gruppe 7 og 8 kan hydrolysere acetylgruppen fra *sn2*-posisjonen i PAF og ble derfor opprinnelig kalt PAF-acetylhydrolaser. Disse har også serin i sitt aktive sete. Lysosomale PLA2 finnes i lysosomer og er Ca^{2+} -uavhengige [17]. I denne masteroppgaven er 17 av de 28 humane PLA2-enzymene studert og deres uttrykk og funksjon vil bli beskrevet mer detaljert i det følgende. Se Tabell 1 for klassifisering og oppsummering av PLA2-påvisninger i humant vev og celler.

1.3.3 sPLA2

PLA2G2A (Fosfolipase gruppe 2A) er blant de best beskrevne av alle PLA2-isotypene og ble i menneskevev først identifisert i leddvæske fra leddgiktspasienter [22]. Enzymet har i menneske har blitt påvist i akutfaseserum, tårekjertler, tarmslimhinner, vaskulære glattmuskelceller og epitelceller i prostata [29, 53]. I tillegg har enzymet blitt påvist oppregulert i betent vev i sykdommer som psoriasis, osteoartritt, leddgikt, sarkoidose, Chrons sykdom, blodforgiftning og septisk sjokk [6, 54, 55, 56, 57]. I blodforgiftning og septisk sjokk korrelerte genuttrykket sterkt med alvorlighetsgraden av sykdommen [56]. Enzymet har antibakterielle egenskaper ved at det kan opptre som et akutfaseprotein [58].

Tabell 1: Humane celler og vev hvor PLA2-isotyper har blitt påvist.

Gruppe	Klassifisering	Første gang påvist i humant vev	Påvist i humane keratinocytter/epidermis/epitelvev	Påvist i HaCaT
2A	sPLA2	Trombocytter[22]	Epidermis, primære keratinocytter [23, 24]	[25]
2D	sPLA2	Milt [26]	Frisk hud, primære keratinocytter [25, 27]	[25]
2E	sPLA2	Placenta[28]	Lungeepitel [29]	
3	sPLA2	Diverse vev [30]	Tykktarmsepitel [31]	
4A	cPLA2	Trombocytter [32]	Keratinocytter [33]	[34]
4C	cPLA2	Hjerte [35]	Luftveiseepitel [36]	
4D	cPLA2	Psoriatisk hud [37]	Psoriatisk hud og keratinocyt-cDNA-bibliotek [37]	
4F	cPLA2	Keratinocytter [38]	Primære keratinocytter [38]	
5	sPLA2	Diverse vev [39]	Primære keratinocytter [23]	[25]
6A	iPLA2	B-celler [40]	HaCaT-keratinocytter [34]	[34]
6B	iPLA2	Diverse vev [41, 42]		
6C	iPLA2	Trombocytter [43]	Oppregulert i lepraesjoner [44]	
6D	iPLA2	SW872 liposarkomceller [45]	Tarmepitel [45]	
6F	iPLA2	Diverse vev[46]	SCC13-keratinocytter [47]	
7A	PAF-AH	Plasma [48, 49]	Blodåreepitel [50]	
10	sPLA2	Lunge [51]	Hud og primære keratinocytter[25, 27]	[25]
12A	sPLA2	Diverse vev[52]	Primære keratinocytter [27]	

PLA2G2A er involvert i celledeling, migrasjon, apoptose, remodelering av cellemembraner og fettavleiringer i blodårer [56, 53]. I differensieringsstudier av humane keratinocytter har PLA2G2A vist seg å være lavt uttrykt i de nedre strata i frisk hud, og uttrykt i større grad i øvre strata [27].

PLA2G2D ble i menneske først identifisert i milt [26] og har senere blitt påvist i tykktarm [31], mastceller [59], THP-1 monocytter [60] og SW982-fibroblaster (Ikke publisert. Pers. meddelelse, A. Feuerherm, 2011). I forbindelse med inflammasjon har enzymet blitt påvist i humane kondrocytter fra leddgikt- og osteoartrittpasienter [57] og i ødelagte kardiomyocytter [29]. I mus har enzymet blitt påvist i bukspyttkjertel, milt, tymus, hud, lunger, eggstokker og eosinofile [53].

PLA2G2E ble i menneske først påvist i placenta [28], og senere i vaskulære glattmuskelceller og i epitelceller i tarmslimhinnen [29]. I mus har enzymet blitt påvist i tyroidkjertelen, livmor, hjerne, hjerte, lever, lunger, tarmer, milt, embryo og placenta [61, 59, 31]. Studier gjort på mus tyder på at enzymet deltar i betennelsesprosesser som involverer allergiske reaksjoner styrt av mastceller. Enzymet har også blitt detektert i hud hos mus med atopisk eksem, i motsetning til friske mus, hvor genet ikke

ble detektert i huden [61]. Enzymet har antibakterielle egenskaper og er strukturelt i nær slekt med PLA2 gruppe 2A og 2D. Det er derfor naturlig at enzymet har lignende oppgaver. Gruppe 2E er generelt svakere uttrykt enn både 2A og 2D, derfor har det i mange studier vært vanskelig å påvise uttrykk av genet [61].

PLA2G3 skiller seg fra andre humane sPLA2 ved at det har unike amino- og karboksylender, det er større (55 kDa) enn de øvrige sPLA2 (14-18 kDa), og har et annet uttrykksmønster [62]. Dette antyder at enzymet har en spesifikk funksjon. Strukturelt likner enzymet mest på PLA2G3 funnet i biegift [30]. Hos mennesker er genet sterkt uttrykt i hjerte, nyrer, skjelettmuskulatur og lever, moderat uttrykt i placenta, nevroner, mikrovaskulært endotel og leukocytter, og lavt uttrykt i hjerne, tykktarm, tymus, milt og tynntarm [30, 63]. I vev fra tykktarmskreft har det blitt påvist en 40-folds oppregulering av genet [31], og en potensiell funksjonell kobling mellom PLA2G3 og aterosklerose har blitt forslått. I mus har det blitt vist at overuttrykk av PLA2G3 fører til spontan utvikling av betennelsestilstander i huden med parakeratose, hyperplasi, massiv infiltrasjon av neutrofile og makrofager i dermis, samt økt uttrykk av proinflammatoriske cytokiner og kjemokiner, som IL-1 og TNF. Den betente huden hadde forhøyede nivåer av eikosanoider, som tyder på at PLA2G3 fremmer produksjonen av arakidonsyre [64].

PLA2G5 ble i menneske først karakterisert i placenta, hjerte og lunge [39]. Enzymet har blitt påvist i atskillige humane celler og vev, blant annet lungefibroblaster, neutrofile, nyreepitel, og leverceller, og har antibakterielle egenskaper [65, 29]. Det er funnet forhøyede nivåer av enzymet i celler fra hjerter og nyrer som har hatt infarkt [29], og i kondrocytter fra leddgiktspasienter [66]. PLA2G5 er involvert i hypersensitivitet i luftveiene [62] og har også blitt vist å utøve både en pro- og anti-inflammatorisk funksjon i leddbetennelse [67]. Enzymet uttrykkes i humane keratinocytter [34], og i keratinocyttenes differensieringsprosess ser uttrykket ut til å minke i de øvre strata [27].

PLA2G10 ble i menneske først påvist i lungevev fra foster [51]. Det er allment uttrykt og regnes som hovedisotypen av PLA2 uttrykt i de øvre lag av epidermis, fordi den blant PLA2-isotypene har blitt påvist å være mest effektiv i generering av arakidonsyre [25]. Enzymet virker antiviralt ved å degradere virusmembraner og hemme virusreplikasjon [68]. Enzymet er unikt fordi det kan frigjøre fettsyrer fra utsiden av cellemembranen i intakte celler. PLA2G10 er sterkt oppregulert i epitelceller og makrofager i luftveiene hos astmapasienter [69]. Det har blitt vist at enzymet kan indukere frigjøring av arakidonsyre fra humane THP-1-monocytter når enzymet tilsettes eksogent [70]. Dette antyder at enzymet spiller en rolle i inflammasjon og signaltransduksjon. Enzymet inngår i regulering av lipidmetabolisme i epidermis og ser ut til å øke i uttrykk i de øvre strata [27].

PLA2G12A ble i menneske første gang påvist sterkt uttrykt i hjerte, skjelettmuskulatur, nyrer og bukspyttkjertel og noe svakere uttrykt i hjerne, lever, tynntarm, lunger, placenta, eggstokker, testikler og prostata [52]. Etterpå har det også blitt påvist sterkt uttrykt i tykktarm og øyeepitel [31, 71]. Enzymet er sterkt uttrykt i luftveiene hos astmapasienter [69] og i humane meningeom. mRNA er detektert i primære humane keratinocytter, og uttrykket så ikke ut til å endre seg i keratinocyttenes

differensieringsprosess [27].

1.3.4 cPLA2

PLA2G4A er en av de best studerte PLA2-isotypene. Enzymet ble først påvist i humane trombocytter [32], og regnes nå som konstant uttrykt i de fleste typer celler og vev [72]. Studier gjort på hudceller og keratinocytter, tyder på at genet også er konstant uttrykt i hud [33, 34, 23]. Isotypen er spesifikk for arakidonsyre i sn2-posisjon hos fosfolipider. Det vil si at 4A spalter arakidonsyre og lysosofosfolipider fra fosfolipider kun når fettsyren i fosfolipidet er arakidonsyre. En studie av pasienter med mutasjoner i PLA2G4A-genet, har bekreftet at enzymet spiller en sentral rolle i intracellulær spaltning av fosfolipider ved at å være den hastighetsbegrensende kilden til lysosofosfolipider og andre frie flerumettede fettsyrer, som arakidonsyre, som omdannes til PAF og deretter eikosanoider [73]. I knockout-studier på mus (mus som har blitt genetisk modifisert til å ikke uttrykke PLA2G4A) har vist at enzymet har en viktig rolle i fertilitet og igangsettingen av fødsel [74, 18]. Enzymet ser ut til å spille en nøkkelrolle i autoimmune sykdommer, da knockout-studier har vist en signifikant reduksjon av inflammatoriske responser [75].

PLA2G4C ble i menneske først påvist sterkt uttrykt i hjerte- og skjelettmuskulatur [35], og har senere blitt funnet i humane epitelcellelinjer fra nese og bronkier [36]. De øvrige isotypene i PLA2 gruppe 4 er avhengige av kalsium for translokasjon til cellulære membraner, der spaltningen av arakidonsyre forgår. PLA2G4C skiller seg ut fra disse ved at enzymet er konstant tilknyttet cellulære membraner og enzymaktiviteten foregår derfor uavhengig av kalsium [76]. Enzymet har ikke like sterk affinitet for arakidonsyre i sn2-posisjon som gruppe 4A. 4C er involvert i syntesen av prostaglandiner [77], ser ut til å være sentral i inflammatoriske responser til nematoder i mus [76] og er involvert i utviklingen av kardiovaskulære inflammasjonssykdommer [78, 79].

PLA2G4D ble identifisert i jakten på opp- eller nedregulerte gener i psoriatisk hud sammenlignet med normal hud. Enzymet ble påvist i lagdelte, flassende epitel som epidermis og livmorhalsepitel, men også i celler fra atopisk eksem og i T-celle-lymfom [37]. Etter søk på PubMed har det ikke blitt funnet andre studier som har påvist enzymet humant. I mus er PLA2G4D blitt påvist uttrykt kun i placenta [80].

PLA2G4F ble først påvist i humane primære keratinocytter fra stratum granulosum [38]. Genet er sterkt uttrykt i skjoldbruskkjertelen og moderat uttrykt i mage, hjerne, tykktarm, prostata og lungefibroblaster i mus. Enzymet er i motsetning til gruppe 4A ikke arakidonsyrespesifikt [80, 17]. Etter søk på PubMed har det ikke blitt funnet andre studier som har påvist enzymet humant eller i betennelsessammenheng.

1.3.5 iPLA2

PLA2G6A ble i menneske først påvist i B-celler [40]. Genet har to spleisevarianter: 6A-1 og 6A-2, som begge er enzymatisk aktive [72]. Spleisevariantene er konstant uttrykt i mange vev og det har

blitt vist at enzymet spiller en viktig rolle i fosfolipid-remodellering, membranendringer ved apoptose, utvidelse av blodårer, og regulering av celledeling i lymfocytter [17]. Enzymet kan være involvert i inflammasjonsresponsen i vaskulært endotel i lunger [81], og det har blitt vist at enzymet spiller en viktig rolle i igangsettingen og utviklingen av eksperimentell autoimmun encefalomyelitt, som er en dyremodell for multippel sklerose [82]. Genet har blitt detektert i den humane keratinocytlinjen HaCaT [34].

Mancuso *et al.* og Tanaka *et al.* publiserte samtidig førstegangsidentifisering av **PLA2G6B** [41, 42], som også kalles PNPLA8. Mancuso *et al.* identifiserte genet i hjerte, placenta, nyrer, lever, hjerne og skjelettmuskulatur. Tanaka *et al.* identifiserte genet også i tykktarm, tynntarm, tymus, milt, lunger og leukocytter. Nyrebarken viser sterk PLA2G6B-aktivitet i indre mitokondriemembran og i endoplasmatisk retikulum, hvor enzymet beskytter cellene mot oksidativt stress [83]. PLA2G6B er involvert i remodellering av membraner og induseres av apoptotiske forhold og av proinflammatoriske cytokiner som IL-1 [84, 85]. Det er koblet til produksjon av PGE2, som er et prostaglandin [84]. Det har blitt vist at mus som mangler PLA2G6D ikke utvikler overvekt eller insulinresistens etter å ha gått på en fettrik diett [86].

PLA2G6C ble i menneske først identifisert i blodplater og lymfocytter, da under navnet *neuropathy target esterase* (NTE) [43]. Enzymet kalles også PNPLA6. Mutasjoner nær det katalytiske setet har vist seg å forårsake sykdommer i motoriske nerver både i mennesker og mus, som indikerer at enzymet spiller en rolle i vedlikehold av aksoner [87]. PLA2G6C er oppregulert i lepraesjoner [44], og har blitt koblet til differensiering gjennom studier gjort på embryoniske stamceller [88].

PLA2G6D kalles også adiponutrin. Enzymet ble i menneske først påvist i SW872 liposarkomceller [89]. Det har senere blitt funnet i atskillige vev i menneske, blant annet i lever, hvor genet er sterkt uttrykt, og i bein, makrofager og muskler, hvor genet er moderat uttrykt [45]. Genuttrykket øker kraftig i løpet av differensiering av adipocytter og minker kraftig under faste, som antyder at enzymet er delaktig i energilagring- og mobilisering i fettvev [89]. Genet er også kraftig oppregulert i leverceller hos overvektige mus [87]. Studier viser at PLA2G6D er sterkt forbundet med leverbetennelse [90] og at enzymet er involvert i hypofysesvikt [91].

PLA2G6F ble første gang påvist i menneske under navnet GS2. Uttrykk ble påvist i samtlige undersøkte vev: hjerte, hjerne, placenta, lunger, lever, muskler, nyrer, bukspyttkjertel og milt [46]. Som PLA2G6D, øker uttrykket av PLA2G6F i løpet av differensieringen av adipocytter og antas dermed å være involvert i energilagring i fettvev [89]. I mennesker har enzymet blitt vist å ha keratinocyt-retinylesterhydrolase-aktivitet, som betyr at PLA2G6F er involvert i reguleringen av keratinocytters deling og differensiering [47]. Ved søk på PubMed har det ikke blitt funnet noen kobling til betennelse.

1.3.6 PAF-AH

PLA2G7A er sekretorisk og kalsiumuavhengig og ble i menneske første gang påvist i plasma [49, 48]. Uttrykk av enzymet er påvist i hematopoetiske celler, leverceller, makrofager, mastceller, tymus,

mandler og placenta [92]. PLA2G7A har i flere studier vist seg å motvirke inflammasjon, for eksempel ved å redusere poteødem i mus [48] og ved å hemme utvikling av aterosklerose [92]. Andre studier har derimot vist at enzymet gir en økt risiko for å hjerte-/karsykdommer [93] og at genet er oppregulert i blant annet lepralesjoner [44].

1.3.7 PLA2-enzymet er oppregulert i en rekke inflammatoriske sykdommer

Det har blitt påvist forhøyede nivåer av PLA2 gruppe 2A, 2D og 4D i psoriatisk hud [6, 94, 37, 27]. I samsvar med dette har det blitt påvist forhøyede nivåer av arakidonsyre, eikosanoider og PAF i psoriatisk hud [95, 6, 96]. PLA2 har også blitt koblet til inflammasjon gjennom en rekke andre sykdommer og vev. Blant annet har det blitt påvist forhøyede nivåer av PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, og 5 i kondrocytter fra pasienter med slitasjeleddgikt [57]. PLA2 gruppe 2A, 4A og 5 har blitt påvist i kondrocytter fra leddgiktspasienter [66]. PLA2G2A er oppregulert i glattmuskelvev i lungebiopsier fra sarkoidosepasienter [54] og i mastceller og makrofager i Chrons sykdom [55].

1.4 HaCaT

Tidlige cellemodellsystem for hud bestod av celler infisert av virus eller celler transfektet med fremmed DNA. Disse cellene viste ofte endrede eller uønskede vekstmønster. I 1988 klarte Boukamp *et al.* å etablere en spontantransformert keratinocytccellelinje kalt HaCaT, som prolifererer og differensieres normalt, og som ikke danner svulster. HaCaT-keratinocytterne er også i stand til å danne en normal epidermis når de transplanteres på mus [97]. Cellelinjen viste seg derfor å være en velegnet modell for å studere hudsykdommer, som psoriasis, atopisk eksem og sklerodermi. HaCaT uttrykker også et knippe PLA2-isotyper, noe som gjør modellsystemet særdeles godt egnet for å studere psoriasis fordi psoriatisk hud er vist å uttrykke forhøyede nivåer av PLA2 gruppe 2A, 2D, 4D [6, 94, 37, 27].

1.5 Utgangspunkt for oppgaven

PLA2 spiller en viktig rolle i inflammasjonssykdommer og det har blitt påvist forhøyede nivåer av enzymene og nedstrøms metabolitter i psoriatisk hud [95, 6, 96, 94, 37, 27]. For å få en større forståelse av hvilken rolle PLA2-isotypene spiller i epidermis, er det nødvendig å kartlegge hvilke isotyper som uttrykkes i epidermis, og i hvilke strata. Etter å ha kartlagt hvilken rolle PLA2 spiller i frisk epidermis, er det mulig å gå videre og kartlegge hvordan PLA2 uttrykkes i psoriatisk epidermis. Ved å sammenligne molekylære mekanismer i frisk versus psoriatisk hud, kan man finne spesifikke molekyler involvert i sykdomsutviklingen, og disse vil representere potensielle mål for målrettede medisiner.

I år 2000 publiserte Berit Johansens forskningsgruppe primerpar for PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6 og 10. Disse primerparene har blitt benyttet til å detektere PLA2-transkript i 2-3 dager postkonfluente HaCaT [34, 98] ved bruk av konvensjonell PCR. Amplifikasjonsproduktene fra primersettene er 320-730 basepar lange, primerene er derfor uegnede i kvantitativ PCR (qPCR), hvor produktene ideelt

sett skal være 50-200 basepar lange for å sikre høyest mulig amplifikasjonseffektivitet [99]. Fordelen ved bruk av qPCR framfor konvensjonell PCR er at genuttrykk kan studeres ikke bare kvalitativt, men også kvantitativt. Derfor er det ønskelig å utvikle en ny generasjon primerpar med kortere amplifikasjonsprodukt for disse 6 PLA2-isotypene, men også for de øvrige PLA2-isotypene, som til nå har blitt studert i liten grad. Med det verktøyet som primerpar for alle PLA2-isotyper utgjør, er det også mulig å kartlegge PLA2-uttrykk i alle typer humane celler og vev. Derfor vil et fullt sett med PLA2-primere legge grunnlaget for økt forståelse av de mange PLA2-enzymenes funksjoner både i friskt og sykt vev, og potensielt legge grunnlag for utvikling av målrettede medisiner mot kronisk inflammatoriske sykdommer.

2 Materialer og metoder

2.1 Cellekultur

Den humane keratinocytlinjen HaCaT (donert av Prof. N. Fusenig, Heidelberg, Tyskland) ble kultivert i DMEM (Sigma-Aldrich, Cat#: D6046) med 10% FBS (Sigma, Cat#: F7524, Lot.no: 056K3397), 0,3 mg/mL glutamin (Sigma, Cat#: G8540-100g) og 0,1 mg/mL gentamicin ved 37°C og 5% CO₂ i en fuktet atmosfære. Cellene ble splittet og mediet byttet hver 3-4 dag for å holde cellene i prolifereringsfasen.

2.2 Tining av celler

Frosne HaCaT-keratinocytter i eppendorfrør ble tatt opp fra flytende nitrogen og tint i et vannbad med 37°C. Lokket på eppendorfrøret ble såvidt løsnet før røret ble satt i vannbad for å unngå trykk inni røret. Da innholdet hadde fått en slaps-lignende konsistens, ble lokket satt på, røret sterilisert med 70% etanol og flyttet inn i en sterilbank. Cellene ble forsiktig overført til et 10 mL-rør med en plastpipette. 10 mL medium ble forsiktig tilsatt, dråpe for dråpe, for å unngå hurtige osmotiske endringer. Cellene ble sentrifugert i 5 min ved 700 rpm. Pelleten ble resuspendert i 5 mL medium, overført til en T25-flaske og inkubert i 37°C. Etter 24 t ble cellene sentrifugert på nytt (5 min, 700 rpm), resuspendert i 5 mL medium og overført tilbake til samme T25-flaske. Deretter ble cellene kultivert som beskrevet i 2.1.

2.3 Forsøksdesign

HaCaT-celler i kultur utviser kontaktinhibering og vekstarresterte celler differensieres med et lignende uttrykksmønster som keratinocytter viser i normal hud [100, 101]. 600 000 celler suspendert i 3 mL medium ble sådd ut i 6-brønnersbrett og høstet etter 16 timer (Dag 0), 1 døgn (Dag 1), 2 døgn (Dag 2), 3 døgn (Dag 3), 4 døgn (Dag 4), 5 døgn (Dag 5) og 6 døgn (Dag 6). Celletettheten for utsåing ble bestemt ved bruk av Bürkertellekammer (Marienfeld, Cat#: 06402 10). Ved høsting ble cellene først vasket med 500 µL PBS, deretter lysert med en celleskrape, 350 µL lysisbuffer fra Qiagen RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Cat#: 74106) tilsatt 10 µL β-merkaptoetanol per 1 mL buffer. Cellelysate ble umiddelbart satt i -80°C fryser. Det ble gjennomført 3 forsøk fra ulike bioreplika, hvor cellenes generasjonstall var henholdsvis 63, 65 og 42. 100% konfluens ble nådd ved dag 3, og cellene fra dag 5 og dag 6 ble sultet med 0,5%-medium 96 timer etter utsåing. Mediet inneholder vekstfaktorer, ved sulting fjernes disse vekstfaktorene, noe som bidrar til at cellene differensieres.

2.4 RNA-isolering

2.4.1 HaCaT

Total-RNA ble isolert fra cellelysate ved bruk av Qiagen RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Cat#: 74106) og produsentens protokoll *Purification of Total RNA From Animal Cells Using Spin Technology*. Protokollen ble brukt med følgende modifikasjoner: 1) steg 9 ble gjennomført, 2) i steg 10 ble 30 µL RNase-fritt vann benyttet til eluering. RNAets konsentrasjon og renhet ble målt ved bruk av NanoDrop spektrofotometer og V 4.7.2 Software (NanoDrop Technologies). Alle 260/280- og 260/230-ratioer >1,9 ble akseptert. Totalt RNA-utbytte varierte mellom 400-700 ng/µL.

2.4.2 Placenta

Tidligere studier har vist at PLA2 gruppe 2A, 2E, 3, 4A, 5, 6B, 6F, 7A og 12A uttrykkes i human placenta [46, 52, 30, 102, 41, 92, 28], og at placenta er et av vevene i menneskekroppen hvor PLA2G2A i aller størst grad uttrykkes [103]. Vi antok derfor at placenta ville fungere som positiv kontroll under uttesting av andregenerasjonsprimerene, altså at transkript fra alle PLA2-isotyper ville bli detektert. Placenta ble lagt i RNAlater® rett etter fødsel og oppbevart i fryser med -20°C. En vevsbit på 100 mg ble homogenisert i en homogenisator sammen med 2 mL lysisbuffer (tilsatt 10 µL β-merkaptoetanol per 1 mL buffer) i 45 sek. Homogenatet ble sentrifugert i 10 min ved 3000 rpm. Deretter ble protokollen *RNeasy Midi/Maxi Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues* og utstyr fra Qiagen RNeasy® Midi Kit (Qiagen, Cat#: 75142) benyttet. 250 µL RNase-fritt vann ble benyttet for eluering. I steg 12 i protokollen ble eluatet fra steg 11 benyttet i en sekundær eluering for å øke den endelige RNA-konsentrasjonen. RNAets konsentrasjon og renhet ble målt ved bruk av NanoDrop spektrofotometer og V 4.7.2 Software (NanoDrop Technologies). Alle 260/280- og 260/230-ratioer >1,9 ble akseptert. Fra 100 mg vev ble det totalt isolert 37, 5 µg RNA.

2.5 cDNA-syntese

cDNA brukt i konvensjonell PCR ble syntetisert fra 2 µg RNA, mens cDNA brukt i qPCR ble syntetisert fra 1 µg RNA. RNAet ble tilsatt vann til totalt 9 µL. For hver reaksjon ble 4 µL 5X 1st strand buffer (Invitrogen, Cat#: P/N y02321), 2 µL 0,1 M DTT (Invitrogen, Cat#: P/N y00147), 2 µL 10 mM Deoxynucleotide Mix (Sigma, Cat#: D7295-.5ML), 1 µL 100 µg/mL Random Primers (Promega, Cat#: C118A), 1 µL rRNasin® RNase Inhibitor (Promega, Cat#: N251A) blandet i et eppendorfrør før 9 µL RNA+vann ble tilsatt. Til slutt ble 1 µL RT M-MLV (Invitrogen, Cat#: 28025-013) tilsatt. Hvert rør ble inkubert 10 min i romtemperatur, 60 min ved 37°C og til slutt 5 min ved 95°C for å stoppe reaksjonen. cDNAet ble lagret i fryser ved -20°C. Hver gang cDNA ble syntetisert, ble det i tillegg laget en vannkontroll uten RNA, men med alle andre reagenser, som ble inkludert i PCR-reaksjoner for å bekrefte at reagensene ikke var kontaminert av DNA.

2.6 Førstegenerasjons PLA2-primere

Anthonsen *et al.* publiserte rundt år 2000 artikler som påviste mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6A og 10 i HaCaT [98, 34]. Primerene fra disse artiklene ble benyttet for å verifisere at PLA2-mRNA fra HaCaT var tilstede. cDNA ble laget på 2 µg RNA fra 3 dager postkonfluente HaCaT. For hver reaksjon ble det brukt 14,5 µL SIV, 0,6 µL DyNAzyme II DNA Polymerase (Finnzymes, Cat#: F-501L), 2,5 µL 10xBuffer for DyNAzyme DNA Polymerase (Finnzymes, Cat#: F-511), 0,75 µL Deoxynucleotide Mix (Sigma, Cat#: D7295-.5ML), 1 µL +primer (0,4 µM) og 1 µL -primer (0,4 µM). I konvensjonell PCR ble følgende betingelser brukt; PLA2G2A: 2 µL cDNA, 40 sykluser, 58°C. PLA2G2D: 2 µL cDNA, 40 sykluser, 58°C. PLA2G5: 2 µL cDNA, 40 sykluser, 58°C. PLA2G10: 5 µL cDNA, 50 sykluser, 67°C. PLA2G4A: 2 µL cDNA, 40 sykluser, 57°C. PLA2G6A: 5 µL, 50 sykluser, 64°C. β -aktin ble benyttet som referansegen. Det ble inkludert i alle PCR-reaksjoner og fungerte tilfredsstillende i alle protokoller.

2.7 Primerdesign

Det er i dag kartlagt 28 humane PLA2-isotyper [17]. Ved bruk av Primer3 (versjon 0.4.0 tilgjengelig fra: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) ble det designet primere til alle 28 isotypene. Primerene ble designet med følgende kriterier: 1) PCR-produktet skulle være 18-22 basepar langt for å sikre spesifikk primerbinding [99], 2) 40-60% av nukleotidene i primerene skulle være guanin eller cytosin, da GC-basepar har 3 hydrogenbindinger (i motsetning til AT-basepar, som har 2 hydrogenbindinger) og dermed bidrar til stabilitet mellom primer og templat [99], 3) primerparene skulle ha "balanserte" smeltepunktstemperaturer, dvs maks $\pm 5^\circ\text{C}$, for at begge primerene i paret skulle kunne fungere optimalt ved valgt annealingstemperatur [99], 4) primerparene skulle ikke ha komplementære 3'-ender, slik at primerdimerer ville dannes, og dermed kunne bidra til en lavere amplifikasjonseffektivitet [99], 5) +primer og -primer skulle hybridisere til to ulike ekson (overspinner et intron), for å kunne skille mellom PCR-produkt amplifisert fra genomisk DNA og fra cDNA [99], 6) primerene skulle ikke ha interne komplementære sekvenser slik at "hairpins" kunne dannes, fordi dette kan hindre fullstendig hybridisering av primere [99], 7) primerene skulle detektere alle transkriptvarianter.

BLAST er et verktøy som tester likheten mellom PCR-produktet et primerpar vil amplifisere og alle kartlagte genomer. Ved å BLASTe et primerpar, kan man forsikre seg om at sekvensen er unik, både med hensyn til andre gener og organismer. Alle primerparene ble testet i BLAST og ble fastslått å være unike. Ensembl ble benyttet for å bekrefte at primerene overspant et intron og at primerene ville detektere alle transkriptvarianter. Både BLAST og Ensembl ligger på NCBI's nettsider (tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.8 Andregenerasjons PLA2-primere

Før nye primere tas i bruk, er det viktig å verifisere i praksis at primerne er spesifikke og gir produkt med forventet lengde. Dette ble testet for andregenerasjonsprimerene ved bruk av konvensjonell

PCR. Ikke alle primerparene gav spesifikke produkt av riktig størrelse. Disse ble derfor forkastet og det ble bestilt nye primerpar, denne gang ferdig designete primere fra PrimerBank (tilgjengelig fra: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Enkelte primerpar, som tidligere medlemmer av Berit Johansens forskningsgruppe har designet, ble også prøvd ut. Alle primerparene ble testet i BLAST, Ensembl og konvensjonell PCR, og til sammen 17 par ble godkjent til videre bruk. Se Tabell 3.

2.9 Konvensjonell PCR

Andre generasjonsprimerene ble benyttet i konvensjonell PCR både til å verifisere at primerene amplifiserte spesifikke produkt av riktig lengde, og til å detektere mRNA fra de 17 PLA2-isotypene i 3 dager postkonfluente HaCaT. For hvert primerpar ble 14 μL SIV, 2,5 μL 10x RedTaq® PCR Reaction Buffer (Sigma, Cat#: B5926-1ML), 0,75 μL 10 mM Deoxynucleotide Mix (Sigma, Cat#: D7295-.5ML), 0,75 μL REDTaq® DNA Polymerase (Sigma, Cat#: D5684-250UN), 1 μL +primer (0,4 μM) og 1 μL -primer (0,4 μM) blandet, og cDNA laget på 2 μg RNA tilsatt. For mye eller for lite cDNA kan føre til lite eller inget PCR-produkt, avhengig av hvor sterkt genet er uttrykt. Derfor ble hvert primerpar testet med både 2 μL cDNA+3 μL SIV, og 5 μL cDNA. 5 μL cDNA ga mest produkt for alle isotypene, bortsett fra PLA2 gruppe 4A, 4C og 4D, som ga mest produkt ved bruk av 2 μL cDNA. Glyceraldehyd 3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) ble benyttet som referansegene og ble inkludert i alle PCR-reaksjoner. Konvensjonell PCR ble kjørt med samme betingelser for alle primerparene, se Tabell 4.

PCR-produktene ble satt på en 3%-agarosegel (Sigma, Cat#: A9539-500G) i 1X TAE-buffer. Det ble satt 100V spenning på gelen i 1 time. Gelen var tilsatt 0,0001% GelRed Nucleic Acid Stain 10,000 in water (Biotium, Cat#: 41003-0.5mL) for etter gelelektroforesen å kunne visualisere båndene i UV-lys.

2.10 Primeroptimalisering for qPCR

Dersom primere skal benyttes i qPCR, bør følgende kriterier oppfylles: 1) Primerkonsentrasjonen bør optimaliseres for å sikre best mulig amplifikasjonseffektivitet [99]. Dette gjøres ved å bruke en konsentrasjonsgradient fra 0,1-0,5 μM for hvert primerpar, og se hvilken konsentrasjon som gir høyest amplifikasjonseffektivitet. 2) Et referansegene må inkluderes i PCR-reaksjonen for å kunne justere for eventuelle konsentrasjonsforskjeller mellom prøvene som skal sammenlignes, og for varierende faktorer som pH, pipettering osv [99]. For å kunne gjennomføre en slik kalibrering, er det nødvendig å vite at amplifikasjonseffektiviteten er likest mulig mellom målgenet og referansegene. Dette gjøres gjennom effektivitetstesting, som innebærer å kjøre en qPCR-reaksjon med 5-7 ulike cDNA-konsentrasjoner, og inkludere primerpar for målgenet og flere referansegener. Deretter kan man beregne hvilket referansegene som ble amplifisert med likest mulig effektivitet som målgenet. Det valgte referansegene må også vise stabilt uttrykk uavhengig av behandling. 3) En smeltepunktsanalyse bør gjennomføres for å undersøke om primerene danner dimerer. Primerdimerer vil føre til færre frie primere som kan hybridisere med templatet, som igjen vil føre til lavere amplifikasjonseffektivitet [99]. Eventuelle primerdimerer vil

danne en smeltepunktsskurve med “skuldre”, derfor er det viktig å undersøke at smeltepunktsskurven har kun én tydelig topp.

Optimalisering av primerkonsentrasjon ble gjennomført for primerparene for PLA2 gruppe 2A, 4A, 6B, 6F, 7A, 10 og 12A. Alle disse primerene viste høyest amplifikasjonseffektivitet ved 0,3 μM . På grunn av tidsmangel ble primerkonsentrasjonen for de øvrige primerparene ikke optimalisert. 0,3 μM ble likevel valgt også for disse primerene. Effektivitetstesting ble gjennomført for enkelte av primerparene, men etter at vi ble oppmerksomme på at Lemaitre *et al.* hadde påvist at uttrykk av både HPRT, B2M og GAPDH varierer gjennom differensieringen av HaCaT [101], ble 18S valgt som referansegene for alle målgenene. Det ble kontrollert at 18S viste stabilt uttrykk fra dag 0 til dag 6 i forsøksoppsettet. Smeltepunktsskurver for samtlige primere benyttet i qPCR viste én tydelig topp. De 17 primerparene presentert i Tabell 3 ble godkjent for bruk i qPCR. Fordi primerparene amplifiserer PCR-produkt med størrelser på 100-216 basepar, egner de seg godt for bruk i qPCR, og utgjør dermed et verktøy som gjør det mulig å kvantitativt studere PLA2-uttrykk i alle humane vev- og celletyper.

2.11 qPCR

Kvantitativ PCR (qPCR) ble utført med Stratagene Mx3000P™. Alle qPCR-reaksjonene ble utført i 96-brønnersplater (Thermo scientific, ABgene® PCR Plates) med sealing (Thermo scientific, ABSolute™ QPCR Seal, Cat#: AB-1170). For hver qPCR-reaksjon ble det tilsatt 12,25 μL SYBR Green, 0,5 μL ROX, 5,75 μL vann, 5 μL cDNA-templat, 0,75 μL +primer (0,3 μM), 0,75 μL -primer (0,3 μM). For hver prøve ble det kjørt to tekniske replika. Under pipettering ble reagensene holdt på is, og etter at SYBR Green ble tilsatt, ble de forsøkt skjermet fra lys så godt som mulig. Etter at prøvene var pipettert ut i 96-brønnersplaten, ble den sentrifugert ved 900 rpm i 1 min. qPCR ble kjørt ved 60°C i 40 sykluser.

2.12 Analyse av qPCR-data med $2^{-\Delta\Delta C_Q}$

HaCaT-celler ble sådd ut i 6-brønnersbrett og høstet etter 16 timer (Dag 0), 1 døgn (Dag 1), 2 døgn (Dag 2), 3 døgn (Dag 3), 4 døgn (Dag 4), 5 døgn (Dag 5) og 6 døgn (Dag 6). Dag 0 ble satt som kontroll. Hvor mye sterkere eller svakere målgenet ble uttrykt de øvrige dagene (foldendring) ble regnet ut i forhold til kontrollen, og justert i forhold til uttrykket av referansegene 18S. Utregningen ble gjort med $2^{-\Delta\Delta C_Q}$ -metoden, utviklet av Livak og Schmittgen [104]. Først ble $\Delta\Delta C_Q$ -verdien beregnet for hver dag. Se Likning (1). Alle C_Q -verdier er rådata gitt av qPCR-instrumentet. Til slutt ble foldendring beregnet ved bruk av Likning (2).

$$\Delta\Delta C_{Q(m\ddot{a}lgenX,dagY)} = (C_{Q,m\ddot{a}lgenX} - C_{Q,ref.gen})_{dagY} - (C_{Q,m\ddot{a}lgenX} - C_{Q,ref.gen})_{Dag0} \quad (1)$$

$$\text{Foldendring} = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (2)$$

Tabell 3: Andre generasjons PLA2-primere.

Gen	NCBI-ID	Kilde	Bp	+ primer	Tm	- primer	Tm
PLA2G2A	5320	Selvdesignet	186	5'-aaggaagccgacctcagttta-3'	60,0	5'-ttgcacaggtgattctgctc-3'	60,0
PLA2G2D	26279	Primerbank-ID: 6912596a1	213	5'-gatgtcaagaagtgactgg-3'	60,9	5'-gagcagtgatgttccctg-3'	62,2
PLA2G2E	30814	Selvdesignet	101	5'-tgagcccaaacggaaaagt-3'	59,7	5'-tcttgcacacitcgaggtc-3'	61,2
PLA2G3	50487	Primerbank-ID: 142976883b1	137	5'-tgtggagtggagattctgct-3'	60,8	5'-cggtagttcggatgccatagtt-3'	62,3
PLA2G4A	600522	B. Johansens Forskningsgruppe	163	5'-catgccagacctaacgattt-3'	63,8	5'-cccaatatggctaccacagg-3'	64,0
PLA2G4C	603602	Primerbank-ID: 226693353b2	141	5'-tgccgagctctcatttctcc-3'	61,9	5'-gggtgaactcgaaccaggtc-3'	62,2
PLA2G4D	612864	Primerbank-ID: 116174753b3	177	5'-cgtcagatgcccaaaaac-3'	61,1	5'-ccaggaaggatgctgtgtgt-3'	62,6
PLA2G4F	255189	Selvdesignet	178	5'-gagttggaggtcagaccag-3'	60,0	5'-cagagaaggtcaagcccaagg-3'	60,0
PLA2G5	601192	B. Johansens Forskningsgruppe	154	5'-gccaaagagaaccacagag-3'	63,7	5'-gccgtagaagccgtagtttg-3'	63,5
PLA2G6A	611797	B. Johansens Forskningsgruppe	216	5'-ttatgtctccagggtgaca-3'	63,3	5'-gagaacttcatggccagatg-3'	63,7
PLA2G6B	612123	Selvdesignet	100	5'-tggagccatgcaatttatga-3'	60,0	5'-gacatgtggggtttcttgc-3'	60,0
PLA2G6C	603197	Selvdesignet	146	5'-ctggaacctgttggacct-3'	60,0	5'-cggatgatctgtggtcacg-3'	60,0
PLA2G6D	609567	PrimerBank-ID: 17196625b3	111	5'-cgtggatgcttggatgttgc-3'	61,0	5'-aagsgtacgttgcactcact-3'	60,7
PLA2G6F	300102	Selvdesignet	186	5'-taacgcccgggtatgacttc-3'	60,0	5'-tgcctgctaggaggacctta-3'	60,0
PLA2G7A	601690	PrimerBank-ID: 31543410a3	117	5'-attgacctggcatctcaggg-3'	61,9	5'-ccaagacttgcctctatttctg-3'	60,3
PLA2G10	603603	Selvdesignet	114	5'-cctggcagtgccgaatca-3'	68,6	5'-tgtactcagttgggctaagca-3'	63,6
PLA2G12A	611652	Selvdesignet	100	5'-ggatgtggctctccactgtt-3'	60,1	5'-tgcaccaggtcctatagcac-3'	59,9

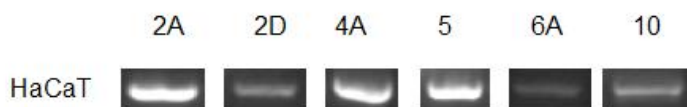
Tabell 4: Betingelser brukt i konvensjonell PCR ved bruk av andregenerasjonsprimere.

Trinn	Temperatur	Tid	Sykluser
Aktivering	95°C	2 min	1
Denaturering	95°C	50 sek	40
Annealing	60°C	50 sek	
Elongering	72°C	40 sek	
Stopp	4°C	∞	

3 Resultat

3.1 Nye forsøk bekrefter at mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6, og 10 er tilstede i HaCaT

Anthonsen *et al.* har tidligere demonstrert at mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6, og 10 er tilstede i 2-3 dager postkonfluente HaCaT [34]. mRNAet ble detektert ved bruk av første generasjon PLA2-primere, omtalt i avsnitt 2.6. For å kontrollere at disse PLA2-isotypene var uttrykt i våre 3 dager postkonfluente HaCaT, ble de samme primerene benyttet i konvensjonell PCR. Som Figur 4 viser, detekterte primerene mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6, og 10. Dette bekrefter at våre HaCaT-celler uttrykker de samme PLA2-isotypene som Anthonsen *et al.* detekterte. Resultatet bekrefter at dagens HaCaT-celler oppfører seg på samme måte som for over 10 år siden, til tross for nye parti med celler, serum, medium og liknende.



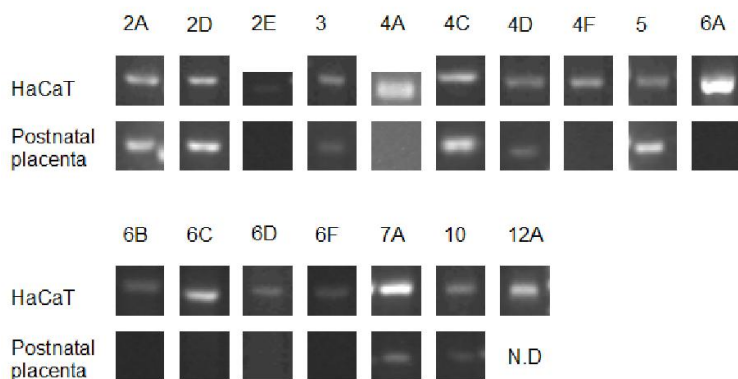
Figur 4: mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6A og 10 detektert i RNA fra 3 dager postkonfluente HaCaT ved bruk av førstegenerasjons PLA2-primere i konvensjonell PCR.

3.2 Andregenerasjons PLA2-primere detekterer unike produkt av riktig lengde

Amplifikasjonsproduktene fra førstegenerasjonsprimerene er 320-730 basepar lange, og er derfor uegnede i qPCR, hvor produktene ideelt sett skal være 50-200 basepar lange for å sikre høyest mulig amplifikasjonseffektivitet [99]. For å kunne studere PLA2-uttrykk kvantitativt, var det derfor ønskelig å utvikle nye primere som amplifiserer kortere produkt. Primerpar for PLA2 gruppe 2A, 2D, 2E, 3, 4A, 4C, 4D, 4F, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A, 10 og 12A har blitt utviklet. Primerene ble vist å amplifisere spesifikke produkt av riktig lengde, og kunne dermed benyttes i konvensjonell PCR. Se Avsnitt 2.7 og 2.8 for metode. Se Tabell 3 for primersekvenser. Primerene ble testet og godkjent for bruk også i qPCR. Se Avsnitt 2.10 for primeroptimalisering. Fordi primerparene amplifiserer PCR-produkt med størrelser på 100-216 basepar, egner de seg godt for bruk i qPCR, og utgjør dermed et verktøy som gjør det mulig å studere PLA2-uttrykk både kvantitativt og kvalitativt i alle humane vev- og celletyper.

3.3 Andregenerasjonsprimere detekterer mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6 og 10 i HaCaT

3 dager postkonfluente HaCaT uttrykker PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6, og 10, som vist ved bruk av førstegenerasjonsprimere (se Avnsitt 3.1). En ny generasjon med PLA2-primere har blitt designet og godkjent for bruk i konvensjonell PCR (se Avsnitt 3.2). Andregenerasjonsprimere for PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6, og 10 ble derfor benyttet for å se om det var mulig å detektere mRNA i 3 dager postkonfluente HaCaT. mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6, og 10 ble detektert, som Figur 5 viser. Resultatet bekrefter at andregenerasjonsprimere detekterer transkript slik førstegenerasjonsprimere gjør, og underbygger at andregenerasjonsprimere kan benyttes i stedet for førstegenerasjonsprimere. Dette åpner dermed for kvantitativ, i tillegg til kvalitativ, kartlegging av uttrykk av PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6, og 10.



Figur 5: PLA2-isotyper detektert ved konvensjonell PCR i 3 dager postkonfluente HaCaT og i postnatal placenta. Uttrykk av PLA2G12A har ikke blitt fastlagt i postnatal placenta. Bildene er ikke tatt fra samme gelbilde, sterkere bånd betyr derfor nødvendigvis ikke sterkere genuttrykk. Se Avsnitt 2.9 for PCR-betingelser.

3.4 Førstegangspåvisning av mRNA fra PLA2 gruppe 2E, 3, 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A og 12A i HaCaT

mRNA fra PLA2 gruppe 2E, 3, 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A og 12A har, så vidt oss bekjent, ikke blitt detektert i HaCaT. Primere har blitt designet for samtlige av disse PLA2-isotypene, og blitt godkjent for bruk i konvensjonell PCR (se Avsnitt 3.2). Primerene ble derfor benyttet i konvensjonell PCR for å undersøke om 3 dager postkonfluente HaCaT uttrykker PLA2-isotypene. Primerene detekterte mRNA fra PLA2 gruppe 2E, 3, 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A og 12A, som Figur 5 viser. Dette er første gang, så vidt oss bekjent, samtlige PLA2-isotyper har blitt detektert i HaCaT. Resultatet viser at HaCaT

uttrykker et mangfold av PLA2-isotyper, som også tyder på at det fins et tilsvarende mangfold av PLA2-enzymet i normal epidermis. Uttrykk av en rekke PLA2-isotyper i HaCaT bekrefter at HaCaT er et godt modellsystem for å studere PLA2-avhengige prosesser.

3.5 Andregenerasjonsprimere detekterer mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 3, 5 og 7A i human placenta

Tidligere studier har påvist mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2E, 3, 4A, 5, 6B, 6F og 7A i human placenta [46, 30, 102, 41, 92, 28]. For å kontrollere at andregenerasjonsprimerene detekterer PLA2-isotyper i humant vev (i tillegg til i HaCaT, se Avsnitt 3.3 og 3.4), ble andregenerasjonsprimere for PLA2 gruppe 2A, 2E, 3, 4A, 5, 6B, 6F og 7A benyttet for å detektere mRNA i human placenta. Postnatal placenta ble lagt i RNAlater® rett etter fødsel og oppbevart i fryser med -20°C. 100 mg vev ble homogenisert og gav et totalt RNA-utbytte på 37, 5 µg. Med konvensjonell PCR ble mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 3, 5 og 7A detektert, se Figur 5. PLA2 gruppe 2E, 4A, 6B, 6F ble ikke detektert. Resultatet viser at andregenerasjonsprimerene kan detektere PLA2-isotyper i humant vev.

3.6 Førstegangspåvisning av mRNA fra PLA2 gruppe 2D, 4C, 4D og 10 i human placenta

Så vidt oss bekjent, har verken PLA2 gruppe 2D, 4C, 4D eller 10 blitt påvist i human placenta. Andregenerasjonsprimere for disse PLA2-isotypene har vist seg å spesifikt detektere mRNA fra HaCaT (se Avsnitt 3.3 og 3.4). Andregenerasjonsprimere for PLA2 gruppe 2D, 4C, 4D og 10 ble derfor benyttet for å undersøke om postnatal human placenta uttrykker disse isotypene. Primerne detekerte mRNA fra PLA2 gruppe 2D, 4C, 4D og 10 i RNA isolert fra placenta, som Figur 5 viser. Dette er, så vidt vi kjenner til, første gang PLA2 gruppe 2D, 4C, 4D og 10 har blitt påvist i human placenta. Resultatene gir derfor økt kunnskap om PLA2-mangfoldet i human placenta.

3.7 Sterk oppregulering av PLA2G2A ved differensiering

Haas *et al.* har med immunofluorescens lokalisert PLA2G2A-enzymet i human epidermis, og enzymet ble i størst grad lokalisert i stratum corneum [27]. Lemaitre *et al.* viste at PLA2G2A oppreguleres med en foldendring på 9,9 i differensierte HaCaT sammenlignet med prolifererende HaCaT [101]. Andregenerasjonsprimere for PLA2G2A ble benyttet i qPCR for å kartlegge uttrykk av PLA2G2A gjennom HaCaT-cellers differensiering. HaCaT-celler ble sådd ut i 6-brønnersbrett og høstet etter 16 t, 1 døgn, 2 døgn, 3 døgn, 4 døgn, 5 døgn og 6 døgn. RNA ble isolert fra cellene, som representerer keratinocytter i 7 ulike differensieringsnivå, fra prolifererende celler til 3 dager postkonfluente celler. Som man kan se av Figur 6, viste PLA2G2A en 34-folds oppregulering gjennom differensieringsprosessen. Resultatet tyder på at PLA2G2A spiller en viktig rolle i de øvre strata i epidermis.

3.8 HaCaT uttrykker PLA2 gruppe 5 og 10 avhengig av differensieringsgrad

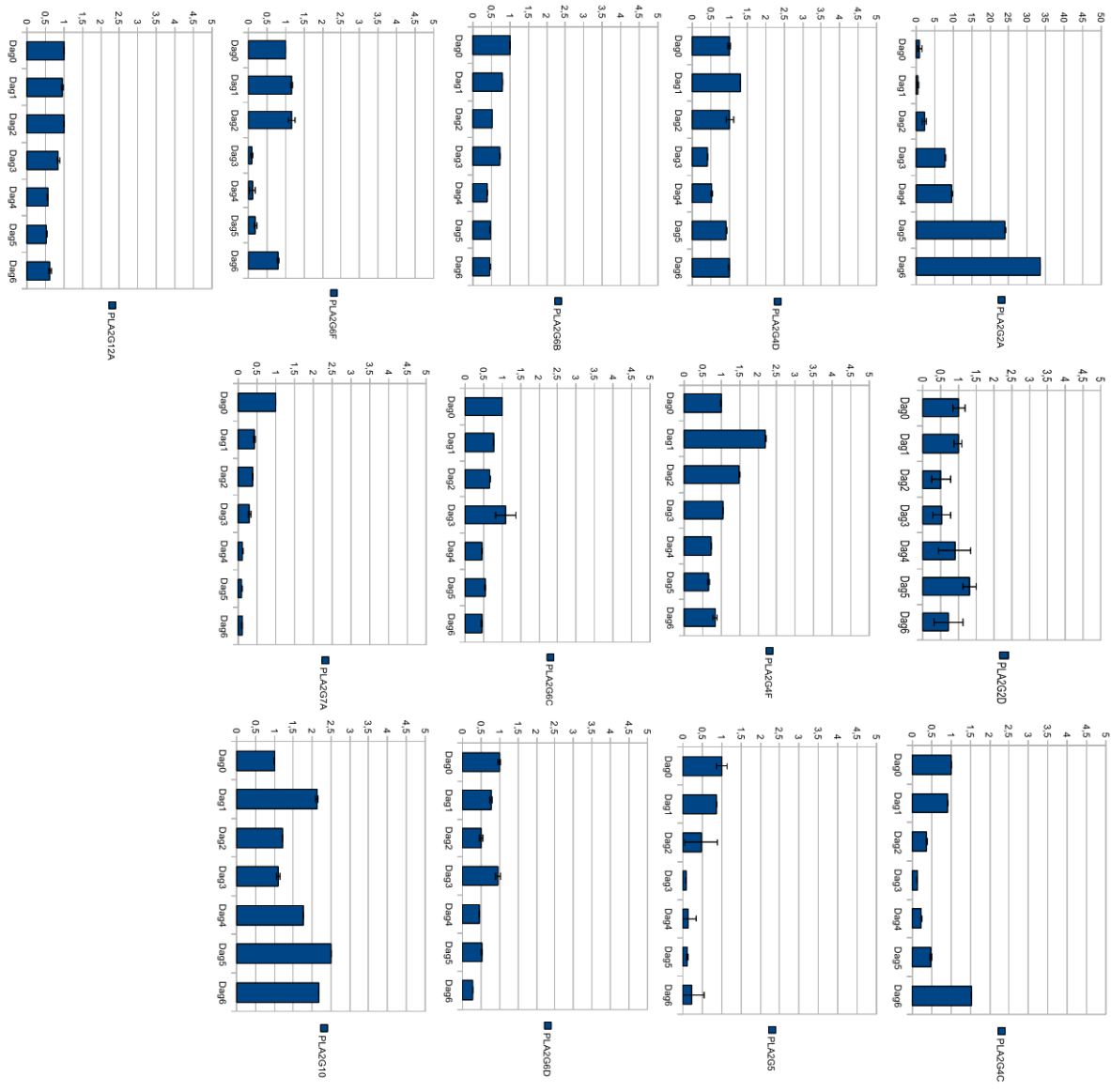
Haas *et al.* har ved immunofluorescens lokalisert PLA2-enzymet fra gruppe 5 og 10 i human epidermis [27]. Gruppe 5 ble i hovedsak lokalisert i nedre strata, mens gruppe 10 ble observert i alle strata over stratum basale. Funnene ble bekreftet i primære keratinocytter. Andregenerasjonsprimere for PLA2 gruppe 5 og 10 ble derfor benyttet i qPCR for å kartlegge uttrykk av isotypene i HaCaT i 7 ulike nivå i cellenes differensieringsprosess. Figur 6 viser at PLA2 gruppe 5 og 10 ble detektert i alle 7 differensieringsnivå. Uttrykket av PLA2 gruppe 5 ser ut til å avta i løpet av differensieringen, mens gruppe 10 viser noe økt uttrykk i differensierte kontra prolifererende celler. Forsøket ble gjentatt i 3 bioreplika.

3.9 HaCaT uttrykker PLA2 gruppe 2D, 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A, og 12A uavhengig av differensieringsgrad

mRNA fra PLA2 gruppe 2E, 3, 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A og 12A har i denne masteroppgaven for første gang blitt påvist i HaCaT (se Avsnitt 3.4). mRNAet ble detektert i 3 dager postkonfluente HaCaT ved bruk av andregenerasjons PLA2-primere i konvensjonell PCR. PLA2 gruppe 4A og 6A har tidligere blitt påvist i HaCaT [34], men uttrykket av isotypene har ikke blitt studert gjennom HaCaT-cellers differensiering. For å kartlegge uttrykk av alle disse isotypene i 7 ulike differensieringsnivå av HaCaT, fra prolifererende celler til 3 dager postkonfluente celler, ble primere for PLA2 gruppe 2E, 3, 4A, 4C, 4D, 4F, 6A, 6B, 6D, 6F, 7A og 12A benyttet i qPCR. Som vist i Figur 6, ble mRNA fra PLA2 gruppe 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A og 12A detektert ved alle 7 differensieringsnivå. Forsøket ble gjentatt i 3 bioreplika. Det lyktes ikke å oppnå reproducerbare resultater for PLA2 gruppe 2E, 3, 4A og 6A. Resultatene tyder på at PLA gruppe 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A og 12A er tilstede i alle strata i human epidermis.

3.9 HaCaT uttrykker PLA2 gruppe 2D, 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A, og 12A uavhengig av differensieringsgrad

3 RESULTAT



Figur 6: Foldendring (y-akse) for PLA2-isotyper gjennom HaCaT-keratinocytters differensieringsprosess. 600.000 celler ble sådd ut i 6-brønnersbrett og høstet etter 16 timer (Dag 0), 1 døgn (Dag 1), 2 døgn (Dag 2), 3 døgn (Dag 3), 4 døgn (Dag 4), 5 døgn (Dag 5) og 6 døgn (Dag 6). Cellene oppnådde konfluens ved dag 3. Uttrykk av PLA2-isotyper ble kartlagt ved bruk av qPCR og $\Delta\Delta C_Q$, som beregner relativ foldendring sammenlignet med kontrollen, som i dette forsøksoppsettet var dag 0. Legg merke til at y-aksen for PLA2G2A går til 50.

4 Diskusjon

Formålet med denne masteroppgaven var å finne primerpar til samtlige 28 humane PLA2-isotyper for å kunne studere om genene er uttrykt i HaCaT-keratinocytter, og om uttrykket varierer gjennom keratinocyttenes differensiering. Vi lyktes i løpet av masteroppgaveperioden med å utvikle primerpar for 17 av isotypene som fungerte tilfredsstillende. Primerparene ble først benyttet i konvensjonell PCR for å undersøke om mRNA fra de tilhørende PLA2-genene er tilstede i 3 dager postkonfluente HaCaT og i postnatal placenta, som ble benyttet som antatt positiv kontroll. Deretter ble primerne benyttet i qPCR for å kartlegge hvordan PLA2-genene uttrykkes gjennom keratinocytters differensiering fra prolifererende celler til hornceller fylt med keratin.

Alle 17 primerparene detekterte mRNA fra tilhørende PLA2-isotyper i 3 dager postkonfluente HaCaT. mRNA fra 8 PLA2-isotyper ble detektert i postnatal placenta. PLA2 gruppe 2E, 3, 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A og 12A har aldri før blitt påvist i HaCaT, mens gruppe 2D, 4C, 4D og 10 aldri før har blitt påvist i human placenta. Funnene kan bidra til økt kunnskap om PLA2-familien og gi større forståelse av funksjon og potensiell deltakelse i inflammasjon. I tillegg til førstegangspåvisningene av PLA2-isotyper i HaCaT og placenta, ble mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 6A, 10 og 12A påvist i HaCaT, mens mRNA fra PLA2 gruppe 2A, 3, 4D, 5 og 7A ble påvist i placenta. Dette har også blitt vist i tidligere studier, og bekrefter at de nye primerparene fungerte som ønsket.

Uttrykk av PLA2-enzymet gjennom HaCaT-cellers differensieringsprosess ble studert ved bruk av primerene og qPCR. 13 av 17 isotyper gav reproducerbare resultater, som viste at genene uttrykkes gjennom hele differensieringsprosessen. Samtlige 13 gener, bortsett fra PLA2G2A, ser ut til å være konstant uttrykt under differensieringen, som antyder at PLA2-isotypene koder for proteiner som er med på å utøve oppgaver i frisk hud.

4.1 En rekke PLA2-isotyper er uttrykt i HaCaT og human placenta

4.1.1 PLA2-mangfold

PLA2-enzymet katalyserer hydrolysen av fettsyrer i *sn2*-posisjon i glyserofosfolipider, og produserer med det lysosofosfolipider og frie fettsyrer. Enzymene har blitt påvist i en rekke ulike typer celler og vev (se Avsnitt 1), og har vist seg å ha mange ulike funksjoner [17]. PLA2G2A kan opptre som et akutfaseprotein [105] og er trolig en del av kroppens medfødte immunsystem, som kan samarbeide med andre antibakterielle proteiner. Ikke-humane PLA2-isotyper har blitt påvist i gift fra blant annet slanger og skorpioner [58]. En rekke PLA2-isotyper er oppregulert i inflammatoriske sykdommer som psoriasis og leddgikt. Dette antyder en vertsforsvarfunksjon for PLA2-enzymene. PLA2G6A er involvert i fosfolipid- og membranremodellering [106]. PLA2 ansees generelt som første trinn i eikosanoidkaskaden, og er derfor et potensielt mål for kontroll av eikosanoidproduksjon. Økt produksjon av prostaglandiner i livmor er avgjørende for igangsetting av fødsel [103], derfor er PLA2 viktig i reguleringen av igangsetting av

fødsel. PLA2G4As arakidonspesifisitet og kalsiumavhengighet for translokasjon til cellulære membraner, tyder på at enzymet deltar i celledisignalisering. I tillegg har det blitt foreslått at sekretoriske PLA2s inflammatoriske rolle muligens er kontrollert gjennom en M-type-reseptor. Reseptorer i mus har blitt vist å binde ulike sPLA2, men ingen M-type-reseptorer har foreløpig blitt funnet i mennesker [75].

Det er i dag identifisert 28 humane PLA2-isotyper [17]. Selv om isotypene skiller seg fra hverandre, enten med hensyn til struktur eller plassering, utfører i hovedsak alle isotypene samme reaksjon. Det har tidligere blitt påvist at HaCaT-keratinocytter uttrykker PLA2 gruppe 2A, 2D, 4A, 5, 6A, 10 [25, 34]. I denne masteroppgaven har det i tillegg blitt påvist uttrykk av PLA2 gruppe 2E, 3, 4C, 4D, 4F, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A og 12A i 3 dager postkonfluente HaCaT. Resultatene viser at et bredt utvalg PLA2-isotyper er uttrykt i HaCaT, og antyder at de tilhørende enzymene vil være tilstede i human epidermis. Dette må naturligvis undersøkes på både protein- og metabolitnivå. Vi har i denne oppgaven også vist uttrykk av 4 nye PLA2-isotyper i human placenta, nemlig gruppe 2D, 4C, 4D og 10. Tidligere har PLA2 gruppe 2A, 2E, 3, 4A, 5, 6B, 6F, 7A og 12A blitt påvist i human placenta [28, 30, 102, 41, 46, 92, 52, 103]. Resultatene våre tyder derfor på at også placenta er et vev med rikt mangfold av PLA2-isotyper. Det må imidlertid nevnes at placenta-forsøkene utført i denne masteroppgaven kun ble utført én gang, og må derfor tolkes med forsiktighet.

Dersom det er tilfelle at 17 ulike isotyper av samme enzym er uttrykt i HaCaT og 13 isotyper er uttrykt i placenta, åpner dette for spørsmål om hvilke funksjoner enzymene spiller. Har hver isotype en unik funksjon, og i så fall, kontrolleres dette via enzymspesifisitet eller via cellulær plassering? Er enkelte isotypers funksjon avhengig av andre isotypers funksjon, og hvordan kontrolleres i så fall dette samspillet? For å besvare slike spørsmål, vil det være nødvendig med omfattende studier med bruk av spesifikke hemmere, knockout-/knockin-mus og siRNA (short interfering RNA).

4.1.2 PLA2-uttrykk gjennom HaCaT-keratinocytters differensiering

Kartlegging av PLA2-isotypenes uttrykk gjennom keratinocytters differensiering, kan antyde hvilke funksjoner hver isotype er involvert i. Om en isotype sterkt opp- eller nedreguleres under differensiering, har trolig isotypen en rolle som er viktigere i de øvre eller nedre strata i epidermis. En viktig funksjon i de øvre strata er å opprettholde barrierefunksjonen i epidermis. Frie fettsyrer og nedstrøms metabolitter er med på å danne en barriere som er ugjennomtrengelig for mikroorganismer og andre fremmede partikler. Flere studier har også vist at lipider i stratum corneum deltar i reguleringen av cellekohesjon og avflassing av døde hornceller [107]. I differensieringsforsøkene våre viste PLA2G2A sterk oppregulering gjennom differensieringen. Det er derfor, sett i lys av våre resultater, naturlig å tro at PLA2G2A spiller en rolle i ovenfornevnte prosesser. Det har tidligere blitt gjennomført få studier som har undersøkt PLA2-uttrykk gjennom keratinocytters differensiering. Haas *et al.* har kartlagt uttrykket av sekretoriske PLA2 i fullhudbiopsier og i prolifererende og differensierte primære keratinocytter [27]. I fullhudbiopsiene fant de tilstedeværelse av PLA2G2A som korrelerer med våre funn. Dette forsterker også antakelsen om at HaCaT-keratinocytter oppfører seg på samme måte som

keratinocytter i normal epidermis.

Differensieringsresultatene for de øvrige PLA2-isotypene, presentert i Figur 6, viser at samtlige isotyper uttrykkes i alle differensieringsnivå hos HaCaT. Forsøkene ble gjentatt i 3 bioreplika, men uttrykket sprikte noe mellom dem. Derfor har vi valgt å analysere resultatene kvalitativt framfor kvantitativt. Av disse isotypene har PLA2 gruppe 2D, 5 og 10 tidligere blitt studert i differensieringsstudier. Haas *et al.* fant PLA2G5 i hovedsak i de nedre strata, mens PLA2G10 ble lokalisert i alle strata over stratum basale. Funnene ser ut til å samsvare med våre funn, og kan dermed antyde at PLA2G5 deltar i funksjoner knyttet til de nedre strata, som å forhindre væsketap, mens PLA2G10 kan hende deltar i funksjoner som opprettholdelse av barrierefunksjon og vertsforsvar. Uttrykket av PLA2 gruppe 2E, 3, 4A og 6A sprikte mye mellom de 3 bioreplika, eller var vanskelig å detektere, derfor valgte vi å ikke inkludere resultatene.

4.1.3 PLA2-isotyper kan vise seg å spille en sentral rolle i psoriasis

En rekke PLA2-isotyper har blitt vist å spille en sentral rolle i inflammatoriske sykdommer gjennom frigjøring av arakidonsyre, med påfølgende produksjon av eikosanoider. Mange PLA2-isotyper, inkludert et knippe av de førstegangspåviste isotypene i HaCaT, har også vist seg å være induserbare i respons til proinflammatoriske cytokiner [28, 36, 84]. I denne masteroppgaven har det blitt påvist uttrykk av 11 nye PLA2-isotyper i HaCaT-keratinocytter, som indikerer at de tilhørende proteinene vil være tilstede i human epidermis. Resultatene øker kunnskapen om PLA2-uttrykk i keratinocytter og legger grunnlag for videre studier av PLA2s rolle i betennelsessykdommer i huden, som psoriasis.

4.2 Primerene er et høyst aktuelt verktøy i videre PLA2-studier

Primerparene presentert i denne masteroppgaven utgjør et viktig verktøy for å kartlegge hvilke molekylære mekanismer PLA2 deltar i, og på hvilken måte de ulike PLA2-isotypene deltar. Etter at mekanismene er kartlagt i frisk hud, vil det være svært interessant å kartlegge PLA2-mekanismer i vev involvert i psoriasis. Sammenligning av uttrykk i friskt vev versus sykt vev vil åpne for økt forståelse av hvilke PLA2-isotyper som deltar i sykdomsutviklingen, og på hvilken måte dette forgår. Likevel vil en oversikt på transkripsjonsnivå langt fra være nok. Utfyllende kartlegging må til også på proteinnivå og metabolittnivå, både *in vitro* og *in vivo*, for å forstå hvilke funksjoner PLA2 har. Studien Haas *et al.* publiserte i 2005 [27] er et godt eksempel på en helhetlig studie som inkluderte analyse av PLA2-uttrykk på både mRNA- og proteinnivå i hudbiopsier fra friske mennesker, i primære keratinocytter fra frisk human hud og hudbiopsier fra psoriasispatienter.

I tillegg vil studier av PLA2-uttrykk og enzymaktivitet etter stimulering av proinflammatoriske cytokiner som IL-1 og TNF, være høyst aktuelt for å bestemme enzymenes deltakelse og reguleringsmekanismer i betennelsesprosesser. I slutfasen av arbeidet med denne masteroppgaven ble det gjennomført ett forsøk med stimulering av IL-1 og TNF. De svært preliminare resultatene (ikke vist) indikerte

at PLA2 gruppe 4A og 5 hadde tredoblet uttrykk i respons til TNF, mens gruppe 2D og 6A hadde en 8-folds endring i respons til IL-1. Cytokinene har tilsynelatende unike effekter og initierer dermed ulike signalkaskader og også nedstrøms biologiske effekter. Disse isotypene kan derfor være sentrale i igangsettingen av psoriasis og andre betennelsestilstander.

Gjennomgangen i introduksjonen om hvor PLA2-enzymene tidligere har blitt detektert, viser PLA2s sterke kobling til en rekke inflammasjonssykdommer og også kreft. PLA2-primerene utgjør et nyttig verktøy i alle inflammasjonsstudier, eksempelvis studier av leddgikt, diabetes og hjerte-/karsykdommer. Enkelte PLA2-isotyper eller grupper viser sterkere koblinger til visse sykdomstilstander enn andre. PLA2 gruppe 6B, 6D, 6F har i særskilt grad blitt koblet til kosthold og lipidmetabolisme, og kan derfor inkluderes i kostholdsstudier. PLA2 gruppe 2A, 2E, 3 og 4D har blitt sterkt knyttet til betennelsesykdommer i huden, og bør derfor inkluderes i studier av psoriasis, eksem, lepra osv. PLA2G3 har vist en 40-fold oppregulering i tykktarmskreft og kan potensielt benyttes som biologisk markør for krefttypen.

4.3 Tekniske aspekter ved laboratoriearbeidet

Resultatene vist i Figur 6 er alle fra tredje bioreplika. Av de 3 bioreplikaene, ble dette regnet som det mest solide fordi studenten gjennom arbeidet med masteroppgaven hadde tilegnet seg stadig ny kunnskap og erfaring. Bioreplikaet hadde også størst RNA-utbytte og viste best ratioer i kvalitetssjekk av RNA. Det kan spekuleres i hva årsaken til de noe sprikende resultater kan være. Ulikt generasjonstall hos HaCaT-cellene er en mulig kilde til variasjon. I de to første forsøksoppsettene ble cellene sådd ut i 7 brønner, hver merket dag 0, dag 1, osv. Cellene ble høstet fra brønnen merket den tilhørende dag. I tredje forsøksoppsett ble ikke brønnene merket ved utsåing, men alle brønnene ble studert i mikroskop før høsting, og den brønnen med minst grad av konfluens ble høstet. Dette sikret en gradvis økning i konfluens fra dag 0 til dag 6, åpner for sammenligning med keratinocytt-differensiering *in vivo* i større grad enn høstingsstrategien i bioreplika 1 og 2. Mekanisk stress, endringer i pH og andre forhold som er vanskelig å kontrollere, kan også ha påvirket cellene, og dermed forårsaket variasjon i resultatene.

Enkelte av båndene fra agarosegelen som er vist i Figur 5 er svake, som indikerer at genet er lavt uttrykt. Dette gjelder spesielt for PLA2G2E (i trykte utgaver av oppgaven kan det være vanskelig å skilne båndet). I qPCR hadde vi problemer med å detektere PLA2 gruppe 2E, 4A og 6A. Haas *et al.* klarte ikke å detektere PLA2G2E i hud [27], og Rys-Sikora *et al.* måtte bruke to runder med PCR og nøstede primere for å detektere 4A [23]. Dette bekrefter at genene er lavt uttrykt, og at bruk av mer templat, flere runder PCR, eventuelt rense RNAet for å få renere mRNA, kan være nødvendig for deteksjon.

Kjørebetingelsene for konvensjonell PCR med de gamle PLA2-primerene beskrevet i artiklene til Anthonsen *et al.* [98, 34], gav ingen produkt og/eller uspesifikke produkt. Både antall sykluser og annealingstemperatur ble testet, før vi til slutt kom fram til at betingelsene beskrevet i Avsnitt 2.6 gav

best resultat. Dette viser at bruk av primere i ulike laboratorier, hvor ulike reagenser og instrumenter blir brukt, ofte krever en optimaliseringsrunde før primerene fungerer som ønsket.

Av de 17 PLA2-isotypene undersøkt i human placenta, lyktes vi ikke med å detektere gruppe PLA2 gruppe 2E, 3, 4A, 6B og 6F, selv om disse har blitt påvist i placenta tidligere. Dette kan skyldes at placenta er sammensatt av mange ulike typer vev og celler [103], og ved deteksjon av mRNA er det vanskelig å fastslå fra hvilke vev eller celler RNAet stammer. I tidligere påvisninger har det ikke gått klart fram når vevsprøven har blitt tatt. Genuttrykk kan variere mye fra tidlig svangerskap til fødsel, og kan derfor være årsaken til manglende deteksjon av mRNA. En alternativ årsak kan være at 2E, 3, 4A, 6B og 6F er svært lavt uttrykt i placenta, og lå under deteksjonsgrensen i vårt forsøk.

I differensieringsstudier er det viktig å kunne vise at cellene faktisk differensieres i den type forsøksoppsett som blir valgt. Forsøksoppsettet i denne masteroppgaven, som innebar å skape 7 ulike differensieringsnivå av keratinocytter, ble valgt på grunnlag av erfaring fra tidligere studier gjort i Berit Johansens forskningsgruppe [100], som også bekreftes i annen litteratur [101]. Erfaringen tilsier at HaCaT-keratinocytter differensieres som følge av kontaktinhibering av proliferasjon, og sulting ved bruk av medium inneholdende 0,5 % serum. For å vise dette kan uttrykk av KRT10, som er en kjent differensieringsmarkør i keratinocytter [101], undersøkes. KRT10-uttrykk ble studert i tredje bioreplika. Uttrykket viste overraskende nesten konstant uttrykk fra dag 0 til dag 6, noe som kan tyde på at cellene ikke hadde differensiert som forventet. Likevel må det påpekes at uttrykket av PLA2G2A, som viste sterk økning fra dag 0 til dag 6, overrensstemmende med det Haas *et al.* observerte i normal hud, tyder på at HaCaT-cellene faktisk differensierte.

4.4 Mål for fremtiden

På grunn av tidsmangel ble ikke prosessen med design og uttesting av primere utført så grundig som vi ønsket. Ingen av primerparene ble sekvensert, noe som er nødvendig for å helt sikkert kunne fastslå at primerene amplifiserer produkt fra tilhørende mRNA. Primerkonsentrasjonen ble ikke optimalisert for alle primerparene, og effektivitetstesting ble ikke gjennomført for alle primerparene. Før primerparene tas i bruk i videre studier, anbefaler vi sterkt at disse kravene oppfylles. Vi lyktes med å utvikle primerpar for 17 av de humane PLA2-isotypene. For å kunne kartlegge alle uttrykk av alle 28 isotyper som i dag har blitt identifisert, bør det utvikles primerpar også for de øvrige isotypene.

5 Konklusjon

Det har i denne masteroppgaven blitt utviklet primerpar egnet for bruk i konvensjonell, så vel som kvantitativ PCR for 17 humane PLA2-isotyper. Ved bruk av primerene har det blitt vist uttrykk av PLA2 gruppe 2A, 2D, 2E, 3, 4A, 4C, 4D, 4F, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A, 10 og 12A i 3 dager postkonfluente HaCaT, samt PLA2 gruppe 2A, 2D, 3, 4C, 4D, 5, 7A og 10 i human postnatal placenta. Primerene har også blitt benyttet i qPCR til å kartlegge hvordan PLA2-isotypene uttrykkes gjennom HaCaT-keratinocytters differensiering fra prolifererende celler til hornceller fylt med keratin. PLA2G2A viste en sterk oppregulering, mens PLA2 gruppe 4C, 4D, 4F, 5, 6B, 6C, 6D, 6F, 7A, 10 og 12A viste forholdsvis konstant uttrykk under differensieringen. Resultatene viser at et mangfold av PLA2-isotyper er uttrykt i både HaCaT og placenta, som indikerer at de PLA2-enzymene spiller en sentral rolle i normal hud og placenta. Det er dermed desto viktigere å finne ut hvilke PLA2-enzymene som er involvert i patologiske versus fysiologiske prosesser, og å utvikle målrettede terapeutiske strategier mot de "proinflammatoriske" isotypene.

6 Referanser

Referanser

- [1] J. Kanitakis, Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin., *Eur J Dermatol* 12 (4) (2002) 390–399.
- [2] C. Blanpain, E. Fuchs, Epidermal stem cells of the skin., *Annu Rev Cell Dev Biol* 22 (2006) 339–373.
- [3] R. K. Freinkel, D. T. Woodley, *The biology of the skin*, Parthenon Publishing, 2000.
- [4] F. O. Nestle, D. H. Kaplan, J. Barker, Psoriasis., *N Engl J Med* 361 (5) (2009) 496–509.
- [5] S. B. Hoath, D. G. Leahy, The human stratum corneum as extended, covalently cross-linked biopolymer: mathematics, molecules, and medicine., *Med Hypotheses* 66 (6) (2006) 1191–1198.
- [6] S. Andersen, W. Sjørusen, A. Lægroid, G. Volden, B. Johansen, Elevated expression of human nonpancreatic phospholipase a2 in psoriatic tissue, *Inflammation* 18.
- [7] C. E. M. Griffiths, J. N. W. N. Barker, Pathogenesis and clinical features of psoriasis., *Lancet* 370 (9583) (2007) 263–271.
- [8] A. M. Bowcock, J. G. Krueger, Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis., *Nat Rev Immunol* 5 (9) (2005) 699–711.
- [9] B. J. Nickoloff, H. Xin, F. O. Nestle, J.-Z. Qin, The cytokine and chemokine network in psoriasis., *Clin Dermatol* 25 (6) (2007) 568–573.
- [10] J. E. Gudjonsson, J. T. Elder, Psoriasis: epidemiology., *Clin Dermatol* 25 (6) (2007) 535–546.
- [11] J. L. Wallace, How do nsoids cause ulcer disease?, *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 14 (1) (2000) 147–159.
- [12] C. Camisa, *Handbook of psoriasis*, Blackwell Publishing, 2004.
- [13] C. E. Griffiths, C. M. Clark, R. J. Chalmers, A. L. W. Po, H. C. Williams, A systematic review of treatments for severe psoriasis., *Health Technol Assess* 4 (40) (2000) 1–125.
- [14] B. C. B. Jansen, *Felleskatalogen*, Fagbokforlaget, 2011.
- [15] L. Naldi, Malignancy concerns with psoriasis treatments using phototherapy, methotrexate, cyclosporin, and biologics: facts and controversies., *Clin Dermatol* 28 (1) (2010) 88–92.

- [16] T. U. Nguyen, J. Koo, Etanercept in the treatment of plaque psoriasis., *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2 (2009) 77–84.
- [17] R. H. Schaloske, E. A. Dennis, The phospholipase a2 superfamily and its group numbering system., *Biochim Biophys Acta* 1761 (11) (2006) 1246–1259.
- [18] I. Kudo, M. Murakami, Phospholipase a2 enzymes., *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69 (2002) 3–58.
- [19] A. Feuerherm, K. Joergensen, E. Anderssen, R. M. Sommerfelt, A. Laegreid, B. Johansen, Platelet activating factor induces proliferation in hacat keratinocyte through an arachidonic acid dependent mechanism, Manuscript in preparation.
- [20] R. Rivera, J. Chun, Biological effects of lysophospholipids., *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 160 (2008) 25–46.
- [21] J. Balsinde, M. A. Balboa, P. A. Insel, E. A. Dennis, Regulation and inhibition of phospholipase a2., *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39 (1999) 175–189.
- [22] R. M. Kramer, C. Hession, B. Johansen, G. Hayes, P. McGray, E. P. Chow, R. Tizard, R. B. Pepinsky, Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase a2., *J Biol Chem* 264 (10) (1989) 5768–5775.
- [23] K. E. Rys-Sikora, R. L. Konger, J. W. Schoggins, R. Malaviya, A. P. Pentland, Coordinate expression of secretory phospholipase a(2) and cyclooxygenase-2 in activated human keratinocytes., *Am J Physiol Cell Physiol* 278 (4) (2000) C822–C833.
- [24] E. Maury, M. C. Prévost, M. F. Simon, D. Redoules, I. Ceruti, R. Tarroux, M. Charveron, H. Chap, Identification of two secreted phospholipases a2 in human epidermis., *J Invest Dermatol* 114 (5) (2000) 960–966.
- [25] A. Schadow, K. Scholz-Pedretti, G. Lambeau, M. H. Gelb, G. Furstenberger, J. Pfeilschifter, M. Kaszkin, Characterization of group x phospholipase a2 as the major enzyme secreted by human keratinocytes and its regulation by the phorbol ester tpa, *The Journal of Investigative Dermatology* 116, NO 1.
- [26] J. Ishizaki, N. Suzuki, K. Higashino, Y. Yokota, T. Ono, K. Kawamoto, N. Fujii, H. Arita, K. Hanasaki, Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase a(2)s., *J Biol Chem* 274 (35) (1999) 24973–24979.
- [27] U. Haas, M. Podda, M. Behne, S. Gurrieri, A. Alonso, G. Fürstenberger, J. Pfeilschifter, G. Lambeau, M. H. Gelb, M. Kaszkin, Characterization and differentiation-dependent regulation of

- secreted phospholipases a in human keratinocytes and in healthy and psoriatic human skin., *J Invest Dermatol* 124 (1) (2005) 204–211.
- [28] N. Suzuki, J. Ishizaki, Y. Yokota, K. Higashino, T. Ono, M. Ikeda, N. Fujii, K. Kawamoto, K. Hanasaki, Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase a(2)s., *J Biol Chem* 275 (8) (2000) 5785–5793.
- [29] S. Masuda, M. Murakami, M. Mitsuishi, K. Komiyama, Y. Ishikawa, T. Ishii, I. Kudo, Expression of secretory phospholipase a2 enzymes in lungs of humans with pneumonia and their potential prostaglandin-synthetic function in human lung-derived cells., *Biochem J* 387 (Pt 1) (2005) 27–38.
- [30] E. Valentin, F. Ghomashchi, M. H. Gelb, M. Lazdunski, G. Lambeau, Novel human secreted phospholipase a(2) with homology to the group iii bee venom enzyme., *J Biol Chem* 275 (11) (2000) 7492–7496.
- [31] C. M. Mounier, D. Wendum, E. Greenspan, J.-F. Fléjou, D. W. Rosenberg, G. Lambeau, Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases a2 in human colorectal adenocarcinomas: spla2-iii as a biomarker candidate., *Br J Cancer* 98 (3) (2008) 587–595.
- [32] R. M. Kramer, G. C. Checani, A. Deykin, C. R. Pritzker, D. Deykin, Solubilization and properties of ca²⁺-dependent human platelet phospholipase a₂., *Biochim Biophys Acta* 878 (3) (1986) 394–403.
- [33] M. McCord, M. Chabot-Fletcher, J. Breton, L. A. Marshall, Human keratinocytes possess an sn-2 acylhydrolase that is biochemically similar to the u937-derived 85-kda phospholipase a₂., *J Invest Dermatol* 102 (6) (1994) 980–986.
- [34] M. W. Anthonsen, A. Solhaug, B. Johansen, Functional coupling between secretory and cytosolic phospholipase a2 modulates tumor necrosis factor- α - and interleukin-1 β -induced nf- κ b activation., *J Biol Chem* 276 (32) (2001) 30527–30536.
- [35] K. W. Underwood, C. Song, R. W. Kriz, X. J. Chang, J. L. Knopf, L. L. Lin, A novel calcium-independent phospholipase a₂, cpla2-gamma, that is prenylated and contains homology to cpla2., *J Biol Chem* 273 (34) (1998) 21926–21932.
- [36] M. L. J. Lindbom, A. G. Ljungmann, C. Tagesson, Increased gene expression of novel cytosolic and secretory phospholipase a2 types in human airway epithelial cells induced by tumor necrosis factor- α and ifn- γ , *Journal of Interferon and Cytokine Research* 22 (2002) 947 to 955.
- [37] H. Chiba, H. Michibata, K. Wakimoto, M. Seishima, S. Kawasaki, K. Okubo, H. Mitsui, H. Torii, Y. Imai, Cloning of a gene for a novel epithelium-specific cytosolic phospholipase a₂, cpla2delta, induced in psoriatic skin., *J Biol Chem* 279 (13) (2004) 12890–12897.

- [38] E. Toulza, N. R. Mattiuzzo, M.-F. Galliano, N. Jonca, C. Dossat, D. Jacob, A. de Daruvar, P. Wincker, G. Serre, M. Guerrin, Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function., *Genome Biol* 8 (6) (2007) R107.
- [39] J. Chen, S. J. Engle, J. J. Seilhamer, J. A. Tischfield, Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca^{2+} -dependent phospholipase a_2 ., *J Biol Chem* 269 (4) (1994) 2365–2368.
- [40] P. K. Larsson, H. E. Claesson, B. P. Kennedy, Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase a_2 and their effect on enzyme activity., *J Biol Chem* 273 (1) (1998) 207–214.
- [41] D. J. Mancuso, C. M. Jenkins, R. W. Gross, The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase a_2 ., *J Biol Chem* 275 (14) (2000) 9937–9945.
- [42] H. Tanaka, R. Takeya, H. Sumimoto, A novel intracellular membrane-bound calcium-independent phospholipase a_2 ., *Biochem Biophys Res Commun* 272 (2) (2000) 320–326.
- [43] M. L. Bleecker, M. Maroni, M. Sepanski, A biologic marker for organophosphate exposure: neurotoxic esterase activity in human lymphocytes and platelets., *Dev Toxicol Environ Sci* 11 (1983) 507–512.
- [44] D. Cruz, A. D. Watson, C. S. Miller, D. Montoya, M. Ochoa, P. A. Sieling, M. A. Gutierrez, M. Navab, S. T. Reddy, J. L. Witztum, A. M. Fogelman, T. H. Rea, D. Eisenberg, J. Berliner, R. L. Modlin, Host-derived oxidized phospholipids and hdl regulate innate immunity in human leprosy., *J Clin Invest* 118 (8) (2008) 2917–2928.
- [45] P. A. Wilson, S. D. Gardner, N. M. Lambie, S. A. Commans, D. J. Crowther, Characterization of the human patatin-like phospholipase family., *J Lipid Res* 47 (9) (2006) 1940–1949.
- [46] W. C. Lee, E. Salido, P. H. Yen, Isolation of a new gene *gs2* (*dxs1283e*) from a CpG island between *sts* and *kall1* on xp22.3., *Genomics* 22 (2) (1994) 372–376.
- [47] J. Gao, M. Simon, Identification of a novel keratinocyte retinyl ester hydrolase as a transacylase and lipase., *J Invest Dermatol* 124 (6) (2005) 1259–1266.
- [48] L. W. Tjoelker, C. Wilder, C. Eberhardt, D. M. Stafforini, G. Dietsch, B. Schimpf, S. Hooper, H. L. Trong, L. S. Cousens, G. A. Zimmerman, Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase., *Nature* 374 (6522) (1995) 549–553.

- [49] D. G. Tew, C. Southan, S. Q. Rice, M. P. Lawrence, H. Li, H. F. Boyd, K. Moores, I. S. Gloger, C. H. Macphee, Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (4) (1996) 591–599.
- [50] E. Ninio, Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis., *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8 (2) (2005) 123–131.
- [51] L. Cupillard, Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase2, *The Journal of Biological Chemistry* 272.
- [52] M. H. Gelb, E. Valentin, F. Ghomashchi, M. Lazdunski, G. Lambeau, Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase a2., *J Biol Chem* 275 (51) (2000) 39823–39826.
- [53] B. B. Boyanovsky, N. R. Webb, Biology of secretory phospholipase a2., *Cardiovasc Drugs Ther* 23 (1) (2009) 61–72.
- [54] S. Andersen, L. Bjermer, P. K. Selbo, M. Dalaker, B. Johansen, Extracellular phospholipase a2 expression in sarcoidosis., *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 13 (1) (1996) 70–76.
- [55] I. Lilja, C. Gustafson-Svard, L. Franzen, R. Sjudahl, S. Andersen, B. Johansen, Presence of group iia secretory phospholipase a2 in mast cells and macrophages in normal human ileal submucosa and in crohn’s disease., *Clin Chem Lab Med.* 38(12) (2000) 1231–6.
- [56] M. Menschikowski, A. Hagelgans, G. Siegert, Secretory phospholipase a2 of group iia: is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases?, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 79 (1-2) (2006) 1–33.
- [57] L. Leistad, A. J. Feuerherm, A. Faxvaag, B. Johansen, Multiple phospholipase a2 enzymes participate in the inflammatory process in osteoarthritic cartilage., *Scand J Rheumatol* 1 (2011) 1–9.
- [58] E. A. Dennis, Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase a2., *J Biol Chem* 269 (18) (1994) 13057–13060.
- [59] M. Murakami, K. Yoshihara, S. Shimbara, M. Sawada, N. Inagaki, H. Nagai, M. Naito, T. Tsuruo, T. C. Moon, H. W. Chang, I. Kudo, Group iid heparin-binding secretory phospholipase a2 is expressed in human colon carcinoma cells and human mast cells and up-regulated in mouse inflammatory tissues, *European Journal of Biochemistry* 269(11) (2002) 2698–2707.

- [60] J. Oestvang, M. W. Anthonsen, B. Johansen, Role of secretory and cytosolic phospholipase a(2) enzymes in lysophosphatidylcholine-stimulated monocyte arachidonic acid release., *FEBS Lett* 555 (2) (2003) 257–262.
- [61] M. Murakami, K. Yoshihara, S. Shimbara, G. Lambeau, A. Singer, M. H. Gelb, M. Sawada, N. Inagaki, H. Nagai, I. Kudo, Arachidonate release and eicosanoid generation by group iie phospholipase a(2)., *Biochem Biophys Res Commun* 292 (3) (2002) 689–696.
- [62] H. Sato, R. Kato, Y. Isogai, G. Saka, M. Ohtsuki, Y. Taketomi, K. Yamamoto, K. Tsutsumi, J. Yamada, S. Masuda, Y. Ishikawa, T. Ishii, T. Kobayashi, K. Ikeda, R. Taguchi, S. Hatakeyama, S. Hara, I. Kudo, H. Itabe, M. Murakami, Analyses of group iii secreted phospholipase a2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis., *J Biol Chem* 283 (48) (2008) 33483–33497.
- [63] S. Masuda, K. Yamamoto, T. Hirabayashi, Y. Ishikawa, T. Ishii, I. Kudo, M. Murakami, Human group iii secreted phospholipase a2 promotes neuronal outgrowth and survival., *Biochem J* 409 (2) (2008) 429–438.
- [64] H. Sato, Y. Taketomi, Y. Isogai, S. Masuda, T. Kobayashi, K. Yamamoto, M. Murakami, Group iii secreted phospholipase a2 transgenic mice spontaneously develop inflammation., *Biochem J* 421 (1) (2009) 17–27.
- [65] B. Balestrieri, J. Arm, Group v spla2: classical and novel functions., *Biochim Biophys Acta* 1761 (11) (2006) 1280–1288.
- [66] L. Leistad, A. J. Feuerherm, M. Ostensen, A. Faxvaag, B. Johansen, Presence of secretory group iia and v phospholipase a2 and cytosolic group ivalpha phospholipase a2 in chondrocytes from patients with rheumatoid arthritis., *Clin Chem Lab Med* 42 (6) (2004) 602–610.
- [67] E. Boilard, Y. L., K. Larabee, B. Balestrieri, F. Ghomashchi, D. Fujioka, R. Gobezie, J. S. Coblyn, M. E. Weinblatt, E. M. Massarotti, T. S. Thornhill, M. Divangahi, H. Remold, G. Lambeau, M. H. Gelb, J. P. Arm, D. M. Lee, A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase a2 in immune complex-mediated arthritis., *EMBO Mol Med* 2 (5) (2010) 172–187.
- [68] J.-O. Kim, B. K. Chakrabarti, A. Guha-Niyogi, M. K. Louder, J. R. Mascola, L. Ganesh, G. J. Nabel, Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase a2., *J Virol* 81 (3) (2007) 1444–1450.
- [69] T. S. Hallstrand, E. Y. Chi, A. G. Singer, M. H. Gelb, W. R. Henderson, Secreted phospholipase a2 group x overexpression in asthma and bronchial hyperresponsiveness., *Am J Respir Crit Care Med* 176 (11) (2007) 1072–1078.

- [70] K. Hanasaki, T. Ono, A. Saiga, Y. Morioka, M. Ikeda, K. Kawamoto, K. Higashino, K. Nakano, K. Yamada, J. Ishizaki, H. Arita, Purified group x secretory phospholipase a(2) induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells., *J Biol Chem* 274 (48) (1999) 34203–34211.
- [71] S. Landreville, S. Coulombe, P. Carrier, M. H. Gelb, S. L. Guerin, C. Salesse, Expression of phospholipases a2 and c in human corneal epithelial cells., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (11) (2004) 3997–4003.
- [72] M. Murakami, I. Kudo, Phospholipase a2., *J Biochem* 131 (3) (2002) 285–292.
- [73] D. H. Adler, J. D. Cogan, J. A. Phillips, N. Schnetz-Boutaud, G. Milne, T. Iverson, J. Stein, D. Brenner, J. Morrow, O. B. O, J. Oates, Inherited human cpla(2alpha) deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction., *J Clin Invest* 118 (6) (2008) 2121–2131.
- [74] D. A. Six, E. A. Dennis, The expanding superfamily of phospholipase a2 enzymes: classification and characterization., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488, 1-2 (2000) 1–19.
- [75] J. E. Burke, E. A. Dennis, Phospholipase a2 structure/function, mechanism, and signaling., *J Lipid Res* 50 Suppl (2009) S237–S242.
- [76] J. K. Brown, P. A. Knighta, E. M. Thorntona, J. A. Patea, S. Coonrodb, H. R. P. Millera, A. D. Pemberton, *Trichinella spiralis* induces de novo expression of group ivc phospholipase a2 in the intestinal epithelium, *International Journal for Parasitology* 38(2) (2008) 143–147.
- [77] J. Plunkett, S. Doniger, T. Morgan, R. Haataja, M. Hallman, H. Puttonen, R. Menon, E. Kuczynski, E. Norwitz, V. Snegovskikh, A. Palotie, L. Peltonen, V. Fellman, E. A. DeFranco, B. P. Chaudhari, J. Oates, O. Boutaud, T. L. McGregor, J. J. McElroy, K. Teramo, I. Borecki, J. C. Fay, L. J. Muglia, Primate-specific evolution of noncoding element insertion into pla2g4c and human preterm birth., *BMC Med Genomics* 3 (2010) 62.
- [78] J. A. Onyimba, The innate immune response to coxsackievirus b3 predicts progression to cardiovascular disease and heart failure in male mice., *Biol Sex Differ.* 2 (2011) 2.
- [79] C. Lunardi, Endothelial cells' activation and apoptosis induced by a subset of antibodies against human cytomegalovirus: Relevance to the pathogenesis of atherosclerosis, *PLoS ONE.* 2(5) (2007) e473.
- [80] T. Ohto, N. Uozumi, T. Hirabayashi, T. Shimizu, Identification of novel cytosolic phospholipase a2s, murine cpla2delta, epsilon, and zeta, which form a gene cluster with cpla2beta, *Journal of Biological Chemistry* 280(26) (2005) 24576–24583.

- [81] P. Rastogi, J. McHowat, Inhibition of calcium-independent phospholipase a2 prevents inflammatory mediator production in pulmonary microvascular endothelium., *Respir Physiol Neurobiol* 165 (2-3) (2009) 167–174.
- [82] A. Kalyvas, C. Baskakis, V. Magrioti, V. Constantinou-Kokotou, D. Stephens, R. Lopez-Vales, J. Q. Lu, V. W. Yong, E. A. Dennis, G. Kokotos, S. David, Differing roles for members of the phospholipase a2 superfamily in experimental autoimmune encephalomyelitis., *Brain* 132 (Pt 5) (2009) 1221–1235.
- [83] G. R. Kinsey, J. McHowat, C. S. Beckett, R. G. Schnellmann, Identification of calcium-independent phospholipase a2gamma in mitochondria and its role in mitochondrial oxidative stress., *Am J Physiol Renal Physiol* 292 (2) (2007) F853–F860.
- [84] M. Murakami, S. Masuda, K. Ueda-Semmyo, E. Yoda, H. Kuwata, Y. Takanezawa, J. Aoki, H. Arai, H. Sumimoto, Y. Ishikawa, T. Ishii, Y. Nakatani, I. Kudo, Group vii ca²⁺-independent phospholipase a2gamma promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases a2., *J Biol Chem* 280 (14) (2005) 14028–14041.
- [85] A. Cedars, C. M. Jenkins, D. J. Mancuso, R. W. Gross, Calcium-independent phospholipases in the heart: mediators of cellular signaling, bioenergetics, and ischemia-induced electrophysiologic dysfunction., *J Cardiovasc Pharmacol* 53 (4) (2009) 277–289.
- [86] D. J. Mancuso, H. F. Sims, K. Yang, M. A. Kiebish, X. Su, C. M. Jenkins, S. Guan, S. H. Moon, T. Pietka, F. Nassir, T. Schappe, K. Moore, X. Han, N. A. Abumrad, R. W. Gross, Genetic ablation of calcium-independent phospholipase a2gamma prevents obesity and insulin resistance during high fat feeding by mitochondrial uncoupling and increased adipocyte fatty acid oxidation., *J Biol Chem* 285 (47) (2010) 36495–36510.
- [87] P. Kienesberger, M. Oberer, A. Lass, R. Zechner, Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions., *J Lipid Res* 50 Suppl (2009) S63–S68.
- [88] D. Pamies, J. A. Reig, E. Vilanova, M. A. Sogorb, Expression of neuropathy target esterase in mouse embryonic stem cells during differentiation., *Arch Toxicol* 84 (6) (2010) 481–491.
- [89] C. M. Jenkins, D. J. Mancuso, W. Yan, H. F. Sims, B. Gibson, R. W. Gross, Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase a2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities., *J Biol Chem* 279 (47) (2004) 48968–48975.

- [90] S. Romeo, J. Kozlitina, C. Xing, A. Pertsemlidis, D. Cox, L. A. Pennacchio, E. Boerwinkle, J. C. Cohen, H. H. Hobbs, Genetic variation in *pnpla3* confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease., *Nat Genet* 40 (12) (2008) 1461–1465.
- [91] J. T. Zhao, M. J. Cowley, P. Lee, V. Birzniece, W. Kaplan, K. K. Y. Ho, Identification of novel gh-regulated pathway of lipid metabolism in adipose tissue: A gene expression study in hypopituitary men., *J Clin Endocrinol Metab.*
- [92] K. Karasawa, A. Harada, N. Satoh, K. Inoue, M. Setaka, Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (*paf-ah*)., *Prog Lipid Res* 42 (2) (2003) 93–114.
- [93] M. J. Caslake, C. J. Packard, Lipoprotein-associated phospholipase a2 (platelet-activating factor acetylhydrolase) and cardiovascular disease., *Curr Opin Lipidol* 14 (4) (2003) 347–352.
- [94] G. Y. Zhang, Y. C. Zhang, Q. L. Zhang, Pla2 activity in serum and cutaneous tissues in patients with psoriasis vulgaris, *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 26 (5) (2001) 455–456.
- [95] S. Hammarstrom, M. Hamberg, B. Samuelsson, E. A. Duell, M. Stawiski, J. J. Vorhees, Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin e2, and prostaglandin f2a in epidermis of psoriasis*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72;12 (1975) 5130–5134.
- [96] S. Izaki, T. Yamamoto, Y. Goto, S. Ishimaru, F. Yodate, K. Kitamura, M. Matsuzaki, Platelet-activating factor and arachidonic acid metabolites in psoriatic inflammation., *Br J Dermatol* 134 (6) (1996) 1060–1064.
- [97] P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, N. E. Fusenig, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line., *J Cell Biol* 106 (3) (1988) 761–771.
- [98] M. W. Anthonsen, D. Stengel, D. Hourton, E. Ninio, B. Johansen, Mildly oxidized ldl induces expression of group iia secretory phospholipase a2 in human monocyte-derived macrophages, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 20 (2000) 1276.
- [99] E. v Pelt-Verkuil, A. v Belkum, J. P. Hays, Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, Springer, 2008.
- [100] K. M. Joergensen, H. S. Felberg, R. K. Berge, A. Laegreid, B. Johansen, Platelet activating factor stimulates arachidonic acid release in differentiated keratinocytes via arachidonyl non-selective phospholipase a2., *Arch Dermatol Res* 302 (3) (2010) 221–227.

-
- [101] G. Lemaitre, J. Lamartine, A. Pitaval, P. Vaigot, J. Garin, S. Bouet, C. Petat, P. Soularue, X. Gidrol, M. T. Martin, G. Waksman, Expression profiling of genes and proteins in hacat keratinocytes: proliferating versus differentiated state., *J Cell Biochem* 93 (5) (2004) 1048–1062.
- [102] M. Lappas, G. E. Rice, Phospholipase a2 isozymes in pregnancy and parturition., *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70 (2) (2004) 87–100.
- [103] B. Johansen, K. Rakkestad, M. A. Balboa, E. A. Dennis, Expression of cytosolic and secreted forms of phospholipase a2 and cyclooxygenases in human placenta, fetal membranes, and chorionic cell lines, *Prostaglandins and other Lipid Mediators* 60 (2000) 119–125.
- [104] K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ method., *Methods* 25 (4) (2001) 402–408.
- [105] A. G. Buckland, D. C. Wilton, The antibacterial properties of secreted phospholipases a2, *Biochimica et Biophysica Acta* 1488 (2000) 71–82.
- [106] E. A. Dennis, Phospholipase a2 in eicosanoid generation., *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2 Pt 2) (2000) S32–S35.
- [107] M. A. Lampe, M. L. Williams, P. M. Elias, Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation., *J Lipid Res* 24 (2) (1983) 131–140.