

TESIS DOCTORAL

Regulación de la fosfolipasa A2 citosólica de grupo IVA: papel en muerte celular y fagocitosis*

Javier Casas Requena

*Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),
Universidad de Valladolid, 47003 Valladolid, España*

Fecha de defensa: 23 junio 2008

**Esta es una versión condensada y sin gráficos de la tesis doctoral presentada por Javier Casas Requena para la obtención del título de doctor por la Universidad de Valladolid.*

1. INTRODUCCION

Los seres humanos y los animales deben defenderse de una gran variedad de agentes patógenos entre los que se incluyen virus, bacterias, hongos y parásitos, de tumores y de un gran número de agentes dañinos. A lo largo de la evolución se han desarrollado complejos mecanismos de respuesta al daño que todos estos agentes producen, que pueden estar mediados tanto por células, como por moléculas solubles. En conjunto, estas reacciones se conocen como inflamación y sus signos se describieron ya en la época de los romanos. Los cinco signos básicos de la inflamación son rubor, tumor, calor, dolor y pérdida de función y se deben a la extravasación de plasma y la infiltración de leucocitos a los sitios de inflamación. En los comienzos de su estudio, la inflamación fue considerada como una primera barrera de defensa, es decir, era la reacción clave de la respuesta inmune innata. Hoy se sabe que realmente es mucho más que eso, ya que un mal control de la reacción inflamatoria puede producir la muerte, como sucede en el choque anafiláctico, o culminar en enfermedades crónicas como la artritis y la gota.

1.1 Respuesta al daño y a la infección

Dependiendo de la gravedad del daño tisular producido

por una herida, la integridad de la piel y de las capas subyacentes pueden verse alteradas, es en estas situaciones cuando las infecciones pueden desarrollarse, ya que la barrera natural que impide la entrada de organismos dañinos se ha abierto. Las células del sistema inmune se encuentran ampliamente distribuidas por todo el organismo, pero cuando se produce una

infección o un daño tisular es necesario que se concentren en el sitio de infección. Durante este proceso tienen lugar tres sucesos: un incremento en el aporte de sangre del tejido en peligro debido a la vasodilatación, un aumento en la permeabilidad vascular y extravasación leucocitaria; los leucocitos salen de los vasos sanguíneos a los tejidos dañados. En estadios tempranos se acumulan preferentemente neutrófilos y en estadios más avanzados también aparecen monocitos y linfocitos. El desarrollo de la reacción inflamatoria está controlado por citoquinas, proteínas plasmáticas (sistema del complemento, sistema de coagulación) y mediadores lipídicos (prostaglandinas y leucotrienos).

1.2 Fases de la inflamación

La respuesta inflamatoria se puede dividir en varias fases. En la más temprana, el principal evento que tiene lugar es una vasoconstricción temporal seguida de varias

fases que tienen lugar durante los minutos, horas y días posteriores, y que se resumen a continuación. La respuesta vascular aguda tiene lugar a los pocos segundos de producirse el daño tisular y se prolonga durante algunos minutos. Se produce como consecuencia de la vasodilatación y el aumento de la

permeabilidad vascular debido a cambios en el endotelio y todo esto conduce al aumento del flujo sanguíneo que causa el rubor (eritema) y la entrada de fluido en los tejidos (edema). La respuesta celular aguda tiene lugar durante las siguientes horas si se ha producido un daño suficientemente importante o si hay infección. Lo más destacado en esta fase es la aparición de granulocitos, principalmente neutrófilos en los tejidos, que primero se anclan en las paredes de los vasos sanguíneos y a continuación los atraviesan para llegar a los tejidos (diapédesis). Durante esta fase también pueden aparecer eritrocitos fuera de los vasos sanguíneos produciéndose entonces hemorragias. Si los vasos están dañados, también se depositan fibrinógeno y fibronectina y se produce la agregación de las plaquetas para parar la hemorragia. Las células muertas y en proceso de muerte contribuyen a la formación de pus. Si el daño es suficientemente grave aparece la respuesta crónica celular durante los siguientes días. La principal característica de esta fase es la aparición de un infiltrado de células mononucleares formado por macrófagos y linfocitos. Los macrófagos están directamente implicados en la eliminación de los microbios y de los restos celulares.

Durante las semanas siguientes tiene lugar la resolución donde se restaura la estructura normal del tejido. Se retiran los coágulos por fibrinólisis y cuando no es posible restaurar la estructura normal del tejido se rellena con células endoteliales. Generalmente a estas alturas la infección ya ha sido superada, aunque si no se ha eliminado todo el material infeccioso, pueden acumularse macrófagos y linfocitos que acaban por formar un granuloma.

1.2.1. Mastocitos y basófilos

Los mastocitos se depositan en el tejido conectivo y no circulan en el torrente sanguíneo, mientras que los

basófilos son los granulocitos circulantes más pequeños del torrente. Ambos son capaces de liberar potentes mediadores inflamatorios como la histamina, factores quimioatrayentes, citoquinas y metabolitos del ácido araquidónico (AA). Contienen gránulos citoplasmáticos en los que almacenan los mediadores inflamatorios. La liberación de estos gránulos se conoce con el nombre de desgranulación y puede ser inducida por varios factores como la destrucción

física de la célula, agentes químicos, mediadores endógenos o mecanismos inmunes. Existen dos clases de mediadores inflamatorios en estas células: mediadores preformados, almacenados en los gránulos de secreción y secretados tras la activación celular entre los que se incluyen la histamina, proteoglicanos, heparina y condroitín sulfato; mediadores de nueva síntesis, producidos durante la activación mediada por IgE, son principalmente metabolitos del AA, principalmente leucotrieno C4 (LTC4) y prostaglandina D2 (PGD2) y citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- \pm) y las interleuquinas 4, 5 y 6 (IL-4, IL-5 y IL-6).

1.2.3. Eosinófilos

Los eosinófilos son leucocitos granulocitos pequeños derivados de la médula ósea, tienen una vida media en la circulación de 3 a 4 días antes de migrar a los tejidos en donde permanecen varios días. Son polimorfonucleares (PMN) y en su citoplasma contienen dos tipos de gránulos, cuyo contenido se libera de manera similar a los gránulos de los neutrófilos, sin embargo, mientras las enzimas lisosomales de los neutrófilos actúan en partículas que han sido internalizadas, el contenido de los gránulos de los eosinófilos actúa en estructuras extracelulares tales como parásitos o mediadores inflamatorios.

1.2.4. Neutrófilos

Los neutrófilos representan el 50-60% del total de los leucocitos circulantes y constituyen la primera línea de defensa contra agentes infecciosos. Como ya se ha mencionado anteriormente, los neutrófilos son las primeras células en acudir a los sitios de infección o

daño durante el proceso inflamatorio. Su principal función es la fagocitosis y la destrucción

de los microorganismos, que realizan mediante la generación de intermediarios reactivos del oxígeno y con las enzimas de sus gránulos lisosomales. Además, los PMN son capaces de liberar enzimas proteolíticas y mediadores lipídicos, así como citoquinas y quimioquinas que promueven la activación y el reclutamiento de otros PMN, de células mononucleares y de linfocitos. Todo ello resulta en la eliminación del patógeno y en último término en el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, la capacidad de los PMN para liberar sustancias tóxicas en respuesta a los microorganismos puede generar daño tisular, incluso en zonas alejadas del foco infeccioso.

Tras su salida de la médula ósea, los PMN permanecen en la circulación, donde poseen una vida media corta (6-9 h) si no migran a los tejidos, en los que la prolongación de su vida es fundamental para hacer frente a las infecciones. La activación y la supervivencia de los PMN se regula por mecanismos que han sido objeto de numerosos estudios, pero que todavía no se han aclarado plenamente.

1.2.5. Monocitos y macrófagos

Los monocitos circulantes y los macrófagos tisulares constituyen, junto con sus precursores medulares (monoblastos y promonocitos), el sistema fagocítico mononuclear. La generación de monocitos en la médula ósea es un proceso regulado por los factores de crecimiento (M-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-3, IL-6), producidos por las propias células durante su diferenciación y por las células del estroma medular; así como por agentes inhibidores como la prostaglandina E₂, IFN γ/β , y la lactoferrina. Los monocitos abandonan la médula ósea, pasan al torrente circulatorio y desde allí a los tejidos, gracias a la interacción entre las moléculas de adhesión existentes en su superficie con los receptores que se expresan en las células del endotelio vascular. Una vez en los tejidos, los monocitos culminan su maduración y se convierten en macrófagos tisulares residentes. Este proceso conlleva un aumento del tamaño celular, un mayor desarrollo del sistema

lisosomal, un incremento del número y tamaño de las mitocondrias y una mayor acumulación de enzimas hidrolíticas. La morfología final y la función de los macrófagos tisulares depende del tejido en el que residan, pudiendo presentar una gran heterogeneidad.

A diferencia de los linfocitos B y T, que pueden permanecer largos periodos de tiempo en estado quiescente, los macrófagos sólo pueden permanecer en estado de reposo durante un corto periodo de tiempo y posteriormente mueren por procesos de apoptosis. Los macrófagos juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunológica. En el contexto de la inmunidad innata, los macrófagos reconocen, fagocitan y eliminan elementos como bacterias, virus, hongos, parásitos, macromoléculas y células propias dañadas o muertas, como es el caso de las células apoptóticas y las tumorales. Los macrófagos también pueden provocar la muerte extracelular de microorganismos y controlar la dispersión de una infección mediante la secreción de enzimas, metabolitos del nitrógeno y metabolitos lipídicos. Algunas de las sustancias secretadas por los macrófagos, en especial las citoquinas como el TNF α , la IL-1 β y la IL-6, promueven el reclutamiento de otras células, principalmente PMN, en los puntos de inflamación y son responsables de la mayor parte de los efectos sistémicos de la inflamación.

Durante la respuesta inmunológica adquirida los macrófagos funcionan como células presentadoras de antígeno (del inglés APC, Antigen Presenting Cell), es decir, son capaces de degradar las proteínas fagocitadas y procesar los antígenos para su presentación por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a los linfocitos T. Los macrófagos producen una serie de proteínas que promueven la activación de los linfocitos T. A su vez, ciertas citoquinas secretadas por los linfocitos T activados, como el IFN- γ , activan a los macrófagos, aumentando la eficiencia de las funciones de presentación antigénica, fagocitosis y lisis celular. Los macrófagos también participan en la eliminación de antígenos extraños durante la respuesta inmunológica adquirida humoral. Por un lado, estas células liberan proteínas del sistema del complemento que, junto con los anticuerpos, recubren la superficie de un gran

número de antígenos en el proceso conocido como opsonización. Dado que los macrófagos expresan en su superficie receptores específicos tanto para la porción Fc de las inmunoglobulinas de la clase IgG, como para las proteínas del sistema del complemento, el proceso de reconocimiento y fagocitosis de antígenos extraños opsonizados por parte de estas células es extraordinariamente eficiente [1]. Los macrófagos expresan receptores implicados en el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos PAMP (acrónimo del inglés Pathogen Associated Molecular Patterns), entre los que destacan, los receptores de tipo Toll (TLR), las proteínas tipo NOD (acrónimo de Nucleotide-binding Oligomerization Domain), el receptor de manosa (RM), los receptores scavenger, dectin-1 y Endo-180. El conjunto de receptores que expresan los macrófagos varía durante su diferenciación, así como en función de la localización y del estado de activación [2].

1.2. Fagocitosis

La fagocitosis desempeña un papel fundamental tanto en la eliminación de microorganismos como en la presentación de antígenos, permitiendo el desarrollo de la respuesta inmune adquirida. Se pueden distinguir dos fases: la formación del fagosoma y su maduración.

Formación del fagosoma: proceso por el cual las partículas extrañas son inicialmente reconocidas e internalizadas por las células fagocíticas quedando encerradas en una vesícula rodeada de membrana llamada fagosoma. La eficiencia del proceso de fagocitosis aumenta de forma considerable si el microorganismo está recubierto por unas macromoléculas llamadas opsoninas, que son reconocidas por los receptores de superficie de los fagocitos. Uno de los sistemas más eficientes para la opsonización de partículas es el revestimiento con anticuerpos de la clase IgG, que reciben el nombre de opsoninas específicas. Algunos componentes del sistema del complemento como los fragmentos de C3 (C3b y iC3b) también son potentes opsoninas. Diversas proteínas plasmáticas, como la fibronectina, el fibrinógeno, la lectina de unión a manosa y la proteína C

reactiva, tienen la capacidad de revestir microorganismos de manera inespecífica. La opsonización inespecífica es menos eficiente que el revestimiento por anticuerpos, pero potencia la fagocitosis en las fases iniciales de la infección. [3-5]

En los mamíferos, algunas regiones de la membrana plasmática de los fagocitos conocidas como balsas lipídicas (del inglés "lipid rafts") se encuentran enriquecidas en colesterol y esfingolípidos. Estos compuestos juegan un papel fundamental en el agrupamiento de los receptores Fc γ necesarios para la ingestión de partículas recubiertas de IgG [6, 7]. Los receptores Fc³ (Fc³R) son un grupo de proteínas integrales de membrana que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Como ya se ha mencionado, el reconocimiento de las inmunoglobulinas tiene como resultado el agrupamiento de estos receptores y el desencadenamiento de una gran variedad de respuestas biológicas como las que regulan la internalización de partículas revestidas de IgG dentro de vacuolas rodeadas de membrana plasmática. Estos receptores contienen entre sus colas citoplasmáticas o en subunidades asociadas motivos de activación basados en los inmunoreceptores de tirosina (ITAM, acrónimo del inglés Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif). El agrupamiento de los receptores Fc induce la fosforilación de tirosinas entre los motivos e inicia la formación de un complejo de proteínas en la cara interna de la membrana plasmática [8]. Lyn y Hck, dos miembros de la familia de quinasas Src fosforilan los motivos ITAM después del agrupamiento [9]. Los motivos ITAM fosforilados reclutan a la quinasa Syk, cuya señalización se requiere para la fosforilación eficiente de p85, la subunidad reguladora de la fosfatidilinositol-quinasa (PI3K) que activa la subunidad catalítica p110 [10, 11], generando fosfatidilinositol-3,4,5 trisfosfato (PtdIns(3,4,5)P3) a partir del fosfatidilinositol-4,5 bisfosfato (PtdIns(4,5)P2) de la membrana cerca del complejo de receptores.

Los receptores Fc se ubiquitan en respuesta al agrupamiento y esta modificación es necesaria para la endocitosis mediada por receptores de complejos inmunes solubles pero no para la fagocitosis de

partículas [12]. La mayoría de las proteínas asociadas con la fagocitosis mediada por receptores Fc no se encuentran directamente unidas a ellos pero su acción se ejerce cerca. Entre ellas se encuentran proteínas implicadas en la regulación de la polimerización de la actina como Cdc42, Rac y Arp2/3, proteínas contráctiles como las miosinas, proteínas implicadas en la creación o destrucción de membrana como las fosfolipasas A2, y proteínas que afectan a la formación y activación de la NADPH oxidasa como la PKC y Akt.

Maduración: hace referencia a la conversión gradual que sufren los fagosomas, en principio vacuolas inertes, para acabar convirtiéndose en compartimentos con una alta actividad microbicida y con capacidad para presentar antígenos. Estas capacidades son adquiridas gradualmente mediante un proceso que recuerda la progresión que se produce desde las vesículas endocíticas a los lisosomas. Los fagosomas tempranos adquieren Rab5 y EEA1, marcadores típicos de endosomas tempranos. A continuación adoptan marcadores de endosomas tardíos como Rab7 y el receptor de manosa-6 fosfato a la vez que se desprenden de Rab5 [13]. Al final los fagosomas se fusionan con los lisosomas, adquiriendo entonces LAMP-1, catepsinas y otras hidrolasas.

1.2.1 Papel de los fosfoinosítidos durante la fagocitosis

El papel de los fosfoinosítidos durante la fagocitosis se ha estudiado con gran profundidad por métodos bioquímicos y por técnicas de imagen de fluorescencia en los últimos años. El PtdIns(4,5)P2 se encuentra ampliamente distribuido en la cara interna de la membrana plasmática, aportando un 1-2% del contenido lipídico de esa cara de la membrana [14, 15], y se acumula de manera transitoria en los pseudópodos de los fagosomas en formación, desapareciendo rápidamente tras el cierre de los fagosomas. La enzima responsable de ésta rápida acumulación parece ser la PIP5K-I, presente en las copas fagocíticas [16, 17] donde puede ser activada por Arf-6, GTPasas de la familia Rho, o por mediadores lipídicos como el ácido fosfatídico, generado durante la ingestión de las partículas [18, 19]. La causa de la disminución es más compleja. Una

pequeña parte del PtdIns(4,5)P2 puede ser hidrolizada por la PLC' [16], ya que su desaparición coincide con el aumento de Ca²⁺ producido por el InsP3 y con el aumento de DAG en la copa fagocítica. Otra parte es convertida a PtdIns(3,4,5)P3 por la PI3K-I que es reclutada y activada por Syk o por proteínas adaptadoras como Gab-2 [20-23]. Mediante técnicas de imagen se ha visto que el PtdIns(3,4,5)P3 está presente durante la formación del fagosoma y permanece asociado incluso después del cierre [23, 24].

1.3. Los eicosnoides

El AA es un ácido graso poliinsaturado de veinte átomos de carbono (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico). En humanos, el AA es un ácido graso esencial que se ingiere en la dieta o se deriva del metabolismo del ácido graso esencial de 18 átomos de carbono, el ácido linoleico. El AA se encuentra esterificado en los fosfolípidos de las membranas celulares, mayoritariamente en la posición sn-2 de la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y del fosfatidilinositol (PtdIns). La liberación del AA a partir de los fosfolípidos es uno de los pasos limitantes en la síntesis de los eicosanoides [25]. El AA desempeña un papel fundamental en los procesos de señalización intra y extracelulares, así como de regulación de numerosas funciones celulares. La mayoría de estas funciones se ejercen de forma indirecta a través de los sus derivados oxigenados, a los que se denomina colectivamente con el nombre de eicosanoides. Los eicosanoides son ácidos carboxílicos de veinte átomos de carbono que se clasifican en tres grupos en función de la vía oxidativa a partir de la cual se sintetizan [26, 27]: derivados de COX: son productos cíclicos generados por la acción de las ciclooxigenasas, que incluyen las prostaglandinas y los tromboxanos; derivados de LOX: son productos lineales generados por la acción de las lipoxigenasas, como los leucotrienos y sus derivados hidroxilados entre los que se encuentran las lipoxinas; derivados del sistema citocromo P450: son los epóxidos.

Los eicosanoides pueden actuar como segundos mensajeros en el interior de las células donde se sintetizan, o transportarse a través de la membrana

celular y actuar sobre receptores específicos en la propia célula o en células adyacentes. Se conoce la existencia de receptores específicos para la mayoría de los eicosanoides [28]. Todos comparten características propias de los llamados receptores de siete dominios transmembrana asociados a proteínas G (acrónimo del inglés G protein Coupled Receptors, GPCR), pero difieren en su estructura, distribución y mecanismos de señalización.

1.4. Las fosfolipasas A2

Los mediadores lipídicos de la inflamación son producidos por la hidrólisis de los glicerofosfolípidos de las membranas celulares generándose lisofosfolípidos y un ácido graso libre, que, en muchos casos, es insaturado como por ejemplo el AA. Los lisofosfolípidos pueden servir de precursores de otros mediadores lipídicos que tienen importantes efectos fisiopatológicos [29], como el ácido lisofosfatídico o el factor activador de plaquetas. Esta reacción enzimática es catalizada por las PLA2 siendo uno de los pasos limitantes en la generación de lípidos inflamatorios (Fig. 2 y 3).

La superfamilia de las PLA2 está formada por un gran número de proteínas muy diferentes que se pueden dividir en cinco grandes grupos atendiendo tanto a su estructura como a su mecanismo catalítico: las PLA2 secretadas (sPLA2), las PLA2 citosólicas (cPLA2), las PLA2 independientes de Ca^{2+} (iPLA2), las acetilhidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH) y las PLA2 lisosomales (LPLA2) [30].

1.4.1 Fosfolipasas A2 secretadas

Las sPLA2 son pequeñas proteínas secretadas (14-18 kDa) con una estructura terciaria muy rígida, consecuencia de los puentes disulfuro que contienen (entre 5 y 8). Esta característica les confiere resistencia frente a la proteólisis y la desnaturalización manteniendo así su actividad en los fluidos extracelulares. El centro activo está formado por una díada His/Asp, que no muestra una selectividad significativa por ácidos grasos pero sí por la cabeza polar de los sustratos. Estas enzimas necesitan niveles

milimolares de Ca^{2+} para la catálisis. En células de mamífero se han descrito hasta la fecha 10 isoenzimas de sPLA2.

Tras la secreción, las sPLA2 pueden actuar tanto de manera paracrina, como autocrina para liberar AA [31, 32]. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que algunas sPLA2 liberarían AA durante la secreción dentro de la célula [33]. Se ha propuesto que las sPLA2 están implicadas en varias enfermedades inflamatorias. La sPLA2 del grupo IIA se encuentra presente en elevados niveles en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide [34], y se utiliza como marcador de proteínas de fase aguda presentes durante una infección. En general, las sPLA2 participarían también en enfermedades como el síndrome de estrés respiratorio en adultos, la inflamación del intestino, la pancreatitis y la sepsis [35]. También se ha sugerido un papel importante en la hidrólisis de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y por lo tanto, en el desarrollo de la aterosclerosis [36-38].

Algunos miembros de la familia están implicados en procesos de exocitosis, como la sPLA2 del grupo IIA que es capaz de inducir la liberación de catecolaminas en células de feocromocitoma [39], y junto con la del grupo V y la del grupo IID promueven la desgranulación de los mastocitos [40]. Recientemente se ha observado que varias sPLA2 están implicadas en la eliminación de las bacterias Gram positivas [41], por lo que tendrían una función bactericida. Se han observado actividades bactericidas en las enzimas humanas de los grupos IIA, V, X y XII, aunque sólo la actividad de la del grupo IIA parece ser fisiológicamente relevante [42]. Experimentos con ratones genéticamente modificados en los que se ha eliminado el gen de la sPLA2 del grupo V (en inglés knockout) sugieren la participación de esta enzima en las infecciones por levaduras, ya que los macrófagos de estos ratones tienen reducida la producción de LTC₄ tras la estimulación de las células con zimosán [43]. Además, la producción de leucotrienos en estos ratones también se encuentra reducida en comparación con los animales de fenotipo silvestre. Estos resultados, junto con otros que demostraron que la producción general de eicosanoides

en respuesta a zimosán se veía completamente inhibida en ratones modificados genéticamente en los que se eliminó el gen de la cPLA2 del grupo IVA (cPLA2a) [44], sugerirían la idea de que la sPLA2 del grupo V tendría un papel de apoyo a la cPLA2a.

1.4.2. Fosfolipasas A2 independientes de calcio

Las iPLA2 son proteínas independientes de Ca^{2+} que utilizan una Ser para la catálisis. El miembro más estudiado del grupo es la PLA2 del grupo VIA cuya característica principal es la presencia de varias repeticiones de anquirina que podrían ser los responsables de las interacciones entre monómeros (Fig. 5).

La iPLA2 del grupo VIA está implicada en el remodelación de los fosfolípidos [45], la liberación de AA para producir eicosanoides [46-50], la expresión de proteínas [51], la relajación vascular del endotelio mediada por acetilcolina [52], la secreción [53, 54] y la apoptosis [46, 55, 56].

1.4.3. Otras fosfolipasas A2

Las PAF-AH reciben el nombre de la capacidad de hidrolizar el grupo acetilo de la posición sn-2 del PAF. El centro activo está formado por la tríada catalítica Ser/His/Asp y muestra una amplia especificidad de sustrato, aunque la actividad disminuye cuanto mas largo es el ácido graso oxidado de la posición sn-2 [30]. Recientemente se ha purificado una enzima a partir de cerebro de vaca, también presente en humanos y en ratones, cuyo análisis de secuencia mostraba un motivo lipasa altamente conservado compuesto por una tríada Ser/His/Asp. La actividad óptima de esta enzima tiene lugar a pH 4,5 y además colocaliza con una proteína lisosomal como la b-hexosaminidasa [57, 58]. A esta enzima se le conoce como PLA2 lisosomal (LPLA2) o PLA2 del grupo XV.

1.4.4. Fosfolipasas A2 citosólicas dependientes de calcio

Las cPLA2 son proteínas citosólicas de alto peso molecular (61-114 kDa). La primera que se descubrió fue la cPLA2a, cuya translocación a membranas está regulada por niveles micromolares de Ca^{2+} [59-64],

aunque no requiere este catión para la catálisis enzimática “per se”, en la que esta implicada una díada Ser/Asp. En el siguiente apartado de esta introducción se tratará con más detalle a este grupo, ya que la enzima objeto de este estudio pertenece al mismo.

1.5. Las fosfolipasas A2 citosólicas dependientes de calcio (cPLA2)

La familia de las fosfolipasas A2 del grupo IV o citosólicas está formada actualmente por seis miembros, IVA, IVB, IVC, IVD, IVE y IVF [65- 70] , aunque habitualmente nos referiremos a ellas como cPLA2 α , β , γ , δ , ϵ y ζ respectivamente. Las cPLA2 β , δ , ϵ y ζ forman un grupo de genes en el cromosoma 15 humano, mientras que la cPLA2 \pm y la γ se encuentran en el cromosoma 1 y 19 respectivamente [67, 68, 70, 71]. Todos los miembros del grupo comparten en su estructura la presencia de un dominio C2, responsable de la unión a membranas dependiente de Ca^{2+} , a excepción de la cPLA2 γ que carece de él, por lo que su actividad es independiente de Ca^{2+} , y aunque su actividad en la producción de mediadores lipídicos no ha sido demostrada sí que se postula un papel en la remodelación de fosfolípidos [72]. Actualmente se piensa que se encuentra constitutivamente anclada a membranas. La cPLA2b parece tener sólo una pequeña actividad intrínseca [73]. Tanto la cPLA2b como la cPLA2g son enzimas con poca especificidad por la hidrólisis de la posición sn-2 [65, 74].

La cPLA2d se ha clonado a partir de una librería de cDNA de queratinocitos humanos y parece que se encuentra sobrerregulada en la piel de los enfermos de psoriasis. Se ha sugerido que esta enzima es capaz de hidrolizar AA y ácido oleico (OA) en posición sn-2 sin embargo la actividad frente al ácido linoleico (LA) es incluso 6 veces superior [70]. Esto tiene especial relevancia, dado que los principales metabolitos de naturaleza grasa en la psoriasis son los derivados del ácido linoleico.

Recientemente se han clonado dos nuevas enzimas en ratones, la cPLA2e y la cPLA2z, la primera no muestra una selectividad aparente por PC o PC, al igual que la

cPLA2d, mientras que la última prefiere la PE a la PC. Las tres hidrolizan igualmente tanto AA como LA [68].

De todas estas enzimas, la que más exhaustivamente se ha estudiado es la cPLA2a ya que es la única que tiene preferencia por el AA de la posición sn-2 de los fosfolípidos, lo que la hace una enzima clave en producción de mediadores lipídicos como los eicosanoides [75, 76].

1.5.1. Estructura de la cPLA2a

Estructuralmente podemos distinguir dos dominios en la secuencia de la cPLA2a [77], uno catalítico y otro regulador, como se puede apreciar en la figura 7. El dominio regulador o dominio C2, llamado así por su homología con el dominio C2 de la PKC, está constituido por unos 120 aminoácidos en el extremo amino terminal, formando 8 ²•láminas antiparalelas, y es el responsable de la interacción de la enzima con las membranas intracelulares de una manera dependiente de Ca²⁺ [78-80]. La mayoría, aunque no todos los dominios C2, unen dos o tres iones de Ca²⁺ a través de dos residuos de Asp y Asn presentes en los lazos de unión a Ca²⁺ o CBL (del inglés Calcium Binding Loops). En estado de reposo (sin unión de Ca²⁺) estos residuos ácidos producen un potencial electronegativo en el dominio C2 lo cual es desfavorable para que se produzca la unión a membranas. La unión a Ca²⁺ neutraliza los residuos aniónicos y hace que el potencial cambie a electropositivo si hay residuos básicos presentes en la zona [81]. Esto es lo que sucede en el dominio C2 clásico de la PKC en el que se produce la unión a los fosfolípidos aniónicos de la membrana a través de un cambio electrostático. El análisis estructural y funcional del dominio C2 de la cPLA2a ha identificado los residuos que unen dos iones de Ca²⁺ en los 3 CBL de la superficie de unión a membrana [82-85]. A diferencia del dominio C2 tradicional de las PKC, la unión de Ca²⁺ al dominio C2 de la cPLA2a promueve la asociación de los residuos hidrofóbicos presentes en CBL1 y CBL3 con la PC anfotérica, más que con fosfolípidos aniónicos. Las diferencias en la especificidad de unión a fosfolípidos entre el dominio C2 de la PKC y de la cPLA2a tiene un papel crucial en

la regulación de la translocación a la membrana plasmática o a membranas intracelulares respectivamente [86-88]. Todos los miembros de la familia del grupo IV excepto la cPLA2g poseen un dominio C2.

Los dominios C2 pueden presentar dos topologías en lo que refiere a la configuración de las láminas ². Los primeros dominios C2 cristalizados a partir de la sinaptotagmina I y la PLC' determinaron las topologías I y II respectivamente. El dominio C2 de la cPLA2a presenta la topología II. La topología de los dominios C2 se puede predecir a partir de su secuencia de aminoácidos [80]. Los dominios C2 de las cPLA2 β, δ, ε y ζ presentan mayor homología entre ellos (35-40%) que con el dominio C2 de la cPLA2a (25%) [68]. En el dominio C2 de la cPLA2a los aminoácidos responsables de unir dos iones de Ca²⁺ son Asp40, Thr41 y Asp43 en el CBL1, Asn65 en el CBL2 y Asp93, Ala94 y Asn95 en el CBL3 [84, 85, 89]. Sólo cuatro de estos residuos están conservados en las otras enzimas del grupo, el Asp43, Asn65, Asp93 y Asn95.

La región que une el dominio C2 con el dominio catalítico en el caso de la cPLA2a tiene una longitud de 5 aminoácidos permitiendo cambios conformacionales que afectan a la interacción del dominio catalítico con la membrana, mientras que la longitud de esta región en los otros miembros de la familia es mucho mayor (unos 120 aa) lo que podría explicar las enormes diferencias entre los distintos miembros del grupo.

El dominio catalítico de la cPLA2a está formado por 14 ²-láminas y 13 ±-hélices. Su núcleo central está formado por una hilera de 10 ²-láminas entremezcladas y rodeadas por 9 ±-hélices (Fig 8). La Ser505, uno de los residuos susceptibles de ser fosforilados más conservados y necesario para la activación máxima de la cPLA2±, se localizan en una región altamente flexible, sin entrar en contacto con el cuerpo de la proteína. Otro residuo fosforilable bastante conservado es la Ser727 que también se encuentra en una zona separada en el extremo C terminal.

El centro activo de la cPLA2a está formado por un par Ser228-Asp549 localizado en el centro de una zona profunda predominante hidrofóbica (Fig. 9). Difiere pues, de la tríada clásica de las lipasas formada por Ser-His-Asp/Glu donde el residuo de His se encuentra entre la Ser y el Asp [90, 91]. En esta tríada, la His, activada por Asp, capta el protón de la Ser durante el ataque nucleofílico al enlace éster del sustrato. En la cPLA2a, ninguno de los 19 residuos de His cercanos es necesario para la actividad, aunque si se muta la Arg200 a Lys o Ala la actividad decrece de manera considerable. Esto sugiere un nuevo mecanismo catalítico en el que la Arg200 reemplaza a la clásica His [92]. El centro activo está cubierto por una tapa a la que se conectan unos residuos que actúan a modo de bisagra desplazando

1.5.2. Características enzimáticas de la cPLA2a

Debido a la gran importancia de la movilización específica del AA se han realizado numerosos estudios sobre la preferencia de sustrato de la cPLA2a. En estos experimentos se observó que sea cual sea la forma en la que le sean presentados los sustratos, el AA es siempre el mejor ácido graso liberado en comparación con otros ácidos grasos poliinsaturados, y esa preferencia no parece verse modificada por la cabeza polar del fosfolípido [93].

En cuanto a la preferencia del ácido graso a hidrolizar en relación con su número de insaturaciones, se ha observado que, entre moléculas con igual número de átomos de carbono, la cPLA2a manifiesta clara predilección por aquellas con mayor número de insaturaciones [93]. Pero si el grado de saturación es importante, también lo son las posiciones que ocupan estos enlaces dentro de la cadena carbonada. Así, los ácidos grasos C18:4 (Δ 6, 9, 12, 15), C22:4 (Δ 7, 10, 13, 16), C22:6 (Δ 7, 10, 13, 16, 19) son malos sustratos para la cPLA2a, a pesar de su gran número de insaturaciones. Además, el ácido graso C20:3 (Δ 5, 8, 11) se libera tan eficazmente como el C20:4 (Δ 5, 8, 11, 14), mientras que el C20:3 (Δ 8, 11, 14) se libera mucho más lentamente [77]. De todo esto se demuestra que la cPLA2a muestra preferencia por los ácidos grasos poliinsaturados,

especialmente los que poseen tres dobles enlaces situados entre los carbonos 5-6, 8-9 y 11-12 [77].

1.5.3. Mecanismos de regulación de la cPLA2a

El gen que codifica para la cPLA2 \pm humana se encuentra en el cromosoma 1q25, cerca del gen que codifica para la ciclooxigenasa 2 (COX-2), y, a diferencia de ésta, se encuentra expresada de manera constitutiva en la mayoría de células y tejidos [94, 95]. Aun así, se ha descrito que su expresión puede ser regulada transcripcionalmente por ciertas citoquinas pro inflamatorias y factores de crecimiento, y reprimida por glucocorticoides que bloquean la producción de eicosanoides en algunos modelos celulares [94-96].

Parece que la expresión de la cPLA2a está incrementada en algunos tipos de cáncer [97] en los que, en general, también existen altos niveles de COX-2. Esto tiene relevancia farmacológica si tenemos en cuenta que la PGE2 posee capacidad tumorigénica [98] y que el paso limitante de la producción de PGE2, si COX-2 está presente, es precisamente la acción de la cPLA2a.

Es importante resaltar que la cPLA2 \pm no requiere Ca²⁺ para desarrollar su actividad catalítica, sin embargo, el paso clave en la regulación de la cPLA2a es la translocación del citosol a las membranas para tener acceso a su sustrato. La translocación se induce por aumentos de los niveles intracelulares de Ca²⁺ que se une al dominio C2 e incrementa la afinidad de la enzima por las membranas [94, 99]. En estudios con mutantes de la cPLA2a en los que se ha suprimido el dominio regulador C2, se observó que la proteína resultante no fue capaz de unirse a las membranas y por lo tanto de hidrolizar fosfolípidos. Sin embargo, tanto ese mutante como la enzima nativa fueron capaces de hidrolizar fosfolípidos monoméricos con igual efectividad y de forma independiente de Ca²⁺ [77, 99, 100]. En muchos tipos celulares expuestos a agonistas que movilizan Ca²⁺ se ha observado que la cPLA2a transloca principalmente a la región perinuclear, concretamente a la membrana perinuclear, retículo endoplásmico y aparato de Golgi [60-63, 101]. Mediante técnicas de imagen en células vivas se ha observado que, en respuesta a aumentos fisiológicos de Ca²⁺ intracelular,

es decir pequeños aumentos transitorios, la cPLA2a se transloca principalmente al Golgi, mientras que la translocación al retículo endoplásmico y la membrana perinuclear requiere concentraciones de Ca²⁺ más elevadas [60]. El dominio C2 se comporta de la misma manera que la enzima completa en respuesta a aumentos en los niveles de Ca²⁺, lo que indica que este dominio es suficiente para dirigir la localización subcelular de la enzima en respuesta a agonistas que movilizan Ca²⁺ [60]. La especificidad de unión de los dominios C2 a fosfolípidos tiene un papel fundamental en la determinación de la localización subcelular. Por ejemplo, el dominio C2 de la PKC \pm tiene preferencia por la membrana plasmática rica en fosfatidilserina (PS), mientras que el dominio C2 de la cPLA2a prefiere membranas ricas en PC [88, 102, 103]. Por el momento la composición lipídica de la cara citoplasmática de las membranas del Golgi y del retículo endoplásmico no se conoce con exactitud, por lo que las dianas celulares del dominio C2 de la cPLA2a permanecen aún sin identificar.

El dominio catalítico de la cPLA2a contiene varios sitios funcionales susceptibles de fosforilación, en concreto la Ser505, Ser727, y Ser515, que son fosforilados por las proteín-quinasas activadas por mitógenos (MAPK), en concreto ERK1 y ERK2; quinasas que interactúan con las MAPK (MNK 1), y por la calmodulina quinasa II (CamK II) respectivamente [104-108]. La cPLA2a purificada y completamente defosforilada es catalíticamente activa y la fosforilación en el residuo de Ser505 solamente incrementa su actividad, dos o tres veces [109, 110]. Estudios recientes han demostrado que las fosforilaciones en la Ser505 o Ser727 participan en la regulación de la liberación de AA en condiciones de aumentos transitorios de los niveles de Ca²⁺ intracelulares, pero son menos importantes cuando los aumentos de Ca²⁺ son elevados y mantenidos [105]. Estos datos están de acuerdo con los resultados obtenidos por resonancia de plasmones de superficie, donde la fosforilación de la Ser505 aumenta la afinidad de unión de la cPLA2a a los fosfolípidos a concentraciones de Ca²⁺ situadas en el rango μ M bajo y sostienen la hipótesis de que la fosforilación, más que

regular la actividad catalítica, está implicada en la unión a membranas dependiente de Ca²⁺ [111].

También se ha estudiado el papel de la fosforilación en la translocación de la cPLA2a, y se ha visto cómo enzimas mutadas en el residuo Ser505 tienen el mismo comportamiento en respuesta a grandes aumentos de los niveles de Ca²⁺ intracelulares [101, 112]. En respuesta a pequeños incrementos de la concentración de Ca²⁺, la enzima no es capaz de translocarse a la membrana perinuclear [111]. Puesto que la fosforilación de la Ser505 por sí sola no es suficiente para dirigir la enzima a membranas, debe existir algún otro mecanismo de regulación que actúe conjuntamente cuando la translocación se produce en ausencia de aumentos significativos de la concentración de Ca²⁺ [113].

Recientemente han aparecido dos estudios sobre la fosforilación; en el primero se ha demostrado cómo la fosforilación de la Ser727 es la responsable de la ruptura de la unión inhibitoria de la enzima a un heterotetramero formado por anexina II y p11 lo que permitiría su translocación a membranas y conllevaría un aumento en la actividad catalítica [114]. En el segundo, se sugiere la posibilidad de que la fosforilación de la Ser515 promovida por la estimulación con noradrenalina en células de músculo liso de conejos, sea necesaria para que se produzca la fosforilación de la Ser505 por parte de ERK1/2 y que estas fosforilaciones sean importantes en la liberación de AA en estas células [115].

El dominio catalítico de la cPLA2a contiene dominios de residuos básicos que podrían regular la unión a membranas a través de la asociación con fosfolípidos aniónicos. Se ha demostrado la existencia de un dominio formado por la Arg488, Lys541, Lys543, y Lys544 responsable de la unión a fosfoinosítidos (PtdInsPs) [116, 117]. Los PtdInsPs que más incrementan in vitro la actividad de la cPLA2a son el PtdIns(4,5)P2 y el PtdIns(3,4,5)P3 y en menor grado el PtdIns(3,4)P2 [116-119]. Se ha sugerido que la unión de la cPLA2a a los PtdInsP induce un cambio conformacional que sitúa de manera óptima el dominio catalítico en la membrana [116]. Aunque existen datos contradictorios respecto a la especie que activa más a la cPLA2a, debidos

principalmente a las diferencias experimentales de los estudios, está claro que debe existir algún mecanismo de regulación de la cPLA2a por PtdInsP.

La ceramida 1-fosfato (C1P) es un potente regulador alostérico de la actividad de la cPLA2a in vitro . Se ha encontrado en el dominio C2 otro grupo de residuos básicos formado por la Arg57, la Lys58 y la Arg59, responsable de la unión a ceramida-1P tanto in vitro como in vivo. Se ha sugerido que la C1P disminuye la constante de disociación de la enzima haciendo que permanezca más tiempo anclada en las membranas [120-123].

Por otro lado, se han descubierto varias proteínas que se unen a la cPLA2a como la vimentina, p11, anexina I, caveolina-1, y PLIP (acrónimo del inglés PLA2 Interacting Protein) una variante de procesamiento alternativo de TIP60. La vimentina se une de una manera dependiente de Ca²⁺ a un sitio aún sin identificar del dominio C2, esta unión aumenta la liberación de AA aunque no se conoce bien el mecanismo [124]. PLIP también se une al dominio C2, colocaliza con la cPLA2a en el núcleo en ausencia de suero y promueve la generación de PGE2 [125]. En algunos modelos, la cPLA2a se localiza en microdominios ricos en caveolina-1 y co-immunoprecipita con ella [126]. Recientemente se ha descubierto que la anexina A6 inhibe la actividad de la cPLA2a y su asociación con el Golgi reduciendo la disponibilidad de colesterol (el colesterol y la disponibilidad de esfingolípidos afecta a la vesiculación del Golgi) e implicándola en el transporte de caveolina-1 [127].

1.5.4. Funciones de la cPLA2a

Desde que hace más de 20 años se publicaron los primeros estudios demostrando que las células de mamífero contenían una PLA2 citosólica dependiente de Ca²⁺ específica para el AA [128, 129], se ha mantenido que su papel principal era la liberación de AA destinado a la producción de eicosanoides. La construcción de un ratón genéticamente modificado en el que se eliminó el gen de la cPLA2a ha proporcionado una gran cantidad de información acerca del papel de la cPLA2a en los

procesos fisiológicos y patológicos [130, 131]. Los ratones sin cPLA2a tienen un crecimiento y una vida normal [132, 133]. Sin embargo, presentan un defecto renal relacionado con la edad, úlceras en el intestino delgado, corazones alargados, y defectos en la reproducción femenina relacionados con los metabolitos derivados de la cPLA2a que regulan procesos como el parto y la implantación de embriones [132-137]. La cPLA2a contribuye a la patogénesis de muchas enfermedades, especialmente en aquellas con un importante componente inflamatorio como las respuestas alérgicas, daño pulmonar agudo, fibrosis pulmonar, daño cerebral, artritis, reabsorción ósea y la encefalomiелitis autoinmune [130, 131, 138-144]. Recientemente se ha implicado la producción de PGE2 mediada por cPLA2a en protección contra la diabetes autoinmune o tipo I [145]. Los mediadores producidos por la cPLA2a pueden promover o suprimir la tumorigénesis dependiendo del tejido del que hablemos. La eliminación de la cPLA2a suprime la tumorigénesis en los ratones Apc-/+ [137, 146]. De la misma manera los ratones en los que se ha eliminado COX-2 también tienen reducida la tumorigénesis en el intestino delgado, lo que sugiere un papel para las prostaglandinas en la progresión del cáncer. Sin embargo estudios recientes han demostrado que la expresión de cPLA2a protegen de la aparición de cáncer de colon [147]. Se ha sugerido que el AA podría activar la esfingomielinasa, con la consiguiente producción de ceramida y desencadenamiento de muerte por apoptosis [148, 149]. Asimismo, se ha descrito que el AA es capaz de producir muerte directamente sobre células en cultivo con baja concentración de suero (menor del 2%) [150]. Sin embargo, la fuente de AA en estos casos no ha de ser necesariamente la cPLA2a, puesto que hay estudios que muestran que la cPLA2a puede sufrir rotura proteolítica durante el desencadenamiento de procesos apoptóticos [46]. En estos casos, las iPLA2 serían las principales generadoras de AA en la célula. La participación de la cPLA2a en procesos de muerte celular queda aún más en entredicho por la publicación de artículos en los que se le otorga un papel fundamentalmente protector [151]. Por tanto, es posible que el papel de la cPLA2a en la muerte celular dependa

tanto del factor desencadenante de la muerte, como del sistema celular en el que ésta ocurra.

Recientemente se ha observado que la cPLA2 \pm participa en la fagocitosis de dos maneras distintas, produciendo AA para la generación de eicosanoides y regulando la estimulación de la NADPH oxidasa para la producción de aniones superóxido [152, 153].

Si bien la cPLA2 \pm se encuentra implicada en multitud de procesos fisiológicos y patológicos, la utilización de ratones genéticamente modificados en los que se ha eliminado el gen de la cPLA2a ha permitido conocer la existencia de vías alternativas de producción de mediadores lipídicos donde otras PLA2 tienen un papel relevante.

2. OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes anteriormente descritos, el objetivo general de este trabajo fue profundizar en el conocimiento de nuevos mecanismos de regulación de la cPLA2a. Este objetivo general se puede desglosar en varios objetivos más específicos:

2.1. Analizar el papel desempeñado por la cPLA2 \pm en la muerte celular inducida por sobrecarga de Ca²⁺ citoplasmático en células HEK 293.

2.2. Profundizar en la regulación de la cPLA2 \pm por PtdIns(4,5)P₂ en un contexto celular.

2.3. Estudiar el papel de la cPLA2 \pm en procesos fisiológicos típicos de células inmunocompetentes, como la fagocitosis de microorganismos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Cultivos de líneas celulares – HEK 293 es una línea de fibroblastos humanos derivada de riñón embrionario

tras la infección con el ADN 5 de un adenovirus. RAW 264.7 es una línea de macrófagos de ratón obtenidos del líquido ascítico y establecida a partir de un tumor inducido por el virus de la leucemia múrida de Abelson. Tanto las células HEK 293 como las RAW 264.7 son adherentes y se cultivaron en medio DMEM y RPMI 1640 respectivamente, ambos medios se suplementaron con suero bovino fetal al 10% (v/v), previamente inactivado por calor (20 min a 56° C), y 100 U/ml de una mezcla de penicilina-estreptomina y 2 mM de L-glutamina. A los medios así suplementados los denominamos medios completos. Todas las células se mantuvieron en incubadores a 37° C, en atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂. Durante las 2 h previas a los experimentos, las células se privaron de suero para que se encontraran en un estado de quiescencia en el momento del experimento.

3.2. Obtención de monocitos y macrófagos humanos – Las células sanguíneas se obtuvieron a partir de concentrados de paquetes globulares (buffy coats) de voluntarios sanos, proporcionados amablemente por el Centro Regional de Hemodonación y Hemoterapia de Castilla y León. El concentrado sanguíneo se diluyó en la proporción 1:1 con PBS pH 7,4 y posteriormente se añadió sobre una solución de Ficoll-Paque manteniendo la proporción de sangre-PBS/Ficoll-Paque 3:1. Esta mezcla se centrifugó a 725 x g, sin freno, durante 30 min. Tras la centrifugación, se formaron varias fases: en la parte superior se situó la fase acuosa (plasma y PBS), un anillo de células mononucleares separaba esta fase del Ficoll-Paque y en el fondo del tubo se situaron los eritrocitos y las células polimorfonucleares, constituidas mayoritariamente por polimorfonucleares neutrófilos. Las células mononucleares se recogieron mediante aspiración con pipeta Pasteur y se lavaron 3 veces con PBS mediante centrifugación a 450 x g, durante 10 min. Tras el recuento, se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina y 40 µg/ml de gentamicina, se distribuyeron en placas de cultivo y se dejaron durante 2 h en el incubador para permitir la adherencia de los monocitos al plástico y su separación de los linfocitos. Tras las 2 h, prácticamente la totalidad de los monocitos estaban adheridos a la

placa y los linfocitos se pudieron eliminar mediante sucesivos lavados con PBS.

Para promover la diferenciación de los monocitos a macrófagos, las células se cultivaron durante 14 días en medio RPMI suplementado con 2 mM de L-glutamina, 40 µg de gentamicina y 5% de suero humano procedente de una mezcla de donantes, realizándose cambios de medio cada 3 días [154].

3.3. Construcciones y mutagénesis dirigida – La secuencia de la cPLA2a humana fue clonada en el vector pEGFP-C3 utilizando los sitios de corte para Hind-III y Pst-I. Esta construcción codifica la expresión de una proteína de fusión fluorescente que contiene en el extremo N-terminal la EGFP seguida de la secuencia de la cPLA2a humana (EGFP-cPLA2a). La cPLA2a silvestre se mutó en el sitio responsable de la unión a Ca²⁺ reemplazando el ácido aspártico de la posición 43 por una asparagina (D43N) utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange XL, con los oligonucleótidos indicados en la tabla 4. La cPLA2a silvestre también se mutó para producir EGFP-K488E/K541A/K543A/K544A-cPLA2a en dos pasos, primero el mutante EGFP-K541A/K543A/K544A-cPLA2a y a continuación, sobre éste, se produjo una segunda ronda de mutagénesis para sustituir la Lys de la posición 488 por un Glu. Por último la ECFP-cPLA2a silvestre también se mutó para producir ECFP-(S505A)cPLA2a. En todos los casos la mutagénesis se confirmó por secuenciación.

La secuencia de la iPLA2 de grupo VIA2 fue clonada en el vector pEYFP-N3 utilizando los sitios de corte para Hind-III y Sal-I. Esta construcción codifica la expresión de una proteína de fusión fluorescente que contiene en el extremo N-terminal la secuencia de la iPLA2 humana del grupo VIA2 seguida de la EYFP (GVIA2-iPLA2-EYFP). Para cambiar la EGFP de las construcciones por EYFP, ECFP o DsRed se intercambiaron los fragmentos que codifican para las distintas proteínas fluorescentes situados entre los sitios de restricción AgeI y BsrGI.

3.4. Transfecciones estables y transitorias – Para expresar las distintas proteínas de fusión fluorescentes tanto en células HEK 293 como en RAW 264.7 se

utilizó el transporte de DNA plasmídico complejoado a lípidos catiónicos como método de transfección, en concreto se utilizaron indistintamente dos reactivos, Lipofectamine® Plus y Lipofectamine® 2000. Para seleccionar una población enriquecida de células HEK 293 que expresasen tanto la proteína de fusión fluorescente EGFP-cPLA2a como los mutantes utilizados se mantuvieron las células en presencia de 1 mg/ml de geneticina. Aproximadamente 2 x 10⁶ macrófagos humanos se transfectaron mediante nucleofección. Se recogieron mediante tripsinización durante 90 min y un raspado mecánico posterior muy suave, se centrifugaron a 200 x g durante 10 min y se resuspendieron en 100 µl de Human Macrophage Nucleofector Solution a lo que se añadieron 5 µg del ADN plasmídico que correspondiese, se les aplicó el programa Y-010 y se resuspendieron en 400 µl de Macrophage Serum Free Medium suplementado con 5% de suero humano inactivado. La expresión de las proteínas fluorescentes se analizó mediante microscopía 24 h después.

3.5. Silenciamiento génico por RNA de transferencia – Para el silenciamiento del gen de la cPLA2a humana se utilizaron dos juegos de RNAi, 5'-AGCAUAUUGUGAGUAAUGATT-3' y su complementario; y 5'-AGAAUAGUGAAGGAUUGCATT-3' y su complementario, que se introdujeron a una concentración de 40 nM en las células mediante nucleofección o por transfección con Lipofectamine® según los protocolos anteriormente descritos. También se utilizó un control marcado fluorescentemente para comprobar la entrada del RNAi en las células. Se analizaron los niveles de expresión de la proteína diana 36-48 después de la transfección mediante microscopía o inmunodetección por western blot.

3.6. Obtención de extractos celulares para inmunodetección – Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se recogieron mediante raspado en tampón de lisis. Posteriormente se incubaron en hielo durante 30 min y el lisado celular se centrifugó a 16000 x g a 4° C durante 10 min. La cantidad de proteína presente en el sobrenadante se cuantificó y se añadió tampón de carga

de Laemmli, finalmente las muestras se hirvieron durante 5 min antes de proceder a su separación electroforética.

La cuantificación de la proteína total presente en los extractos celulares se realizó según el método descrito por Bradford [155], basado en el desplazamiento del máximo de absorbancia de una solución ácida del colorante azul Coomassie Blue G-250 (de 465 a 595 nm) que tiene lugar cuando el reactivo se une a una proteína. La absorbancia aumenta linealmente para concentraciones de proteína entre 1 y 25 $\mu\text{g/ml}$. La recta patrón de calibrado se realizó con diluciones de albúmina de suero bovino (BSA).

La electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes y reductoras, según el método descrito por Laemmli [156] de manera que las proteínas se separaron principalmente en función de su tamaño. Se utilizaron geles con un 10% de acrilamida y un tampón de electroforesis con 25 mM de Tris, 0,2 M de glicina y 1% de SDS (p/v). En paralelo a las muestras, se corrieron estándares preteñidos de diferentes tamaños moleculares, lo cual permitió la separación de las proteínas en función de su peso molecular. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF mediante un sistema de transferencia BioRad, a 300 mA durante 60 o 90 min, en función del grosor del gel y del tamaño de la proteína, en condiciones de humedad utilizando un tampón de transferencia (CAPS 1 mM, pH 11). Para disminuir la adsorción inespecífica del anticuerpo primario se incubó la membrana en una solución rica en proteínas compuesta por PBS y 5% (p/v) de leche desnatada. La incubación se realizó en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Para la inmunodetección de las proteínas, las membranas se incubaron en agitación lenta con el anticuerpo primario correspondiente diluido en la solución de bloqueo (PBS-Tween 0,1% suplementado con 0,5% de leche (5% BSA en el caso de los anticuerpos de la cPLA2 \pm) y 0,025% de timerosal), durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4° C. Seguidamente se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0,1% con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo primario no adherido específicamente a la

membrana. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario diluido en la PBS-Tween 20 al 0,1% suplementado con 0,5% de leche, durante 1 h, a temperatura ambiente y en agitación lenta. Tras la incubación, se realizaron de nuevo tres lavados con PBS-Tween 0,1% para eliminar el anticuerpo secundario no adherido específicamente a la membrana. Las membranas se incubaron con el reactivo comercial ECL, que permite la detección quimioluminiscente de los anticuerpos conjugados con peroxidasa, y se monitorizó en un sistema de captura de imágenes de quimioluminiscencia digital VersaDoc (BioRad).

3.7. Ensayo de liberación de ácido araquidónico – Para medir la actividad in vivo de la cPLA2a se cuantificó el AA liberado al medio extracelular. Para ello se sembraron 0,5 x10⁶ de células RAW 264.7 o HEK 293 en placas de cultivo de 35 mm de diámetro. Se incubaron en medio completo suplementado con 0,25 μCi [3H]AA durante toda la noche a 37° C, tiempo óptimo para una eficiente incorporación del AA a los fosfolípidos de membrana. Tras el marcaje, las células se lavaron dos veces con una solución con 0,5 mg/ml de BSA deslipidada en PBS y se estimularon en medio de cultivo sin suero suplementado con 0,5 mg/ml de BSA deslipidada durante el tiempo necesario. En el caso de las células HEK 293, previamente a la estimulación se añadió timerosal 5 μM durante 15 min para bloquear la reutilización de los ácidos grasos. En el caso de los macrófagos humanos se marcaron con 0,5 μCi [3H]AA en medio incompleto suplementado con 0,5 mg/ml de BSA y 1% de ITS y se estimularon en el mismo medio tras los lavados con PBS suplementado con 0,5 mg/ml de BSA. Posteriormente se recogieron las muestras, se centrifugaron a 16000 x g durante 2 min y se recogieron 800 μl del sobrenadante. En paralelo, se añadió 1 ml de Triton-X-100 al 0,1% a las placas de cultivo y se recogió el lisado celular para cuantificar el [3H]AA total incorporado en los fosfolípidos de membrana. Finalmente se determinó la radiactividad presente en los sobrenadantes y en los lisados celulares añadiendo los 800 μl de cada muestra a tubos de contaje que contenían 3 ml de líquido de centelleo. La cuantificación de la radiactividad se realizó en un contador de centelleo líquido LS 6500 (Beckman Coulter) y los resultados se

expresaron como porcentaje de [3H]AA liberado respecto al total de [3H]AA incorporado a las células, o en algún caso, respecto al total del incorporado en los fosfolípidos.

Los lípidos de las células HEK 293 y de sus sobrenadantes se separaron mediante extracción con cloroformo/metanol (1:2, v/v) según el método de Bligh y Dyer [157]. Los lípidos extraídos de la fase de cloroformo se secaron mediante evaporación al vacío en un speed-vac, se resuspendieron en cloroformo/metanol (9:1 v/v) y se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) en gel de sílice en un sistema que contenía n-hexano/dietileter/Ácido acético (70:30:1, v/v/v) corriendo paralelamente estándares. Los puntos correspondientes al AA y a los fosfolípidos se rasparon y se añadieron a tubos de contaje que contenían 3 ml de líquido de centelleo. La cuantificación de la radiactividad se realizó en un contador de centelleo líquido.

3.8. Localización de la actividad fosfolipasa A2 in vivo – El 1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-undecanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina (bis-BODIPY FL C11 –PC) permite la monitorización continua de actividades fosfolipasa A2. Cuando es incorporado por las células, la proximidad de los fluoróforos BODIPY FL situados en las cadenas adyacentes del fosfolípido provoca un autoapantallamiento de la fluorescencia, que desaparece tras la liberación del ácido graso marcado con BODIPY FL (mediada por las fosfolipasas A1 o A2), provocándose así un aumento de la intensidad de fluorescencia. Se sembraron células en placas de cultivo con el fondo de vidrio. Al día siguiente se marcaron con 5 μ M de bis-BODIPY FL C11-PC durante 30 min a 37° C en medio completo. Transcurrido ese tiempo se lavaron 2 veces con PBS y se mantuvieron en HBSS suplementado con 10 mM de HEPES, 1,3 mM de CaCl₂ y 1,3 mM de MgCl₂. En el caso de los experimentos de fagocitosis truncada se procedió tal y como se describe en dicho apartado. La fluorescencia verde se monitorizó mediante microscopía confocal con un láser de excitación de argón a 488 nm y una combinación de filtros HQ500 long band pass y HQ560 short band pass.

3.9. Preparación de los diferentes estímulos – para preparar los fosfoinosítidos, se mezclaron 2 μ g de fosfoinosítido con 2 μ g de “transportador” (neomicina o histona, 0,5 mM), se resuspendieron en 200 μ l de medio HBSS suplementado con 10 mM de HEPES y, salvo que se indique lo contrario, 1,3 mM de CaCl₂. La mezcla se sonicó en un baño de agua durante 2 min y se dejaron reposar durante 10 min a 37°C antes de su utilización. La concentración final de polifosfoinosítido en el medio fue de 5,7 μ M. Para preparar el zimósán se partió de una preparación comercial de zimósán-A procedente de *Sacharomyces cerevisiae*, que se diluyó a 20 mg/ml en agua destilada hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente, se hirvió durante 10 min y, una vez enfriado, se centrifugó a 2000 x g durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con PBS estéril a pH 7,4. Finalmente, se resuspendió en PBS y se almacenó a -20° C. Antes de su utilización el zimósán se sonicó durante 15 segundos para facilitar la separación de las partículas. En el caso del zimósán marcado con Alexa-Fluo594, se resuspendió en PBS suplementado con 2 mM de azida sódica, para obtener una concentración final de 20 mg/ml. El zimósán opsonizado se preparó mediante incubación con una mezcla de suero humano durante 20 min a 37° C, en proporción 1 ml de suero por cada 3 mg de zimósán. Tras la incubación, se lavó el precipitado tres veces con PBS y se sonicó en HBSS suplementado con 10 mM de HEPES, 1 mM de CaCl₂ y 1mM de MgCl₂, o en medio incompleto durante 15 segundos.

3.10. Microscopía confocal – Las células se sembraron en placas de cultivo con el fondo de vidrio. En el caso de células HEK 293, las placas se cubrieron previamente con Poli-L-Lisina al 0,01% (v/v). Tras 24 h se reemplazó el medio de cultivo por HBSS con 10 mM de HEPES 1,3 mM de CaCl₂ y 1,3 mM de MgCl₂. Se monitorizaron las células a 37°C mediante microscopía confocal utilizando un sistema de escaneo de láser BioRad Radiance 2100 acoplado a un microscopio invertido Nikon TE-2000U equipado con una cámara termostatazada para placas de 35 mm (Warner Instruments). Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) Para estudiar el $\Delta\psi_m$, las células se tiñeron en los frascos de cultivo con 7,5 μ M de yoduro

5, 5', 6, 6'-tetracloro-1, 1', 3, 3'-tetraetilbenzimidazol-carbocianina (JC-1) o con 20 nM de tetrametil ester de rodamina (TMRE) durante 15-20 min a 37°C. Después se separaron las células de los frascos de cultivo pipeteando, se lavaron y se resuspendieron en PBS con 1,3 mM CaCl₂ y 1,3 mM MgCl₂. Posteriormente se analizaron en un citómetro de flujo (Epics XL de Beckman Coulter), procurando mantener la temperatura a 37°C, donde la fluorescencia verde se monitorizó entre 505-545 nm (FL1) y la fluorescencia roja entre 555-600 nm (FL2). Para el análisis de fluorescencia de JC-1 o TMRE por microscopía confocal se sembraron las células en placas con el fondo de vidrio recubiertas de Poli-L Lisina, se marcaron con JC-1 o TMRE como se menciona antes, y se monitorizaron utilizando un láser de excitación de argón a 488 nm y una combinación de filtros HQ500 long band pass y HQ560 short band pass para la fluorescencia verde, y un HQ570 long band pass para la fluorescencia roja.

3.11. Fagocitosis sincronizada e inmunofluorescencia – El protocolo para la fagocitosis sincronizada fue adaptado de Larsen y col. [158]. Los macrófagos transfectados o sin transfectar se sembraron en cubres de vidrio de 15 mm de diámetro. Se lavaron con medio incompleto, y se mantuvieron en hielo durante 5 min antes de añadir el zimósán Alexa-Fluor594 opsonizado. Tras una incubación de 15 min se pasaron los cubres a placas con medio a 37 °C y se incubaron a esa temperatura durante los tiempos indicados. Las células fueron rápidamente lavadas con PBS y fijadas con una solución al 3% (p/v) paraformaldehído y 3% (p/v) de sacarosa durante 15 min. Si se procedía a teñir las células para inmunocitoquímica, posteriormente se permeabilizaban con una solución de permeabilización al 0,1 % (v/v) de Triton X-100 durante 3 min. Se lavaron 3 veces con PBS y para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos se utilizó una solución de bloqueo (PBS suplementado con 0,2% (p/v) BSA y suero de cabra al 10%) durante 30 min. A continuación se incubaron las células con el anticuerpo primario diluido en una solución 1:5 de la solución de bloqueo, durante 1 h. Se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 h. Se lavaron 3 veces con PBS y se utilizó DAPI 1µg/ml para

marcar los núcleos. Se lavaron 3 veces con PBS y se montaron los cubres con Gelvatol.

3.12. Fagocitosis para citometría de flujo – Unas horas antes del experimento se lavaron las células con medio incompleto, y se mantuvieron en hielo 5 min antes de añadir el zimósán Alexa-Fluor594 opsonizado (aproximadamente 5-10 partículas por célula). Tras una incubación de 15 min se lavaron las células con medio a 37 °C y se incubaron a esa temperatura durante los tiempos indicados. A continuación, las células se mantuvieron en hielo para parar la fagocitosis y se rasparon suavemente en una solución de PBS suplementado con 0,2 mM de EDTA. Se realizaron dos lavados centrifugando a baja velocidad y se resuspendieron en 1ml de PBS. Las células se analizaron en un citómetro de flujo Epics XL de Beckman Coulter. La fluorescencia roja se monitorizó a 605-635 nm (FL3).

3.13. Fagocitosis frustrada – Los macrófagos transfectados con 24 h de antelación se separaron de las placas de cultivo por tripsinización y se resuspendieron en medio HPMI suplementado con 2 mM de EDTA. Permanecieron en suspensión en agitación suave durante 2-3 h antes del experimento para permitir la recuperación de los receptores de membrana potencialmente dañados tras el tratamiento con tripsina. Se centrifugaron a 200 x g durante 10 min y se

resuspendieron en medio HPMI suplementado con 2 mM de MgCl₂. Posteriormente, se sembraron en las placas de cultivo con el fondo de vidrio tratado o sin tratar previamente con 10 mg/ml de IgG humana. 30 min después las células se monitorizaron por microscopía confocal. Para la obtención de imágenes XZ, se aplicaron cortes sagitales, de manera que en lugar de observar las células desde arriba, se ven de perfil, tal como se muestra en la figura 11.

3.14. Medidas de Ca²⁺ intracelular – Para monitorizar los cambios en la concentración de Ca²⁺ intracelular se utilizaron las sondas fluorescentes Fluo-3 y Fluo-5 capaces de aumentar su fluorescencia a medida que unen Ca²⁺ con distintas afinidades. Ambas son moléculas cargadas y, por tanto, incapaces de atravesar las

membranas celulares. Para internalizar las sondas, las células se incubaron con los derivados acetoximetiléster de Fluo-3 (Fluo-3/AM) o de Fluo-5 (Fluo-5/AM), que son hidrofóbicos y atraviesan fácilmente la membrana celular. Una vez que acceden al citosol son de-esterificadas por las esterasas intracelulares. 24 h antes del experimento se sembraron las células en placas de cultivo con el fondo de vidrio, en el caso de las células HEK 293 en las mismas placas cubiertas de Poli-L-Lisina. Al día siguiente se marcaron las células en medio completo suplementado con 3 μ M de Fluo-3/AM o Fluo-5/AM durante 20 min a 37° C. Transcurrido ese tiempo, se lavaron dos veces con HBSS suplementado con 10 mM de HEPES, 1,3 mM CaCl₂ y 1,3 mM de MgCl₂.

El registro de fluorescencia en tiempo real permite la monitorización continua de la [Ca²⁺]_c en las células vivas, estimada a partir de la fórmula: donde K_d es la constante de disociación del ion, F_{min} es la intensidad de fluorescencia del indicador en ausencia de Ca²⁺, F_{max} es la fluorescencia de la sonda saturada, y F es la fluorescencia en cada punto temporal. Para el Fluo-3 se puede utilizar una ecuación mucho más simple cuando se satura el Fluo-3 intracelular con MnCl₂. En estas circunstancias la fluorescencia se describe a partir de la fluorescencia del Mn, donde la FMn=0,2 x Fmax. Por determinaciones experimentales, es conocido que la Fmin=Fmax/40, así que solamente fue necesario medir la FMn durante los experimentos. De manera que una vez finalizado el experimento se añadió 2 mM MnCl₂ en presencia de 5 μ M de ionomicina, para calcular la FMn, y 100 μ M de digitonina para calcular la Fmin.

3.15. Modelado molecular – Las imágenes de las estructuras cristalinas de la sPLA₂, cPLA_{2a} y del dominio C2 de la cPLA_{2a} se realizaron a partir de las coordenadas de los aminoácidos se encontraban en ficheros descargables 1KQU.pdb, 1CJY.pdb y 1BCI.pdb respectivamente de la base de datos electrónica Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Estas coordenadas se utilizaron para renderizar la estructura utilizando el software gratuito iMol (<http://www.pirx.com/iMol/>). El montaje final se realizó utilizando Adobe Illustrator CS.

3.16. Análisis estadístico – Los datos presentados en este trabajo corresponden a resultados representativos de al menos tres experimentos independientes en cada caso. Los datos de las gráficas se representaron como la media \pm desviación estándar.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis del papel de la cPLA_{2a} en la muerte celular inducida por sobrecarga de Ca²⁺ citoplasmático

4.1.1. Análisis de la muerte dependiente de Ca²⁺ en células HEK293

4.1.2. Caracterización de células HEK 293 que sobreexpresan cPLA_{2 \pm} y el mutante D43N-cPLA_{2 \pm}

4.1.3. La sobreexpresión de EGFP-cPLA_{2 \pm} protege a las células de la muerte inducida por ionomicina

4.1.4. La inhibición específica de la actividad de la cPLA_{2a} destruye el efecto protector de la sobreexpresión de la cPLA_{2a}

4.1.5. El AA exógeno previene a las células HEK 293 de la muerte inducida por ionomicina

4.1.6. La sobreexpresión de la EGFP-cPLA_{2 \pm} disminuye la despolarización mitocondrial inducida por ionomicina en células HEK 293

4.1.7. El ácido araquidónico previene la exposición de fosfatidilserina en los macrófagos RAW 264.7 tratados con ionomicina

4.2. Estudio de la interacción del PtdIns(4,5)P₂ con la cPLA_{2a}

4.2.1. El PtdIns(4,5)P₂ induce la translocación de la cPLA_{2 \pm} a membranas celulares

4.2.2. El PtdIns(4,5)P₂ y la cPLA_{2 \pm} se dirigen a las mismas estructuras subcelulares

4.2.3 El Ca²⁺ es necesario para que se produzca la translocación de la cPLA2a inducida por PtdIns(4,5)P₂

4.2.4. El PtdIns(4,5)P₂ disminuye los requerimientos de Ca²⁺ para que se produzca la translocación de la cPLA2a

4.2.5. Las Lys488, Lys541, Lys543, y Lys544 están implicadas en la unión de la cPLA2a a PtdIns(4,5)P₂

4.3. Papel de la cPLA2a durante los procesos de fagocitosis

4.3.1. Fagocitosis de zimosán opsonizado en macrófagos humanos

4.3.2. Activación de la cPLA2a durante la fagocitosis de zimosán opsonizado

4.3.3. La cPLA2a transloca a la membrana del fagosoma durante la fagocitosis de zimosán opsonizado

4.3.4. El PtdIns(4,5)P₂ se acumula en la membrana del fagosoma durante su formación

4.3.5. El PtdIns(4,5)P₂ y la cPLA2a colocalizan en la membrana del fagosoma durante la fagocitosis

4.3.6. El PtdIns(3,4,5)P₃ se acumula en la membrana del fagosoma durante la formación y el cierre de los fagosomas

4.3.7. Papel de las Lys488, Lys541, Lys543, y Lys544 y de la fosforilación de la Ser505 en la translocación de la cPLA2a al fagosoma

4.3.8. La modificación de los niveles de PtdInsP tiene importantes efectos sobre la actividad de la cPLA2a

4.3.9. La inhibición específica de cPLA2a dificulta la internalización de las partículas de zimosán opsonizado

5. DISCUSION

5.1. Análisis del papel de la cPLAa en muerte celular inducida por sobrecarga de calcio citoplásmico

Estudios previos han demostrado que la cPLA2a es el efector clave implicado en la liberación de AA en respuesta a los ionóforos de Ca²⁺ [44, 62], y los resultados descritos en esta parte del estudio son consistentes con esas observaciones previas. La liberación de AA en las células HEK 293 transfectadas con EGFP-cPLA2a en respuesta al ionoforo de Ca²⁺ ionomicina es muy rápida, aumentando linealmente hasta los 15 minutos del tratamiento y alcanzando, a partir de ahí, la estabilidad. En estas condiciones aparecen tempranamente (15 min) signos típicos de muerte celular: blebbing, aumento de la permeabilidad y externalización de fosfolípidos aniónicos. Estos datos están de acuerdo con otros descritos previamente sobre el efecto de la sobrecarga de Ca²⁺ citoplasmático en muerte celular, y además proporcionan detalles acerca del papel del AA derivado de la acción de la cPLA2a como regulador del balance de señales que deciden entre la supervivencia y la muerte de la célula.

Queda pues establecido que la sobreexpresión de cPLA2a en células HEK 293 protege a las células de la muerte celular inducida por ionomicina, y que este efecto protector no se observa en células que sobreexpresan una cPLA2a mutante en la que el Asp43 ha sido reemplazado con una Asn. Esta mutación provoca que la enzima no transloque a las membranas intracelulares en respuesta a aumentos de Ca²⁺, haciéndola incapaz de interactuar con sus sustratos y catalizar la hidrólisis de los fosfolípidos [82, 83, 113].

Los datos presentados sugieren que los efectos pro-supervivencia de la cPLA2a están producidos por la formación de un metabolito derivado de la acción de la enzima, el AA o un lisofosfolípido. Esto llevó a analizar el efecto que producía el tratamiento de las células con niveles micromolares de AA o de lisofosfatidilcolina durante la muerte celular inducida con ionomicina. Los resultados demuestran claramente que sólo el AA protege a las células de la muerte. De manera interesante, el ácido palmítico, a la misma concentración

utilizada que el AA, no es capaz de proteger a las células. Este descubrimiento es consistente con el hecho de que la cPLA2a muestra una mayor preferencia por los fosfolípidos que contienen AA [117]. Además, los efectos protectores del AA no se deben a su conversión en un prostanoide, ya que la indometacina, un inhibidor de las ciclooxigenasas, no modifica la respuesta.

De acuerdo con lo anterior, se profundizó más en el mecanismo por el cual el AA protege de la muerte celular. Se observó que concentraciones micromolares de AA libre es capaz de inducir despolarización mitocondrial. Tal efecto podría ser producido por al menos tres rutas diferentes: el AA actuando como un protonóforo mitocondrial, el AA abriendo el poro de transición mitocondrial, o el AA actuando sobre la proteínas desacoplantes. La última no parece muy probable ya que el ácido palmítico no produce efecto sobre la despolarización mitocondrial y es bien conocida su acción sobre las proteínas desacoplantes [171]. Por otro lado, esto podría ser también compatible con la idea de que el AA actuase como protonóforo, ya que estudios anteriores han sugerido que la capacidad protonofora de los ácidos grasos libres es requerida para la apertura del poro de transición mitocondrial [172]. A este respecto, se ha encontrado que el AA exógeno produce un descenso bifásico en el $\Delta\psi_m$ cuando se añade a mitocondrias aisladas de hígado de rata, en el que la primera fase sería comparable a un efecto puramente protonoforo, y la segunda fase, más larga, sería atribuible a efectos en el poro de transición mitocondrial [173].

Dado que la acumulación de Ca^{2+} dentro de la mitocondria está conducida por el $\Delta\psi_m$ [164], se puede concluir de esta parte del trabajo que, en las células HEK 293 que sobreexpresan cPLA2a, la ionomicina induce tanto la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria, como la liberación de AA mediada por la cPLA2. La alta concentración de AA disminuiría los cambios del $\Delta\psi_m$ de la mitocondria, y bloquearía la captura de Ca^{2+} . Como última consecuencia el daño mitocondrial cesaría, parando o retrasando así los siguientes sucesos de la muerte celular (exposición de fosfatidilserina).

En conjunto, se puede concluir, que los elevados niveles de AA derivados de la activación de la cPLA2 \pm juegan un papel citoprotector en células que han sido expuestas a una sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático. Esto puede parecer sorprendente de acuerdo a estudios previos que sugerían que la estimulación de la cPLA2a y la generación de AA y/o sus productos oxigenados estaban, a menudo, asociados con toxicidad celular en respuesta a diversos estímulos, incluidos los ionóforos de Ca^{2+} [174, 175]. Distintos mecanismos podrían explicar los efectos observados, y es muy probable que las respuestas de supervivencia contra muerte sean muy distintas dependiendo del tipo celular y de las condiciones experimentales. Hay que resaltar que el modo en el que los ionóforos de Ca^{2+} causan muerte celular depende tanto de su naturaleza química como de las concentraciones utilizadas. Así, bajas concentraciones producen apoptosis, mientras que altas concentraciones producen necrosis en algunos tipos celulares [176,177]. Entre estos dos extremos también se ha descrito que la sobrecarga de Ca^{2+} puede producir muerte celular con características tanto apoptóticas como necróticas [178]. De acuerdo con estas observaciones, en el sistema de muerte celular que se describe en este trabajo hay una despolarización mitocondrial rápida, externalización de fosfatidilserina, blebbing, cambios del contorno nuclear y aumento de la permeabilidad nuclear. Todos estos sucesos, típicos de células que han entrado en un proceso apoptótico, tienen lugar durante los primeros 15-30 minutos tras el tratamiento con ionomicina. A tiempos más largos, no hay ni activación de caspasas ni condensación de la cromatina, sucesos más propios de una muerte por necrosis.

Estos resultados siguen la línea de los estudios que han sugerido que cuando las células deciden morir en respuesta a ligandos de muerte tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) o el ligando de Fas, donde se produce la ruptura proteolítica temprana de la cPLA2 \pm por parte de las caspasas para prevenir la liberación de AA y su posterior transformación en eicosanoides [46, 179]. Se infiere pues, que la activación de la cPLA2a podría ayudar a promover la supervivencia celular en ciertas condiciones. Del mismo modo, también se ha

sugerido que las PLA2 podrían actuar eliminando los fosfolípidos dañados durante el proceso de muerte, permitiendo así la reparación de la membrana y promoviendo la supervivencia [180]. La observación de que no sólo la cPLA2a “per se” sino también niveles micromolares de AA exógeno son protectores de muerte celular inducida por ionomicina, sugiere que los propios ácidos grasos podrían estar implicados en una ruta que conduciría a la supervivencia celular. Más aún, los datos sugieren que tal ruta podría actuar a través de la despolarización mitocondrial, después de la cual no entraría más Ca²⁺ en la mitocondria, reduciéndose así el daño mitocondrial.

Es de especial relevancia para estos resultados un estudio reciente de Tommasini y col. [151] en el que se trataban células U937 con peroxinitrito. Estos autores encontraron que la activación de la cPLA2a promovía la supervivencia en las células tratadas con peroxinitrito, y que ese efecto era debido al AA. Utilizando diferentes estrategias para disminuir los niveles de activación de la enzima (inhibidores químicos, oligos antisentido) descubrieron que la formación de AA regulaba el equilibrio entre muerte y supervivencia. Por medio de otra aproximación experimental (aumentando los niveles de expresión de la enzima) se han obtenido resultados que están de acuerdo con los trabajos de Tommasini y col. [151]. De manera que parece que el efecto protector de altos niveles de AA no se restringe sólo a muerte celular producida por sobrecarga de Ca²⁺, sino que además podrían operar en la muerte que se produce por daño oxidativo. Desde un punto de vista fisiopatológico, la protección que produce la sobreexpresión de cPLA2a podría tener consecuencias importantes en lo que respecta a la defensa de las células de mamífero en respuesta a las infecciones víricas. En un estudio reciente, Allal y col. [181] han encontrado que la cPLA2a es una de las proteínas producidas por las células huésped infectadas por el citomegalovirus humano. Aunque se sigue sin conocer demasiado bien la función de estas proteínas, se ha sugerido que se requieren para una infección eficiente [182, 183]. Ya que hemos demostrado que la sobreexpresión de cPLA2a protege de la muerte celular, se podría especular con la idea de que la cPLA2± del

citomegalovirus humano inyectada en las células huésped propiciaría la supervivencia de las células infectadas mediante el mantenimiento de altos niveles de AA, dando tiempo a que el virus se replique.

En conclusión, los datos demuestran que la sobreexpresión de cPLA2a en las células HEK 293 protege de la muerte inducida por sobrecarga de Ca²⁺ citoplasmático, y que este mecanismo implica la producción de niveles altos de AA, ya que la cPLA2± presente de manera constitutiva en las células no parece producir el AA suficiente para contrarrestar el inicio del proceso de muerte.

5.2. Estudio de la interacción del PtdIns(4,5)P2 con la cPLA2a

El estudio de la interacción que se produce entre el PtdIns(4,5)P2 y la cPLA2± en un contexto fisiológico relevante ha sido posible gracias a la utilización de un método que permite preservar la integridad celular durante la introducción de los PtdInsP marcados. Esto se ha conseguido gracias a la neutralización de las cargas de los PtdInsP2 mediante la unión a histona o neomicina, lo que ha eliminado la necesidad de introducir los PtdInsP por permeabilización celular y los problemas derivados de ello. Con esta metodología se muestra que el PtdIns(4,5)P2 modifica la localización de la cPLA2±. Una posible explicación para esta translocación inducida por PtdIns(4,5)P2 podría ser que el fosfoinosítido se podría hidrolizar por acción de la PLC, generándose inositol (1,4,5) trisfosfato (Ins(1,4,5)P3), lo que produciría un aumento de los niveles de Ca²⁺ y con ello la translocación de la cPLA2a. Sin embargo, la translocación de la cPLA2a a membranas también se observó cuando las células fueron tratadas con TR-PtdIns(3,4)P2 cuya hidrólisis por la PLC no produce Ins(1,4,5)P3, por lo que no se alterarían los niveles intracelulares de Ca²⁺. Que ambos isómeros modifiquen la localización subcelular de la cPLA2a sugiere un efecto mas bien dependiente de la carga que uno debido al metabolismo de los fosfoinosítidos vía PLC. Esta descrito que la unión de la cPLA2a in vitro a vesículas enriquecidas en PtdInsP2 es

un proceso independiente de la concentración de Ca^{2+} [119]. Los resultados obtenidos sugerirían que, al menos, en células vivas, el efecto del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ no es totalmente independiente de Ca^{2+} , ya que la $\text{cPLA}2\text{a}$ necesitaría una determinada concentración basal de Ca^{2+} para que para poder translocar a membranas intracelulares. Los resultados indican que el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ancla a la $\text{cPLA}2\text{a}$ a las membranas perinucleares mediante un proceso que necesita tanto un nivel umbral de Ca^{2+} como un sitio de unión a Ca^{2+} funcional. El $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ podría suponer un segundo sitio de unión a membranas (además del sitio de unión a Ca^{2+}) o podría actuar disminuyendo los requerimientos de Ca^{2+} para la translocación a membranas. A la vista de los resultados obtenidos, la segunda opción es la más razonable.

Como ya se ha mencionado anteriormente, estudios de mutagénesis han identificado un dominio polibásico formado por cuatro Lys como el posible sitio de unión a PtdInsP_2 [116, 117] que en la enzima humana serían la Lys488, Lys541, Lys543, y la Lys544, que se muestran en la figura 68 junto al Asp43 responsable de la unión a Ca^{2+} . Los resultados obtenidos sugieren que la interacción de la $\text{cPLA}2\text{a}$ con la membrana podría ser secuencial, primero tendría lugar la unión del dominio C2 en presencia de bajas concentraciones de Ca^{2+} y posteriormente la unión al $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ a través del grupo catiónico de las cuatro Lys, lo que orientaría la enzima de la manera adecuada para hidrolizar los fosfolípidos y liberar el AA (Fig. 69).

Según este modelo de activación de $\text{cPLA}2\text{a}$ por $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ los niveles de Ca^{2+} necesarios estarían cerca de los que tienen las células en estado de reposo, aproximadamente 50 nM, sin necesidad de alcanzar las concentraciones habituales de un estado de activación típico. Esto contrasta con los estudios realizados “in vitro” en los que el Ca^{2+} no era necesario para la unión e hidrólisis en micelas mixtas [117]. Esta discrepancia pone de manifiesto la complicada naturaleza de la unión de la $\text{cPLA}2\text{a}$ a membranas biológicas “in vivo”. Recientemente se ha demostrado que la $\text{cPLA}2\text{a}$ puede unirse a ceramida 1-fosfato [121, 123] y a algunas proteínas como la vimentina [124], una variante de

procesamiento alternativo de Tip60 [125], y a un heterotretamero formado por p11 y anexina-II [114], lo que confirma que en células vivas existen muchas más moléculas que pueden modular y participar en la unión de la $\text{cPLA}2\pm$ a las membranas.

No se puede descartar la posibilidad de que la unión al $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ tenga lugar primero y sea este hecho el que produzca la unión a membranas a través del dominio C2. Existen algunas evidencias experimentales que apoyarían esta secuencia de sucesos en los trabajos de Subramanian y col de 2005 en los que la ceramida 1-fosfato aumenta la actividad de la $\text{cPLA}2\text{a}$ al interactuar con el dominio C2, disminuyendo los requerimientos de Ca^{2+} para que se produzca la translocación de la enzima.

3. Papel de la $\text{cPLA}2\pm$ durante los procesos de fagocitosis

En esta parte del trabajo se desvela, al menos en parte, el mecanismo por el que la $\text{cPLA}2\text{a}$ transloca a los fagosomas en respuesta a zimosán opsonizado en macrófagos humanos. Mediante técnicas de imagen como la microscopía confocal se ha observado que la $\text{cPLA}2\text{a}$ colocaliza con el dominio de homología a plectrina de la $\text{PLC}\delta$ en los fagosomas nacientes y con el dominio de homología a plectrina de Btk en los fagosomas nacientes y ya formados. La mutación de la $\text{cPLA}2\text{a}$ en el grupo de residuos básicos formado por la Lys488, Lys541, Lys543 y Lys544 impide el movimiento de la enzima a los fagosomas, y la modificación de los niveles de PtdInsP modifica la liberación de AA. Además la mutación del residuo de Ser505 también inhibe la translocación. También se ha observado que disminuyendo la actividad o la expresión de la $\text{cPLA}2\text{a}$ en macrófagos humanos se altera el patrón de internalización de las partículas de zimosán opsonizado. Todos estos datos hacen posible pensar en la idea de un papel regulador de los PtdInsP en la translocación de la $\text{cPLA}2\text{a}$ a los fagosomas y la implicación de esta enzima en el tráfico de las partículas internalizadas. Más aún, se ha demostrado en este trabajo que la $\text{cPLA}2\text{a}$ es activa en la membrana del

fagosoma, donde estaría liberando AA, aunque todavía se desconoce que fosfolípidos estarían siendo hidrolizados. La cPLA2a tiene que translocarse desde el citosol a aquellas estructuras en las que sea capaz de hidrolizar fosfolípidos para liberar AA. Hasta la fecha, la gran mayoría de trabajos existentes han demostrado que en respuesta a determinados estímulos, la cPLA2a transloca, casi exclusivamente a la membrana perinuclear, retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Por lo tanto, se asumía que la cPLA2a prefería esas membranas a la membrana plasmática u otros tipos de membranas intracelulares. Recientemente, Leslie y col. describieron la translocación de la cPLA2a a los fagosomas en macrófagos peritoneales de ratón aunque en su trabajo no se mostraba el mecanismo por el que esto ocurría [184]. Eliminando el Ca²⁺ extracelular disminuía el número de fagosomas pero la cPLA2a podía anclarse a los fagosomas presentes incluso cuando los niveles de Ca²⁺ intracelulares eran los de una célula en reposo [184]. Estos resultados ponían de manifiesto que debían existir mecanismos independientes de los niveles de Ca²⁺ capaces de dirigir la cPLA2a a los fagosomas. En el modelo que se presenta en este trabajo, el zimósán opsonizado también aumenta los niveles de Ca²⁺ aunque el mayor aumento se producía mucho antes (30 s) que el anclaje de la cPLA2 \pm al fagosoma (5-10 min). Como ya se ha demostrado y discutido en apartados anteriores de este trabajo, el PtdIns(4,5)P₂ es capaz de dirigir la cPLA2a a membranas, incluso a niveles basales del Ca²⁺ intracelular. Por otro lado, en la última década se lleva realizando un gran esfuerzo para comprender el complejo metabolismo de los fosfoinosítidos que tiene lugar durante la fagocitosis, especialmente durante la fagocitosis mediada por los receptores de IgG [167, 185]. Gracias a ello, se sabe que los niveles de PtdIns(4,5)P₂ aumentan de manera transitoria en los fagosomas en formación y disminuyen a medida que éstos se cierran [16] y que los niveles de PtdIns(3,4,5)P₃ también se modifican durante la fagocitosis mediada por receptores de IgG [24]. Con estos antecedentes, se planteó la posibilidad de la que la unión de la cPLA2a a los fagosomas se debiera, al menos en cierta medida, a los aumentos de PtdInsP durante la formación y desarrollo de los fagosomas. Los

datos obtenidos muestran que la cPLA2a transloca a los fagosomas cuando hay acumulación de PtdIns(4,5)P₂ y de PtdIns(3,4,5)P₃. El hecho de que el mutante EGFP-4KE/A-cPLA2a no transloque a los fagosomas es una evidencia clara de que la translocación de la cPLA2a está mediada por los PtdInsP. La razón por la que la cPLA2 \pm es capaz de reconocer y unirse al PtdIns(4,5)P₂ en la copa fagocítica y no al del resto de la membrana plasmática plantea nuevas preguntas acerca de la biología de esta enzima.

Es posible que la naturaleza del PtdIns(4,5)P₂ producido en los fagosomas sea muy distinta a la del que forma parte de la membrana plasmática en condiciones de reposo. También es posible que existan otras proteínas o moléculas implicadas en la translocación de la cPLA2a junto con los PtdInsP, que estén presentes en la membrana, o actúen sólo en condiciones de fagocitosis. Dado que durante el proceso de fagocitosis la cPLA2a colocaliza tanto con sondas específicas para PtdIns(4,5)P₂ como para PtdIns(3,4,5)P₃, se podría pensar en un escenario en el que la enzima interaccionase con el PtdIns(4,5)P₂ durante la formación de los fagosomas. A medida que la formación del fagosoma progresa, la PI3K se activaría generando PtdIns(3,4,5)P₃ que podría prolongar la unión de la cPLA2a a membranas, y por lo tanto su acción sobre éstas, aumentando aún más su activación. Esta idea estaría apoyada por el hecho de que al aumentar los niveles de PtdIns(3,4,5)P₃ mediante la sobreexpresión de la PI3K, aumenta la liberación de AA, mientras que, la inhibición enzimática de la PI3K disminuye la liberación. Hay que tener en cuenta que, los inhibidores de PI3K impiden la ingestión de partículas y la cPLA2a no se transloca a los fagosomas en estas circunstancias.

Por otra parte, se ha visto que la fosforilación de la cPLA2a en la Ser505 es un requisito importante para su translocación a la copa fagocítica. Trabajos anteriores habían demostrado que el mutante EGFP-S505AcPLA2a no transloca a membranas en respuesta a bajas concentraciones de ionóforos de Ca²⁺, pero cuando los niveles de Ca²⁺ intracelular no son muy elevados (hasta 400 nM) [111]. Sin embargo, este mutante transloca perfectamente cuando los niveles de

Ca²⁺ son superiores a 400 nM utilizando ionóforos de Ca²⁺, o durante estimulaciones más fisiológicas, por ejemplo con ATP [111, 112]. Por lo tanto, esta es la primera vez que, en un contexto fisiológico, la cPLA₂ muestra una absoluta necesidad por estar fosforilada en la Ser505. Esto podría deberse a que durante la fagocitosis la máxima concentración de Ca²⁺ alcanzada es aproximadamente 250 nM. Por lo tanto, los requerimientos para la translocación de la cPLA₂ a los fagosomas parecen ser muy diferentes a los que se necesitan para otras membranas intracelulares. Además, estos datos apoyarían la idea de que cuando los niveles de Ca²⁺ intracelular son elevados, la fosforilación de la cPLA₂ no sería tan importante como cuando los niveles son bajos, o cercanos a los niveles basales. Recientemente se ha observado que la sPLA₂ del grupo V también transloca a los fagosomas durante la internalización de partículas de zimosán en macrófagos peritoneales de ratón [186]. En el presente trabajo se ha estudiado la translocación de la proteína de fusión fluorescente GV_sPLA₂-EGFP a la membrana fagocítica durante la ingestión de zimosán opsonizado en macrófagos humanos. En este modelo, no se ha observado asociación entre la sPLA₂ del grupo V y los fagosomas a ninguno de los tiempos utilizados (hasta 60 min). Los receptores de membrana implicados en la internalización de zimosán en modelos de ratón y en modelos humanos son muy diferentes. En ratones, por ejemplo, el zimosán es reconocido por los receptores dectina-1 [187], mientras que en humanos el zimosán no opsonizado no libera AA ni es internalizado. Los receptores implicados en la ingestión de zimosán opsonizado en los macrófagos humanos parecen ser fundamentalmente los receptores Fc para IgG. Por lo tanto, es posible que los diferentes mecanismos de internalización sean responsables de las diferencias en la translocación de la sPLA₂ del grupo V a los fagosomas. También es posible que la sPLA₂ de grupo V no actúe de la misma manera en ratones que en humanos.

Por otro lado, se investigó la participación de otra PLA₂, la iPLA₂ de grupo VIA₂ en los procesos de fagocitosis. En células control, la construcción GVIA₂-iPLA₂-EYFP se asocia con las mitocondrias, como ya se había descrito en otros sistemas [188], y la fagocitosis

de zimosán opsonizado no cambia la localización de la construcción. Por lo tanto, esta enzima no parece intervenir en éstos procesos, al menos de forma directa. Por lo tanto, de los tres grandes grupos de PLA₂, únicamente la cPLA₂ parece estar implicada en la liberación de AA durante la fagocitosis de zimosán opsonizado en macrófagos humanos. Esto tiene gran importancia ya que durante la fagocitosis se producen PGE₂ y leucotrienos, ambos productos del metabolismo del AA, por la acción de COX-2 y LTC₄ [186, 187]. Sin la liberación de AA, no sería posible la producción de estos mediadores. Se ha especulado con la idea de que la producción de PGE₂ y leucotrienos no sólo amplificaría la respuesta inflamatoria si no que contribuiría a la destrucción de los microorganismos internalizados [186], siendo por lo tanto elementos importantes en la digestión intrafagosomal.

En este trabajo, también se ha observado que las partículas ingeridas no se localizan igual en el interior celular en células control que en células en las que se ha inhibido la actividad o la expresión de la cPLA₂ mediante inhibidores químicos o tratamiento con RNA de interferencia respectivamente. En estos casos, las partículas no se encuentran cerca de la región perinuclear si no que se encuentran más bien dispersas alrededor del citoplasma lo que implica un papel de la cPLA₂ en el mecanismo de internalización de los fagosomas. Se ha observado recientemente que el AA promueve la formación del complejo SNARE (acrónimo del inglés soluble NSF attachment receptor), una familia de proteínas que es responsable de la fusión de membranas intracelulares [189]. Es posible que la inhibición de la cPLA₂ impida la fusión correcta mediada por el complejo SNARE de los fagosomas con otras vesículas intracelulares, y que esto impida la internalización completa de los fagosomas.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se han elaborado las siguientes conclusiones. En lo que se

refiere a la muerte celular inducida por sobrecarga de Ca²⁺ citoplasmático:

6.1. La sobreexpresión de cPLA2 \pm en células HEK 293 tiene un efecto protector sobre la muerte celular inducida por sobrecarga de Ca²⁺ citoplasmático.

6.2. Este efecto es llevado a cabo por el ácido araquidónico, uno de los metabolitos de la cPLA2a, ya que los lisofosfolípidos no protegen de la muerte celular en las mismas condiciones.

6.3. Los elevados niveles de AA reducen la despolarización mitocondrial producida durante la sobrecarga de Ca²⁺ intracelular, parando así el daño mitocondrial y retrasando los siguientes pasos de la muerte celular.

6.4. El efecto protector que ejerce el ácido araquidónico no depende del tipo celular utilizado ya que se ha observado tanto en las células HEK 293 como en las células de origen monocítico RAW 264.7.

En lo que se refiere a la regulación de cPLA2a por fosfoinosítidos:

6.5. El PtdInsP2 induce la translocación de la cPLA2a a la membrana perinuclear en células HEK 293.

6.6. El PtdIns(4,5)P2 incrementa la liberación de AA mediada por cPLA2a tanto en células HEK 293 como en células RAW 264.7.

6.7. El PtdIns(4,5)P2 disminuye los requerimientos de Ca²⁺ para que se produzca la translocación de la cPLA2a a membranas perinucleares.

6.8. Los aminoácidos Lys488, Lys541, Lys543, y Lys544 presentes en la cPLA2a están implicadas en la unión funcional de la cPLA2a a PtdIns(4,5)P2.

En lo que se refiere al papel de la cPLA2a durante los procesos de fagocitosis:

6.9. La cPLA2a se transloca a la membrana del fagosoma durante la fagocitosis de zimosán opsonizado en macrófagos humanos.

6.10. La translocación de la cPLA2a al fagosoma conlleva la activación de la enzima puesto que, paralelamente tiene lugar la liberación de AA.

6.11. Otras PLA2 como la sPLA2 de grupo V o la iPLA2 de grupo VIA2 no translocan a la membrana de los fagosomas, al menos, en macrófagos humanos.

6.12. La cPLA2a colocaliza con PtdIns en la membrana del fagosoma, concretamente con el PtdIns(4,5)P2 y con el PtdIns(3,4,5)P3.

6.13. La cPLA2a necesita tanto los residuos Lys488, Lys541, Lys543, y Lys544, como la fosforilación en la Ser505 para la translocación a la membrana de los fagosomas.

6.14. La inhibición química o la disminución de la expresión de la cPLA2a provoca defectos en la internalización de partículas de zimosán opsonizado.

El trabajo realizado durante el período de realización de esta tesis doctoral ha dado lugar a las publicaciones científicas indicadas en las referencias 190-196.

REFERENCES

1. Celada, A. and Nathan, C. (1994) Macrophage activation revisited. *Immunol Today* 15: 100-102.
2. Taylor, P.R., Martínez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 901-944.
3. Arnaout, M.A., Todd, R.F., Dana, N., Melamed, J., Schlossman, S.F., and Colten, H.R. (1983) Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-

granulocyte membrane glycoprotein (Mol). *J Clin Invest* 72: 171-179.

4. Ehlenberger, A.G. and Nussenzweig, V. (1977) The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *J Exp Med* 145: 357-371.
5. Gigli, I. and Nelson, R.A., Jr. (1968) Complement dependent immune phagocytosis. I. Requirements for C'1, C'4, C'2, C'3. *Exp Cell Res* 51: 45-67.
6. Kono, H., Suzuki, T., Yamamoto, K., Okada, M., Yamamoto, T., and Honda, Z. (2002) Spatial raft coalescence represents an initial step in Fc gamma R signaling. *J Immunol* 169: 193-203.
7. Kwiatkowska, K., Frey, J., and Sobota, A. (2003) Phosphorylation of Fc gamma RIIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts. *J Cell Sci* 116: 537-550.
8. Greenberg, S. (1999) Modular components of phagocytosis. *J Leukoc Biol* 66: 712-717.
9. Suzuki, T., Kono, H., Hirose, N., Okada, M., Yamamoto, T., Yamamoto, K., and Honda, Z. (2000) Differential involvement of Src family kinases in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol* 165: 473-482.
10. Crowley, M.T., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V.L., and DeFranco, A.L. (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *J Exp Med* 186: 1027-1039.
11. Leverrier, Y., Okkenhaug, K., Sawyer, C., Bilancio, A., Vanhaesebroeck, B., and Ridley, A.J. (2003) Class I phosphoinositide 3-kinase p110beta is required for apoptotic cell and Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by macrophages. *J Biol Chem* 278: 38437-38442.
12. Booth, J.W., Kim, M.K., Jankowski, A., Schreiber, A.D., and Grinstein, S. (2002) Contrasting requirements for ubiquitylation during Fc receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *EMBO J* 21: 251-258.
13. Pitt, A., Mayorga, L.S., Stahl, P.D., and Schwartz, A.L. (1992) Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest* 90: 1978-1983.
14. Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J.D., Sheetz, M.P., and Meyer, T. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell* 100: 221-228.
15. Tran, D., Gascard, P., Berthon, B., Fukami, K., Takenawa, T., Giraud, F., and Claret, M. (1993) Cellular distribution of polyphosphoinositides in rat hepatocytes. *Cell Signal* 5: 565-581.
16. Botelho, R.J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J.D., Meyer, T., and Grinstein, S. (2000) Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* 151: 1353-1368.
17. Coppelino, M.G., Dierckman, R., Loijens, J., Collins, R.F., Pouladi, M., Jongstra-Bilen, J., Schreiber, A.D., Trimble, W.S., Anderson, R., and Grinstein, S. (2002) Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Ialpha impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *J Biol Chem* 277: 43849-43857.
18. Tolia, K.F., Rameh, L.E., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Chen, J., Prestwich, G.D., Cantley, L.C., and Carpenter, C.L. (1998) Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases synthesize the novel lipids phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 5-phosphate. *J Biol Chem* 273: 18040-18046.
19. Wong, K.W. and Isberg, R.R. (2003) Arf6 and phosphoinositide-4-phosphate-5-kinase activities permit bypass of the Rac1 requirement for beta1 integrin-mediated bacterial uptake. *J Exp Med* 198: 603-14.

20. Gu, H., Botelho, R.J., Yu, M., Grinstein, S., and Neel, B.G. (2003) Critical role for scaffolding adapter Gab2 in Fc gamma R-mediated phagocytosis. *J Cell Biol* 161: 1151-1161.
21. Moon, K.D., Post, C.B., Durden, D.L., Zhou, Q., De, P., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (2005) Molecular basis for a direct interaction between the Syk proteintyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 280: 1543-1551.
22. Tridandapani, S., Lyden, T.W., Smith, J.L., Carter, J.E., Coggeshall, K.M., and Anderson, C.L. (2000) The adapter protein LAT enhances fcgamma receptor-mediated signal transduction in myeloid cells. *J Biol Chem* 275: 20480-20487.
23. Vieira, O.V., Botelho, R.J., Rameh, L., Brachmann, S.M., Matsuo, T., Davidson, H.W., Schreiber, A., Backer, J.M., Cantley, L.C., and Grinstein, S. (2001) Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol* 155: 19-25.
24. Marshall, J.G., Booth, J.W., Stambolic, V., Mak, T., Balla, T., Schreiber, A.D., Meyer, T., and Grinstein, S. (2001) Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptormediated phagocytosis. *J Cell Biol* 153: 1369-1380.
25. Irvine, R.F. (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem J* 204: 3-16.
26. Corey, E.J., Niwa, H., Falck, J.R., Mioskowski, C., Arai, Y., and Marfat, A. (1980) Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 6: 19-25.
27. Funk, C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875.
28. Coleman, R.A., Smith, W.L., and Narumiya, S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46: 205-229.
29. Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., and McIntyre, T.M. (2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69: 419-445.
30. Schaloske, R.H. and Dennis, E.A. (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761: 1246-1259.
31. Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., Yamamoto, S., Kuwata, H., and Kudo, I. (1999) Functional association of type IIA secretory phospholipase A(2) with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 274: 29927-29936.
32. Wijewickrama, G.T., Kim, J.H., Kim, Y.J., Abraham, A., Oh, Y., Ananthanarayanan, B., Kwatia, M., Ackerman, S.J., and Cho, W. (2006) Systematic evaluation of transcellular activities of secretory phospholipases A2. High activity of group V phospholipases A2 to induce eicosanoid biosynthesis in neighboring inflammatory cells. *J Biol Chem* 281: 10935-10944.
33. Mounier, C.M., Ghomashchi, F., Lindsay, M.R., James, S., Singer, A.G., Parton, R.G., and Gelb, M.H. (2004) Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups IIA and X secreted phospholipase A(2) occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A(2)-alpha. *J Biol Chem* 279: 25024-25038.
34. Seilhamer, J.J., Plant, S., Pruzanski, W., Schilling, J., Stefanski, E., Vadas, P., and Johnson, L.K. (1989) Multiple forms of phospholipase A2 in arthritic synovial fluid. *J Biochem* 106: 38-42.
35. Nevalainen, T.J., Haapamaki, M.M., and Gronroos, J.M. (2000) Roles of secretory phospholipases A(2) in inflammatory diseases and trauma. *Biochim Biophys Acta* 1488: 83-90.

36. Boyanovsky, B.B., van der Westhuyzen, D.R., and Webb, N.R. (2005) Group V secretory phospholipase A2-modified low density lipoprotein promotes foam cell formation by a SR-A- and CD36-independent process that involves cellular proteoglycans. *J Biol Chem* 280: 32746-32752.
37. Pruzanski, W., Lambeau, L., Lazdunsky, M., Cho, W., Kopilov, J., and Kuksis, A. (2005) Differential hydrolysis of molecular species of lipoprotein phosphatidylcholine by groups IIA, V and X secretory phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta* 1736: 38-50.
38. Wooton-Kee, C.R., Boyanovsky, B.B., Nasser, M.S., de Villiers, W.J., and Webb, N.R. (2004) Group V sPLA2 hydrolysis of low-density lipoprotein results in spontaneous particle aggregation and promotes macrophage foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 762-767.
39. Wei, S., Ong, W.Y., Thwin, M.M., Fong, C.W., Farooqui, A.A., Gopalakrishnakone, P., and Hong, W. (2003) Group IIA secretory phospholipase A2 stimulates exocytosis and neurotransmitter release in pheochromocytoma-12 cells and cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 121: 891-898.
40. Enomoto, A., Murakami, M., Valentin, E., Lambeau, G., Gelb, M.H., and Kudo, I. (2000) Redundant and segregated functions of granule-associated heparin-binding group II subfamily of secretory phospholipases A2 in the regulation of degranulation and prostaglandin D2 synthesis in mast cells. *J Immunol* 165: 4007-4014.
41. Koduri, R.S., Gronroos, J.O., Laine, V.J., Le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T.J., and Gelb, M.H. (2002) Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *J Biol Chem* 277: 5849-5857.
42. Beers, S.A., Buckland, A.G., Koduri, R.S., Cho, W., Gelb, M.H., and Wilton, D.C. (2002) The antibacterial properties of secreted phospholipases A2: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall. *J Biol Chem* 277: 1788-1793.
43. Satake, Y., Diaz, B.L., Balestrieri, B., Lam, B.K., Kanaoka, Y., Grusby, M.J., and Arm, J.P. (2004) Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. *J Biol Chem* 279: 16488-16494.
44. Gijon, M.A., Spencer, D.M., Siddiqi, A.R., Bonventre, J.V., and Leslie, C.C. (2000) Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that Do and Do not mobilize calcium. Novel role of mitogen-activated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A2 regulation. *J Biol Chem* 275: 20146-20156.
45. Balsinde, J., Bianco, I.D., Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E.A. (1995) Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8527-8531.
46. Atsumi, G., Tajima, M., Hadano, A., Nakatani, Y., Murakami, M., and Kudo, I., (1998) Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca²⁺-independent phospholipase A2 but not cytosolic phospholipase A2, which undergoes proteolytic inactivation. *J Biol Chem* 273: 13870-13877.
47. Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2002) Involvement of calcium-independent phospholipase A2 in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 40384-40389.
48. Perez, R., Melero, R., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2004) Role of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 279: 40385-40391.
49. Rickard, A., Portell, C., Kell, P.J., Vinson, S.M., and McHowat, J. (2005) Protease-activated receptor stimulation activates a Ca²⁺-independent phospholipase A2 in bladder microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F714-

F721.

50. Yellaturu, C.R. and Rao, G.N. (2003) A requirement for calcium-independent phospholipase A2 in thrombin-induced arachidonic acid release and growth in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 278: 43831-43837.
51. Moran, J.M., Buller, R.M., McHowat, J., Turk, J., Wohltmann, M., Gross, R.W., and Corbett, J.A. (2005) Genetic and pharmacologic evidence that calcium-independent phospholipase A2beta regulates virus-induced inducible nitric-oxide synthase expression by macrophages. *J Biol Chem* 280: 28162-28168.
52. Seegers, H.C., Gross, R.W., and Boyle, W.A. (2002) Calcium-independent phospholipase A(2)-derived arachidonic acid is essential for endothelium-dependent relaxation by acetylcholine. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 918-923.
53. Song, K., Zhang, X., Zhao, C., Ang, N.T., and Ma, Z.A. (2005) Inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A2 results in insufficient insulin secretion and impaired glucose tolerance. *Mol Endocrinol* 19: 504-515.
54. Balboa, M.A., Saez, Y., and Balsinde, J. (2003) Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol* 170: 5276-5280.
55. Atsumi, G., Murakami, M., Kojima, K., Hadano, A., Tajima, M., and Kudo, I. (2000) Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release. *J Biol Chem* 275: 18248-18258.
56. Perez, R., Matabosch, X., Llebaria, A., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2006) Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J Lipid Res* 47: 484-491.
57. Abe, A. and Shayman, J.A. (1998) Purification and characterization of 1-O-acylceramide synthase, a novel phospholipase A2 with transacylase activity. *J Biol Chem* 273: 8467-8474.
58. Hiraoka, M., Abe, A., and Shayman, J.A. (2002) Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A2, 1-O-acylceramide synthase. *J Biol Chem* 277: 10090-10099.
59. Evans, J.H. and Leslie, C.C. (2004) The cytosolic phospholipase A2 catalytic domain modulates association and residence time at Golgi membranes. *J Biol Chem* 279: 6005-6016.
60. Evans, J.H., Spencer, D.M., Zweifach, A., and Leslie, C.C. (2001) Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *J Biol Chem* 276: 30150-30160.
61. Glover, S., de Carvalho, M.S., Bayburt, T., Jonas, M., Chi, E., Leslie, C.C., and Gelb, M.H. (1995) Translocation of the 85-kDa phospholipase A2 from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J Biol Chem* 270: 15359-15367.
62. Hirabayashi, T., Kume, K., Hirose, K., Yokomizo, T., Iino, M., Itoh, H., and Shimizu, T. (1999) Critical duration of intracellular Ca²⁺ response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 274: 5163-5169.
63. Peters-Golden, M., Song, K., Marshall, T., and Brock, T. (1996) Translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. *Biochem J* 318: 797-803.
64. Shirai, Y., Balsinde, J., and Dennis, E.A. (2005) Localization and functional interrelationships among cytosolic Group IV, secreted Group V, and Ca²⁺-independent Group VI phospholipase A2s in P388D1 macrophages using GFP/RFP constructs. *Biochim Biophys Acta* 1735: 119-129.

65. Song, C., Chang, X.J., Bean, K.M., Proia, M.S., Knopf, J.L., and Kriz, R.W. (1999) Molecular characterization of cytosolic phospholipase A2-beta. *J Biol Chem* 274: 17063-17067.
66. Sharp, J.D., White, D.L., Chiou, X.G., Goodson, T., Gamboa, G.C., McClure, D., Burgett, S., Hoskins, J., Skatrud, P.L., Sportsman, J.R., and et al. (1991) Cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 266: 14850-14853.
67. Pickard, R.T., Striffler, B.A., Kramer, R.M., and Sharp, J.D. (1999) Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 274: 8823-8831.
68. Ohto, T., Uozumi, N., Hirabayashi, T., and Shimizu, T. (2005) Identification of novel cytosolic phospholipase A(2)s, murine cPLA(2){delta}, {epsilon}, and {zeta}, which form a gene cluster with cPLA(2){beta}. *J Biol Chem* 280: 24576-24583.
69. Clark, J.D., Lin, L.L., Kriz, R.W., Ramesha, C.S., Sultzman, L.A., Lin, A.Y., Milona, N., and Knopf, J.L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 65: 1043-1051.
70. Chiba, H., Michibata, H., Wakimoto, K., Seishima, M., Kawasaki, S., Okubo, K., Mitsui, H., Torii, H., and Imai, Y. (2004) Cloning of a gene for a novel epithelium-specific cytosolic phospholipase A2, cPLA2delta, induced in psoriatic skin. *J Biol Chem* 279: 12890-12897.
71. Tay, A., Simon, J.S., Squire, J., Hamel, K., Jacob, H.J., and Skorecki, K. (1995) Cytosolic phospholipase A2 gene in human and rat: chromosomal localization and polymorphic markers. *Genomics* 26: 138-141.
72. Asai, K., Hirabayashi, T., Houjou, T., Uozumi, N., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2003) Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2gamma). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. *J Biol Chem* 278: 8809-8814.
73. Lucas, K.K. and Dennis, E.A. (2004) The ABC's of Group IV cytosolic phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 1636: 213-218.
74. Stewart, A., Ghosh, M., Spencer, D.M., and Leslie, C.C. (2002) Enzymatic properties of human cytosolic phospholipase A(2)gamma. *J Biol Chem* 277: 29526-29536.
75. Leslie, C.C. (2004) Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70: 373-376.
76. Leslie, C.C. (2004) Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochem Cell Biol* 82: 1-17.
77. Nalefski, E.A., Sultzman, L.A., Martin, D.M., Kriz, R.W., Towler, P.S., Knopf, J.L., and Clark, J.D. (1994) Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain. *J Biol Chem* 269: 18239-18249.
78. Cho, W. (2001) Membrane targeting by C1 and C2 domains. *J Biol Chem* 276: 32407-32410.
79. Jimenez, J.L., Smith, G.R., Contreras-Moreira, B., Sgouros, J.G., Meunier, F.A., Bates, P.A., and Schiavo, G. (2003) Functional recycling of C2 domains throughout evolution: a comparative study of synaptotagmin, protein kinase C and phospholipase C by sequence, structural and modelling approaches. *J Mol Biol* 333: 621-639.
80. Nalefski, E.A. and Falke, J.J. (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 5: 2375-2390.
81. Murray, D. and Honig, B. (2002) Electrostatic control of the membrane targeting of C2 domains. *Mol Cell*. 9: 145-154.

82. Perisic, O., Paterson, H.F., Mosedale, G., Lara-Gonzalez, S., and Williams, R.L., (1999) Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 274: 14979-14987.
83. Bittova, L., Sumandea, M., and Cho, W. (1999) A structure-function study of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2. Identification of essential calcium ligands and hydrophobic membrane binding residues. *J Biol Chem* 274: 9665-9672.
84. Perisic, O., Fong, S., Lynch, D.E., Bycroft, M., and Williams, R.L. (1998) Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 273: 1596-15604.
85. Nalefski, E.A. and Falke, J.J. (1998) Location of the membrane-docking face on the Ca²⁺-activated C2 domain of cytosolic phospholipase A2. *Biochemistry* 37: 17642-17650.
86. Evans, J.H., Gerber, S.H., Murray, D., and Leslie, C.C. (2004) The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A2 C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells. *Mol Biol Cell* 15: 371-383.
87. Evans, J.H., Murray, D., Leslie, C.C., and Falke, J.J. (2006) Specific translocation of protein kinase C α to the plasma membrane requires both Ca²⁺ and PIP₂ recognition by its C2 domain. *Mol Biol Cell* 17: 56-66.
88. Stahelin, R.V., Rafter, J.D., Das, S., and Cho, W. (2003) The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C- α and group IVa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 278: 12452-12460.
89. Xu, G.Y., McDonagh, T., Yu, H.A., Nalefski, E.A., Clark, J.D., and Cumming, D.A. (1998) Solution structure and membrane interactions of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2. *J Mol Biol* 280: 485-500.
90. Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J.D., Seehra, J., and Somers, W.S. (1999) Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* 97: 349-360.
91. Schrag, J.D. and Cygler, M. (1997) Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods Enzymol* 284: 85-107.
92. Pickard, R.T., Chiou, X.G., Striffler, B.A., DeFelippis, M.R., Hyslop, P.A., Tebbe, A.L., Yee, Y.K., Reynolds, L.J., Dennis, E.A., Kramer, R.M., and Sharp, J.D. (1996) Identification of essential residues for the catalytic function of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine, and arginine. *J Biol Chem* 271: 19225-19231.
93. Hanel, A.M., Schuttel, S., and Gelb, M.H. (1993) Processive interfacial catalysis by mammalian 85-kilodalton phospholipase A2 enzymes on product-containing vesicles: application to the determination of substrate preferences. *Biochemistry* 32: 5949-5958.
94. Clark, J.D., Schievella, A.R., Nalefski, E.A., and Lin, L.L. (1995) Cytosolic phospholipase A2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12: 83-117.
95. Sharp, J.D. and White, D.L. (1993) Cytosolic PLA2: mRNA levels and potential for transcriptional regulation. *J Lipid Mediat*, 8: 183-189.
96. Dolan-O'Keefe, M., Chow, V., Monnier, J., Visner, G.A., and Nick, H.S. (2000) Transcriptional regulation and structural organization of the human cytosolic phospholipase A(2) gene. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L649-L657.
97. Heasley, L.E., Thaler, S., Nicks, M., Price, B., Skorecki, K., and Nemenoff, R.A. (1997) Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer. *J Biol Chem* 272: 14501-14504.
98. Wang, D. and Dubois, R.N. (2006) Prostaglandins and cancer. *Gut* 55: 115-122.

99. Leslie, C.C. (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 272: 16709-16712.
100. Slepak, V.Z., Katz, A., and Simon, M.I. (1995) Functional analysis of a dominant negative mutant of G alpha i2. *J Biol Chem* 270: 4037-4041.
101. Schievella, A.R., Regier, M.K., Smith, W.L., and Lin, L.L. (1995) Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 30749-30754.
102. Corbalan-Garcia, S., Garcia-Garcia, J., Rodriguez-Alfaro, J.A., and Gomez-Fernandez, J.C. (2003) A new phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site located in the C2 domain of protein kinase C α . *J Biol Chem* 278: 4972-4980.
103. Rodriguez-Alfaro, J.A., Gomez-Fernandez, J.C., and Corbalan-Garcia, S. (2004) Role of the lysine-rich cluster of the C2 domain in the phosphatidylserine-dependent activation of PKC α . *J Mol Biol* 335: 1117-1129.
104. Borsch-Haubold, A.G., Bartoli, F., Asselin, J., Dudler, T., Kramer, R.M., Aritz-Castro, R., Watson, S.P., and Gelb, M.H. (1998) Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J Biol Chem* 273: 4449-4458.
105. Hefner, Y., Borsch-Haubold, A.G., Murakami, M., Wilde, J.I., Pasquet, S., Schieltz, D., Ghomashchi, F., Yates, J.R., 3rd, Armstrong, C.G., Paterson, A., Cohen, P., Fukunaga, R., Hunter, T., Kudo, I., Watson, S.P., and Gelb, M.H. (2000) Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *J Biol Chem*, 275: 37542-37551.
106. Kramer, R.M., Roberts, E.F., Um, S.L., Borsch-Haubold, A.G., Watson, S.P., Fisher, M.J., and Jakubowski, J.A. (1996) p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem* 271: 27723-27729.
107. Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A., and Davis, R.J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72: 269-278.
108. Muthalif, M.M., Hefner, Y., Canaan, S., Harper, J., Zhou, H., Parmentier, J.H., Aebbersold, R., Gelb, M.H., and Malik, K.U. (2001) Functional interaction of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A(2). *J Biol Chem* 276: 39653-39660.
109. Bayburt, T. and Gelb, M.H. (1997) Interfacial catalysis by human 85 kDa cytosolic phospholipase A2 on anionic vesicles in the scooting mode. *Biochemistry* 36: 3216-3331.
110. de Carvalho, M.G., Garritano, J., and Leslie, C.C. (1995) Regulation of lysophospholipase activity of the 85-kDa phospholipase A2 and activation in mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 270: 20439-20446.
111. Das, S., Rafter, J.D., Kim, K.P., Gygi, S.P., and Cho, W. (2003) Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A(2) activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 41431-41442.
112. Evans, J.H., Fergus, D.J., and Leslie, C.C. (2002) Inhibition of the MEK1/ERK pathway reduces arachidonic acid release independently of cPLA2 phosphorylation and translocation. *BMC Biochem* 3: 30.
113. Gijon, M.A., Spencer, D.M., Kaiser, A.L., and Leslie, C.C. (1999) Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Cell Biol* 145: 1219-1232.

114. Tian, W., Wijewickrama, G.T., Kim, J.H., Das, S., Tun, M.P., Gokhale, N., Jung, J.W., Kim, K.P., and Cho, W. (2008) Mechanism of Regulation of Group IVA Phospholipase A2 Activity by Ser727 Phosphorylation. *J Biol Chem* 283: 3960-3971.
115. Balsinde, J., Balboa, M. A., Li, W. H., Llopis, J., and Dennis, E. A. (2000) Cellular regulation of cytosolic group IV phospholipase A2 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Immunol* 164: 5398-5402.
116. Das, S. and Cho, W., Roles of Catalytic Domain Residues in Interfacial Binding and Activation of Group IV Cytosolic Phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 2002. 277: 23838-23846.
117. Six, D.A. and Dennis, E.A. (2003) Essential Ca(2+)-independent role of the group IVA cytosolic phospholipase A(2) C2 domain for interfacial activity. *J Biol Chem* 278: 23842-23850.
118. Leslie, C.C. and Channon, J.Y. (1990) Anionic phospholipids stimulate an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from macrophages and reduce the calcium requirement for activity. *Biochim Biophys Acta* 1045: 261-270.
119. Mosior, M., Six, D.A., and Dennis, E.A. (1998) Group IV cytosolic Phospholipase A2 binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J. Biol. Chem.* 273: 2184-2191.
120. Pettus, B.J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D.S., Maceyka, M., Leslie, C.C., Evans, J.H., Freiberg, J., Roddy, P., Hannun, Y.A., and Chalfant, C.E. (2004) Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 279: 11320-11326.
121. Subramanian, P., Vora, M., Gentile, L.B., Stahelin, R.V., and Chalfant, C.E. (2007) Anionic lipids activate group IVA cytosolic phospholipase A2 via distinct and separate mechanisms. *J Lipid Res* 48: 2701-2708.
122. Stahelin, R.V., Subramanian, P., Vora, M., Cho, W., and Chalfant, C.E. (2007) Ceramide-1-phosphate binds group IVA cytosolic phospholipase a2 via a novel site in the C2 domain. *J Biol Chem* 282: 20467-20474.
123. Subramanian, P., Stahelin, R.V., Szulc, Z., Bielawska, A., Cho, W., and Chalfant, C.E. (2005) Ceramide 1-phosphate acts as a positive allosteric activator of group IVA cytosolic phospholipase A2 alpha and enhances the interaction of the enzyme with phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 280: 17601-17607.
124. Nakatani, Y., Tanioka, T., Sunaga, S., Murakami, M., and Kudo, I. (2000) Identification of a cellular protein that functionally interacts with the C2 domain of cytosolic phospholipase A(2)alpha. *J Biol Chem* 275: 1161-1168.
125. Sheridan, A.M., Force, T., Yoon, H.J., O'Leary, E., Choukroun, G., Taheri, M.R., and Bonventre, J.V. (2001) PLIP, a novel splice variant of Tip60, interacts with group IV cytosolic phospholipase A(2), induces apoptosis, and potentiates prostaglandin production. *Mol Cell Biol* 21: 4470-4481.
126. Gaudreault, S.B., Chabot, C., Gratton, J.P., and Poirier, J. (2004) The caveolin scaffolding domain modifies 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor binding properties by inhibiting phospholipase A2 activity. *J Biol Chem* 279: 356-362.
127. Cubells, L., Vilà de Muga, S., Tebar, F., Bonventre, J.V., Balsinde, J., Pol, A., Grewal, T., and Enrich, C. (2008) Annexin A6-induced inhibition of cPLA2 is linked to CAV-1 export from the golgi. *J Biol Chem* 283: 10174-10183.
128. Alonso, F., Henson, P.M., and Leslie, C.C. (1986) A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 878: 273-280.
129. Flesch, I., Schmidt, B., and Ferber, E. (1985) Acyl chain specificity and kinetic properties of phospholipase A1 and A2 of bone marrow-derived macrophages. *Z Naturforsch* 40: 356-363.

130. Bonventre, J.V. and Sapirstein, A. (2002) Group IV cytosolic phospholipase A2 (PLA2) function: insights from the knockout mouse. *Adv Exp Med Biol* 507: 25-31.
131. Uozumi, N. and Shimizu, T. (2002) Roles for cytosolic phospholipase A2alpha as revealed by gene-targeted mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 59-69.
132. Bonventre, J.V., Huang, Z., Taheri, M.R., O'Leary, E., Li, E., Moskowitz, M.A., and Sapirstein, A. (1997) Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature* 390: 622-625.
133. Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y., Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J., and Shimizu, T. (1997) Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. *Nature*, 390: 618-22.
134. Downey, P., Sapirstein, A., O'Leary, E., Sun, T.X., Brown, D., and Bonventre, J.V. (2001) Renal concentrating defect in mice lacking group IV cytosolic phospholipase A(2). *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F607-F618.
135. Haq, S., Kilter, H., Michael, A., Tao, J., O'Leary, E., Sun, X.M., Walters, B., Bhattacharya, K., Chen, X., Cui, L., Andreucci, M., Rosenzweig, A., Guerrero, J.L., Patten, R., Liao, R., Molkentin, J., Picard, M., Bonventre, J.V., and Force, T. (2003) Deletion of cytosolic phospholipase A2 promotes striated muscle growth. *Nat Med* 9: 944-951.
136. Song, H., Lim, H., Paria, B.C., Matsumoto, H., Swift, L.L., Morrow, J., Bonventre, J.V., and Dey, S.K. (2002) Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development*, 129: 2879-2889.
137. Takaku, K., Sonoshita, M., Sasaki, N., Uozumi, N., Doi, Y., Shimizu, T. and Taketo, M.M. (2000) Suppression of intestinal polyposis in *Apc(delta 716)* knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A(2) gene. *J Biol Chem* 275: 34013-34016.
138. Bonventre, J. (2004) Cytosolic phospholipase A2alpha reigns supreme in arthritis and bone resorption. *Trends Immunol*, 225: 116-119.
139. Hegen, M., Sun, L., Uozumi, N., Kume, K., Goad, M.E., Nickerson-Nutter, C.L., Shimizu, T., and Clark, J.D. (2003) Cytosolic phospholipase A2alpha-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Exp Med*. 197: 1297-1302.
140. Klivenyi, P., Beal, M.F., Ferrante, R.J., Andreassen, O.A., Wermer, M., Chin, M.R., and Bonventre, J.V. (1998) Mice deficient in group IV cytosolic phospholipase A2 are resistant to MPTP neurotoxicity. *J Neurochem*. 71: 2634-2637.
141. Marusic, S., Leach, M.W., Pelker, J.W., Azoitei, M.L., Uozumi, N., Cui, J., Shen, M.W., DeClercq, C.M., Miyashiro, J.S., Carito, B.A., Thakker, P., Simmons, D.L., Leonard, J.P., Shimizu, T., and Clark, J.D. (2005) Cytosolic phospholipase A2 alpha-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 202: 841-851.
142. Miyaura, C., Inada, M., Matsumoto, C., Ohshiba, T., Uozumi, N., Shimizu, T., and Ito, A. (2003) An essential role of cytosolic phospholipase A2alpha in prostaglandin E2-mediated bone resorption associated with inflammation. *J Exp Med* 197: 1303-1310.
143. Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kita, Y., Yamamoto, H., Ohga, E., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2002) A pivotal role of cytosolic phospholipase A(2) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Nat Med*. 8: 480-484.
144. Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kume, K., Izumi, T., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2000) Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A2. *Nat Immunol*. 1: 42-46.
145. Oikawa, Y., Yamato, E., Tashiro, F., Yamamoto, M., Uozumi, N., Shimada, A., Shimizu, T., and Miyazaki, J. (2005)

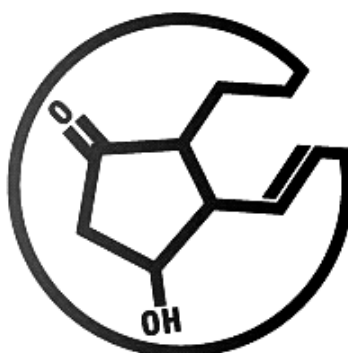
Protective role for cytosolic phospholipase A2alpha in autoimmune diabetes of mice. *FEBS Lett* 579: 3975-3978.

146. Hong, K.H., Bonventre, J.C., O'Leary, E., Bonventre, J.V., and Lander, E.S. (2001) Deletion of cytosolic phospholipase A(2) suppresses Apc(Min)-induced tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3935-3939.
147. Ilsley, J.N., Nakanishi, M., Flynn, C., Belinsky, G.S., De Guise, S., Adib, J.N., Dobrowsky, R.T., Bonventre, J.V., and Rosenberg, D.W. (2005) Cytoplasmic phospholipase A2 deletion enhances colon tumorigenesis. *Cancer Res* 65: 2636-2643.
148. Jayadev, S., Linardic, C.M., and Hannun, Y.A., Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem.* 269: 5757-5763.
149. Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (1995) Ceramide: a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. *J Cell Biochem.* 58: 191-198.
150. Wolf, L.A. and Laster, S.M. (1999) Characterization of arachidonic acid-induced apoptosis. *Cell Biochem Biophys* 30: 353-368.
151. Tommasini, I., Sestili, P., Guidarelli, A., and Cantoni, O. (2002) Peroxynitrite stimulates the activity of cytosolic phospholipase A2 in U937 cells: the extent of arachidonic acid formation regulates the balance between cell survival or death. *Cell Death Differ.* 9: 1368-1376.
152. Levy, R. (2006) The role of cytosolic phospholipase A2-alfa in regulation of phagocytic functions. *Biochim Biophys Acta*, 1761: 1323-1334.
153. Shmelzer, Z., Haddad, N., Admon, E., Pessach, I., Leto, T.L., Eitan-Hazan, Z., Hershinkel, M., and Levy, R. (2003) Unique targeting of cytosolic phospholipase A2 to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes. *J Cell Biol* 162: 683-692.
154. Diez E, Balsinde, J., Aracil, M., and Schüller, A. (1987) Ethanol induces release of arachidonic acid but not synthesis of eicosanoids in mouse peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 921: 82-89.
155. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
156. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
157. Balsinde, J., Diez, E., and Mollinedo, F. (1988) Phosphatidylinositol-specific phospholipase D: a pathway for generation of a second messenger. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 502-508.
158. Larsen, E.C., DiGennaro, J.A., Saito, N., Mehta, S., Loegering, D.J., Mazurkiewicz, J.E., and Lennartz, M.R. (2000) Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J Immunol.* 165: 2809-2817.
159. Bratton, D.L., Dreyer, E., Kailey, J.M., Fadok, V.A., Clay, K.L., and Henson, P.M. (1992) The mechanism of internalization of platelet-activating factor in activated human neutrophils. Enhanced transbilayer movement across the plasma membrane. *J Immunol.* 148: 514-523.
160. Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M., and Green, D.R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182: 1545-1556.

161. Tait, J.F., Gibson, D., and Fujikawa, K. (1989) Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J Biol Chem.* 264: 7944-7949.
162. Roehrig, S., Tabbert, A., and Ferrando-May, E. (2003) In vitro measurement of nuclear permeability changes in apoptosis. *Anal Biochem* 318: 244-253.
163. Balsinde, J. and Dennis, E.A. (1996) Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A2 enzymes present in P388D1 macrophages. *J Biol Chem* 271: 6758-6765.
164. Babcock, D.F., Herrington, J., Goodwin, P.C., Park, Y.B., and Hille, B. (1997) Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *J Cell Biol* 136: 833-844.
165. Scaduto, R.C., Jr. and Grotyohann, L.W. (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J.* 76: 469-477.
166. Ozaki, S., DeWald, D.B., Shope, J.C., Chen, J., and Prestwich, G.D. (2000) Intracellular delivery of phosphoinositides and inositol phosphates using polyamine carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 11286-22291.
167. Swanson, J.A. and Hoppe, A.D. (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 76: 1093-1103.
168. Varnai, P., Rother, K.I., and Balla, T. (1999) Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. *J Biol Chem.* 274: 10983-10989.
169. Swanson, J.A., Johnson, M.T., Beningo, K., Post, P., Mooseker, M., and Araki, N. (1999) A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J Cell Sci* 112: 307-316.
170. Cox, D., Tseng, C.C., Bjekic, G., and Greenberg, S. (1999) A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem* 274: 1240-1247.
171. Zackova, M., Skobisova, E., Urbankova, E., and Jezek, P. (2003) Activating omega-6 polyunsaturated fatty acids and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J Biol Chem* 278: 20761-20769.
172. Wojtczak, L. and Wieckowski, M.R. (1999) The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 31: 447-455.
173. Catisti, R. and Vercesi, A.E. (1999) The participation of pyridine nucleotides redox state and reactive oxygen in the fatty acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 464: 97-101.
174. Penzo, D., Petronilli, V., Angelin, A., Cusan, C., Colonna, R., Scorrano, L., Pagano, F., Prato, M., Di Lisa, F., and Bernardi, P. (2004) Arachidonic acid released by phospholipase A(2) activation triggers Ca(2+)-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 279: 25219-25225.
175. Wissing, D., Mouritzen, H., Egeblad, M., Poirier, G.G., and Jaattela, M. (1997) Involvement of caspase-dependent activation of cytosolic phospholipase A2 in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 5073-4077.
176. Gwag, B.J., Canzoniero, L.M., Sensi, S.L., Demaro, J.A., Koh, J.Y., Goldberg M.P., Jacquin, M., and Choi, D.W. (1997) Calcium ionophores can induce either apoptosis or necrosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience* 90: 1339-1348.
177. Takadera, T. and Ohyashiki, T. (1997) Apoptotic cell death and caspase 3 (CPP32) activation induced by calcium ionophore at low concentrations and their prevention by nerve growth factor in PC12 cells. *Eur J Biochem* 249: 8-12.

178. Jambriña, E., Alonso, R., Alcalde, M., del Carmen Rodríguez, M., Serrano, A., Martínez, A.C., García-Sancho, J., and Izquierdo, M. (2003) Calcium influx through receptor-operated channel induces mitochondria-triggered paraptotic cell death. *J Biol Chem* 278: 14134-14145.
179. Kronke, M. and Adam-Klages, S. (2002) Role of caspases in TNF-mediated regulation of cPLA(2). *FEBS Lett*, 2002. 531: 18-22.
180. Cummings, B.S., McHowat, J., and Schnellmann, R.G. (2000) Phospholipase A(2)s in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 793-799.
181. Allal, C., Buisson-Brenac, C., Marion, V., Claudel-Renard, C., Faraut, T., Dal Monte, P., Streblow, D., Record, M., and Davignon, J.L. (2004) Human cytomegalovirus carries a cell-derived phospholipase A2 required for infectivity. *J Virol* 78: 7717-7726.
182. Fortunato, E.A., McElroy, A.K., Sanchez, I., and Spector, D.H. (2000) Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* 8: 111-119.
183. Girod, A., Wobus, C.E., Zadori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J.A., and Hallek, M. (2002) The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* 83: 973-978.
184. Girotti, M., Evans, J.H., Burke, D., and Leslie, C.C. (2004) Cytosolic phospholipase A2 translocates to forming phagosomes during phagocytosis of zymosan in macrophages. *J Biol Chem* 279: 19113-19121.
185. Yeung, T., Ozdamar, B., Paroutis, P., and Grinstein, S. (2006) Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 18: 429-437.
186. Balestrieri, B., Hsu, V.W., Gilbert, H., Leslie, C.C., Han, W.K., Bonventre, J.V., and Arm, J.P. (2006) Group V secretory phospholipase A2 translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. *J Biol Chem*, 2006. 281: 6691-6698.
187. Suram, S., Brown, G.D., Ghosh, M., Gordon, S., Loper, R., Taylor, P.R., Akira, S., Uematsu, S., Williams, D.L., and Leslie, C.C. (2006) Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. *J Biol Chem* 281: 5506-5514.
188. Seleznev, K., Zhao, C., Zhang, X.H., Song, K., and Ma, Z.A. (2006) Calcium-independent phospholipase A2 localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine. *J Biol Chem* 281: 22275-22288.
189. Darios, F., Connell, E., and Davletov, B. (2007) Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J Physiol* 585: 699-704.
190. Casas, J., Gijón, M. A., Vigo, A. G., Crespo, M. S., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2006) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A2 to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells. *Mol Biol Cell* 17: 155-162.277.
191. Casas, J., Gijón, M. A., Vigo, A. G., Crespo, M. S., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2006) Overexpression of cytosolic group IVA phospholipase A2 protects cells from calcium-dependent death. *J Biol Chem* 281: 6106-6116.
192. Ruipérez, V., Casas, J., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2007) Group V phospholipase A2-derived lysophosphatidylcholine mediates cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol* 179: 631-638.

193. Gubern, A., Casas, J., Barceló-Torns, M., Barneda, D., de la Rosa, X., Masgrau, R., Picatoste, F., Balsinde, J., Balboa, M. A., and Claro, E. (2008) Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J Biol Chem* 283: 27369–27382.
194. Gubern, A., Barceló-Torns, M., Casas, J., Barneda, D., Masgrau, R., Picatoste, F., Balsinde, J., Balboa, M. A., and Claro, E. (2009) Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A2. *J Biol Chem* 284: 5697–5708.
195. Casas, J., Meana, C., Esquinas, E., Valdearcos, M., Pindado, J., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2009) Requirement of JNK-mediated phosphorylation for translocation of group IVA phospholipase A2 to phagosomes in human macrophages. *J Immunol* 183: 2767-2774.
196. Casas, J., Valdearcos, M., Pindado, J., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2010) The cationic cluster of group IVA phospholipase A2 (Lys488/Lys541/Lys543/Lys544) is involved in translocation of the enzyme to phagosomes in human macrophages. *J Lipid Res* 51: 388-399.



**THE EICOSANOID
RESEARCH DIVISION**
VALLADOLID