Regulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible por receptores de RNA de doble cadena en macrófagos

José Pindado Rodríguez

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

October 21, 2009

Los organismos pluricelulares han desarrollado complejos sistemas de defensa frente a micro-organismos patógenos que podrían parasitarlos o matarlos. Estos sistemas son efectivos en tanto que las infecciones sostenidas o severas son poco frecuentes, pero son imperfectos ya que a veces suceden episodios infecciosos graves, e incluso la propia respuesta inmune puede dañar al huésped.

La inmunidad innata es la más universal, la primera en actuar y, de alguna manera, el tipo de inmunidad más importante. La mayoría de los organismos sobrevive gracias a los mecanismos de la inmunidad innata y sólo los organismos vertebrados han desarrollado sistemas alternativos, colectivamente llamados inmunidad adaptativa, para el reconocimiento y la eliminación de los patógenos [1].

Por tanto, la inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a los microorganismos. En una primera fase de reconocimiento, la inmunidad innata hace uso de una serie de Receptores de Reconocimiento de Patrones o RRPs que están presentes antes incluso del primer contacto con el microorganismo invasor. Entre las células del sistema inmune que expresan estos RRPs se pueden citar los macrófagos, las células dendríticas, los mastocitos, los neutrófilos, los eosinófilos y las células NK, aunque el espectro de expresión de ciertos receptores puede incluir las células del sistema inmune adaptativo como los linfocitos B y T, así como las células no inmunes como los fibroblastos y las células epiteliales.

Los RRPs, a diferencia de los receptores de la inmunidad adaptativa, están codificados en su configuración definitiva en la línea germinal y reconocen estructuras que son características de los microorganismos patogénicos y que no están presentes en las células del huésped. Estas estructuras suelen desempeñar una función vital para el microorganismo y, por lo tanto, son complicadas de alterar por parte de los mismos. A su vez, muchas de ellas presentan una estructura espacial repetitiva por lo que se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos o PMAPs.

Diferentes RRPs reconocen distintos PMAPs, muestran distintos perfiles de expresión génica, activan rutas de señalización especificas y conducen a diferentes respuestas antipatogénicas. Desde el punto de vista estructural se pueden clasificar a los RRPs en diversas familias: los receptores tipo Toll, los receptores con dominio de lectinas tipo C, los receptores tipo Nod y los receptores tipo RIG-I.

1.1. Receptores tipo Toll – Una de las más importantes y descubiertas a lo largo de los últimos años es la familia de los receptores tipo Toll o TLRs (del acrónimo ingles Toll-Like Receptors). Deben su nombre a que el primer miembro

descrito fue la proteína Toll de Drosophila melanoganster implicada en el desarrollo del eje dorso-ventral del embrión del insecto [2]. Poco después se describió su función en la resistencia de Drosophila a infecciones fúngicas [3, 4].

Todos los miembros de los TLRs comparten similitudes estructurales, así pues son todos glicoproteínas integrales de membrana de tipo I, en la que se pueden distinguir un dominio extracelular que contiene varios motivos conocidos como repeticiones ricas en leucina, que son los encargados del reconocimiento del ligando, y un dominio citoplasmático responsable de la señalización hacia el interior celular denominado TIR (dominio homologo Toll/IL-1R) por su homología con el receptor de la interleuquina I.

La expresión de los distintos TLRs depende del tipo celular considerado y su nivel basal es rápidamente modificado por citoquinas, estrés en el entorno celular y sobre todo, por contacto con su ligando correspondiente durante una infección.

El rango de ligandos que cubren los TLRs incluyen moléculas lipídicas (por ejemplo el ácido lipoteicoico), azúcares (como el peptidoglicano), proteínas (como la flagelina) y ácidos nucleicos (como el dinucleótido CpG no metilado del DNA de las bacterias). Así mismo están representados los diferentes grupos de patógenos: bacterias, hongos, parásitos y virus. Los distintos TLRs con sus ligandos más representativos están resumidos en la tabla de la Figura 1.

1.1. Receptores con dominio de lectinas tipo C

Los receptores con dominio de lectinas tipo C o CLRs engloban a una extensa familia de proteínas encontradas casi exclusivamente dentro del reino animal. Están altamente conservadas dentro de los vertebrados pero presentan una alta diversidad estructural entre los invertebrados. Todas ellas pertenecen a un grupo más amplio de moléculas de unión a carbohidratos conocidas colectivamente como lectinas.

La marca estructural definitoria de los CLRs es la presencia del dominio de lectinas tipo C, descrito inicialmente como el plegamiento proteico dentro del dominio de reconocimiento a carbohidratos de la lectina de unión a manosa. Entre los mejor estudiados y conocidos se encuentran el receptor de manosa, dectina-1, dectina-2 y DC-SIGN.

La mayoría de estos receptores son incapaces por si solos de inducir expresión génica tras la unión a su correspondiente ligando, más bien parecen trabajar sinérgicamente con otras familias de PRRs como los TLRs, modulando su señalización.

Solo en el caso de Dectina-1 se ha demostrado inequívocamente que su acoplamiento al zymosan de Saccharomyces cerevisiae produce la inducción de genes de respuesta innata como interleuquina-2, interleuquina-6 , interleuquina-10 y TNF-α. Esta señalización la lleva a cabo a través de su único dominio ITAM (acrónimo del inglés inmunoreceptor tyrosine-based activation motifs) y la interacción de éste con la kinasa Syk.

1.3. Receptores tipo NOD

La familia de receptores tipo Nod o NLRs de mamíferos está constituida por más de 20 miembros. Se trata de proteínas intracelulares con una organización por dominios modulares de modo que todos los NLRs poseen un único dominio de unión a nucleótidos llamado NACHT, que está localizado en el centro de la molécula entre un dominio N terminal de interacción con proteínas y un dominio C terminal de repeticiones ricas en leucinas o LRR. Adicionalmente

pueden poseer otros dominios funcionales, como NAD y FIIND. Los dominios de interacción de proteínas pueden ser un dominio CARD (dominio de reclutamiento y activación de caspasas), un dominio Bir (repetición de "inhibición de apoptosis" de baculovirus) o un dominio PYR (dominio de pirina). El dominio LRR, a semejanza del encontrado en los TLRs, es el encargado de la interacción con el ligando correspondiente.

Diferentes estudios llevaron a identificar al primer miembro de la familia denominado Nod1 como el sensor responsable de activar la respuesta dependiente de NF-κB frente a la bacteria intracelular Shigella flexneri [5]. El ligando especifico de Nod1 es el acido meso-diaminopimélico del peptidoglicano de la pared bacteriana [6], mientras el segundo miembro en ser descrito, Nod2, detecta el muramil dipéptido del peptidoglicano [7].

Además de las proteínas Nod, otros miembros de la familia de los NLRs como NALP3, Ipaf y Naip son sensores intracelulares que tras su activación van a formar (junto proteínas adaptadoras como ASC y CARDINAL) complejos moleculares denominados inflamasomas. Estos inflamasomas son capaces de procesar la interleuquina-1β, interleuquina-18 e interleuquina-33 hasta su forma activa. Los inflamasomas son capaces de activarse no solamente por unión a PAMPs, sino que también detectan las denominadas señales de peligro endógenas presentes en células dañadas del propio organismo. Entre estas moléculas se encuentran el ATP (adenosín trifosfato), el MSU (ácido úrico monosódico) o el CPPD (pirofosfato de calcio dihidratado).

1.4. Receptores tipo RIG-1

Tres genes codifican para los receptores tipo RIG-I o RLRs en los genomas humano y murino. Sus productos son tres proteínas citoplasmáticas que se llaman RIG-I (gen inducible de ácido retinoico I, y que da nombre a la familia), MDA-5 (antígeno asociado a la diferenciación del melanoma 5) y LGP2.

Las tres proteínas contienen un dominio helicasa de la familia DExD/H box en el centro de la molécula, responsable de su interacción con el RNA de doble cadena. Tanto RIG-I como MDA-5 poseen en el extremo N terminal dos dominios CARD con capacidad de interacción homotípica con otros CARD de diferentes moléculas y encargados de la transmisión de la señal. La respuesta final englobará la activación de la expresión de interferones y citoquinas proinflamatorias a través de la activación de factores de transcripción como NFκB, IRF-3 (factor de regulación de Interferón 3) e IRF-7 [8-10].

Interesantemente el tercer miembro de la familia, LGP2, no posee estos dominios CARD señalizadores por lo que se ha propuesto para esta molécula un papel de regulador negativo, al ser capaz de unirse al ligando pero incapaz de transmitir la señal hacia el interior celular [11, 12].

1.5. Receptores virales de RNA de doble cadena

El RNA de doble cadena o dsRNA (acrónimo del inglés double strand ribonucleic acid) es una molécula que o bien constituye el material genético de ciertos virus o aparece como intermediario durante el ciclo de replicación de otros. Incluso en virus cuyo material genético es DNA de doble cadena también puede aparecer moléculas de dsRNA. Esto es debido a la compactación de los genomas víricos donde es frecuente que las dos hebras del DNA tengan capacidad codificante y se produzca una transcripción simultanea de estas regiones dando lugar a moléculas de dsRNA.

Por lo tanto es lógico pensar que la evolución haya dotado a los organismos de distintos sensores para esta molécula presente en un conjunto de patógenos tan importante como los virus. En un primer grupo de estos sensores se podrían citar varias enzimas con actividad antivírica como la proteína quinasa R (PKR), la 2´,5´- oligoadenilato sintetasa (OAS) y la adenosina desaminasa dependiente de RNA (ADAR).

Si bien estas enzimas podrían englobarse dentro de los PRRs, este termino se reserva para los receptores que van a tener una capacidad directa de modificar el transcriptoma de la célula llevando a la producción de ciertas citoquinas pro-inflamatorias (interleuquina 6, interleuquina 12 y factor de necrosis tumoral), quimioquinas que coordinan la inmunidad innata y adaptativa y sobre todo los interferones de tipo I (interferón α y β), que en conjunto constituyen la marca de una respuesta antivírica [13]. La búsqueda de estos receptores en años recientes desembocó en la descripción del TLR3 y de los receptores tipo RIG-I. Es importante mencionar que tanto las enzimas con actividades antivíricas como el TLR3 y los RLRs son todos productos de genes inducibles por interferones.

La proteína quinasa R o PKR es una serina/treonina quinasa que se autofosforila y activa tras la unión a RNA de doble cadena. Una vez activada la PKR va a fosforilar una serie de sustratos de los cuales el mas relevante es el factor de iniciación de la traducción de eucariotas eIF2α inactivándolo de esta manera y conduciendo a una bloqueo de la síntesis proteica tanto celular como viral [14] .

Otra actividad enzimática antiviral disparada tras la detección del RNA de doble cadena vírico es llevada a cabo por la 2´,5´- oligoadenilato sintetasa. Esta enzima cataliza una reacción cuyo producto es el 2´,5´oligoadenilato, un nucleótido inusual que actúa como segundo mensajero y que activa la RNasa L, que destruye tanto el RNA viral, impidiendo la replicación de las partículas víricas, como el RNA celular, llevando a la parada de la síntesis proteica y conduciendo a las células a una muerte celular programada o apoptosis.

La enzima desaminasa de adenosina específica de RNA (ADAR) cataliza la modificación covalente de sustratos de RNA mediante la desaminación de la adenosina para producir inosina. La transición resultante (A a I) desestabiliza la doble hebra de RNA ya que el par inosina-uracilo es menos estable que el par original adenosina-uracilo. Además la maquinaria de transcripción y de traducción tiende a reconocer la inosina como guanina conduciendo a cambios en la secuencia aminoacídica final [15]. Una vez más, tanto RNAs virales como celulares son objeto de esta importante edición con consecuencias parecidas a las producidas por la 2´,5´-oligoadenilato sintetasa.

1.5.1. Toll-like Receptor 3

El TLR3 fue originalmente identificado como receptor de dsRNA por su habilidad para mediar respuestas a Poly I-C, un análogo sintético del dsRNA, que incluían la activación del factor de transcripción NF-κB y la expresión de las citoquinas proinflamatorias como interleuquina-6, interleuquina-12 y TNF-α [16]. Además, poco tiempo después, se describió un anticuerpo contra TLR3 que bloqueaba esta señal inducida por Poly I-C [17].

El TLR3 ha sido también implicado en el reconocimiento de dsRNA producido durante el curso de la replicación de reovirus, el virus respiratorio sincitial, el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el citomegalovirus murino (MCMV), el virus de la coriomeningitis linfocítica y el West Nile virus (WNV) [18].

El RNA mensajero de TLR3 humano ha sido detectado en placenta, páncreas, pulmón, hígado, corazón y cerebro. Dentro del sistema inmune el TLR3 no se detecta en leucocitos polimorfonucleares ni en linfocitos T y B [19]. Para células NK hay cierta controversia ya que se han reportado datos contradictorios, desde su no expresión [19], hasta su

relevancia en respuesta antiviral por parte de estas células [20]. El TLR3 se expresa en células dendríticas mieloides humanas también llamadas convencionales (cDCs), especialmente células dendríticas derivadas de monocitos y células dendríticas de la sangre CD11 positivas. Sin embargo, no se expresa en las células dendríticas plasmacitoides, donde la alta producción de interferones de tipo I (sobre todo INF-α) parece ser dependiente de TLR7 y TLR9. En monocitos y macrófagos humanos no parece que el TLR3 tenga una expresión y por tanto una función relevante lo que se diferencia de los monocitos y macrófagos murinos donde la expresión es considerable así como en líneas celulares murinas macrofágicas como RAW 264.7.

El TLR3 está localizado en la membrana de vesículas intracelulares (de endosomas tempranos) de cDCs, mientras que en células epiteliales y en fibroblastos aparece tanto en la superficie celular (membrana plasmática) como en vesículas intracelulares [21]. Esta localización intracelular le permite detectar dsRNA de virus que usan la ruta endocítica en su camino de entrada a la célula o virus que se incluyen en estos compartimentos, después de completar su ciclo de replicación, para liberarse al exterior celular [22].

Desde el punto de vista estructural el TLR3 es una proteína transmembrana con un dominio TIR localizado en el interior celular (citosólico) y un ectodominio extracelular (intraendosomal) altamente glicosilado encargado de la unión al dsRNA. Estas modificaciones post-traduccionales son en su mayoría N-glicosilaciones y se han señalado las que ocurren en las asparraginas en posición 247 y 413 del TLR3 humano como claves para la transmisión de la señal del receptor. Mutaciones de estas asparraginas en alaninas, que evitan la N-glicosilación, afectan a la expresión y localización del receptor [23].

El estudio de la estructura cristalina del ectodominio, revelada mediante difracción de rayos X, muestra una disposición solenoide en forma de herradura donde se encuentran las repeticiones ricas en leucina (LRR) características de los TLR. Cada uno de estas 23 LRR constituyen una vuelta en el solenoide. A lo largo de toda la estructura se encuentran las N-glicosilaciones (bastantes más abundantes que en otros TLRs) excepto en una superficie lateral de la cara cóncava, que es exactamente la zona de unión al ligando. En concreto dos residuos, la histidina 539 y la asparragina 541, son los encargados de interaccionar con dsRNA (el grupo amida de la asparragina interacciona con el hidroxilo del enlace fosfodiester, o con el hidroxilo de la posición 2´ de la ribosa, y la carga positiva de la histidina con la carga negativa del dsRNA) [24]. Recientemente se ha descrito otro punto de unión al ligando que permitiría al TLR3 distinguir ácidos nucleicos en la conformación A o B [25]. El modelo propuesto para la unión receptor ligando esta representado en la figura 4.

TRIF es la proteína adaptadora crítica que media la señalización del TLR3. El resto de TLRs requieren de la proteína MyD88 y únicamente para el TLR4 se ha descrito que es capaz de utilizar ambas rutas. La dependencia de TRIF en la señalización por TLR3 es total puesto que, en ratones deficientes genéticamente en esta proteína, la posterior activación de IRF3 y la expresión de IFN-β está perdida por completo [26]. La interacción entre el TLR3 y TRIF se produce entre los dominios TIR de ambas proteínas. A continuación TRIF recluta distintas proteínas adaptadoras de la familia TRAF (acrónimo de TNF receptor associated factor). En concreto, TRAF6 se une a TRIF, lo que a su vez produce un reclutamiento de una serie de proteínas kinasas (TAB2, TAK1 y PKR) que producirán la activación del heterodimero relA(p65)/p50 (la “forma rápida” de NF-κB) , a través del complejo IKK y las MAP kinasas [27, 28]. Por otro lado, TRAF3 ha sido implicada en la activación de los otros factores de transcripción claves en la respuesta antiviral, IRF3 e IRF7. Así mismo, la expresión de interleuquina-10 es totalmente dependiente de TRAF3 [29, 30]. Estudios bioquímicos han demostrado que TRAF3 se asocia con la PKR y también con un grupo distinto de proteínas kinasas (IKKε, TBK1, TANK, NAP-1), aunque no está claro los mecanismos moleculares que guían esta interacción.

La acción del complejo resultante concluye con la fosforilación y activación de IRF3 e IRF7, que induce la expresión de los interferones de tipo I.

1.5.2. RIG-1 y MDA-5

El “gen inducible por acido retinoico 1” RIG-I (acrónimo del inglés retinoic acid-inducible gen 1), también conocido como DDX58, fue identificado como candidato a ser un detector citosólico del RNA viral hace apenas cinco años [31]. A su vez el “gen asociado a la diferenciación del melanoma 5” MDA-5 fue reconocido como receptor de dsRNA e inductor de una respuesta innata frente a infecciones víricas [32, 33]. Estudios con ratones en los que específicamente se había eliminado el gen de RIG-I (ratones “knock out”) o el gen de MDA-5 sirvieron para descubrir las distintas especificidades de ambos receptores en el reconocimiento de los virus [34-37]. De esta manera, RIG-I es el sensor principal encargado de disparar la respuesta antiviral para los siguientes virus: el virus Sendai (familia de los paramyxovirus), el virus del dengue y el virus de la encefalitis japonesa (flavivirus), el virus de la estomatitis vesicular VSV (rhabdovirus) y el virus de la hepatitis C (hepadnavirus).

El virus de la influenza y el virus West Nile interactúan con ambos RIG-I y MDA-5. Mientras que el grupo de los picornavirus, cuyo modelo típico es el virus de la encefalomiocarditis murina (ECMV), y los norovirus son detectados de manera exclusiva por MDA5 [34, 38].

Así mismo el principal receptor citosólico del análogo sintético del dsRNA, el Poly I-C, es MDA-5 [34]. Hecho corroborado por el hallazgo de manera simultanea e independiente de que el ligando especifico para RIG-I son las moléculas de RNA que portan un grupo trifosfato en su extremo 5´ [39, 40], exclusivas de los RNA virales. De este modo, el sistema inmune posee una herramienta para discriminar los RNA procedentes de patógenos de los suyos propios. El citoplasma de la célula huésped está completamente llena de distintos RNAs propios. Los RNAs mensajeros sufren en su extremo 5´ una modificación post-transcripcional donde se añade una 7-metil guanosina (denominada caperuza en 5´o 5´Cap en inglés), los RNA de transferencia experimentan rupturas y modificaciones en las bases nucleotídicas del extremo 5´ y los transcritos primarios del RNA ribosómico se unen rápidamente con proteínas ribosómicas para formar las ribonucleopartículas que conllevan su consiguiente proceso de maduración. Así pues, los RNAs celulares se enmascaran para el reconocimiento por parte de RIG-I. Curiosamente los picornavirus utilizan una estrategia similar, ya que usan una proteína denominada VPg como “primer” o cebador para la síntesis de sus cadenas de RNA previniendo de este modo la formación de extremos con un trifosfato en 5´. No sorprende entonces que estos virus sean detectados por MDA-5. El Poly I-C no posee este grupo trifosfato y por lo tanto no es susceptible de ser detectado in vivo por RIG-I.

El ligando especifico de MDA-5 aun no ha sido identificado, aunque parece apuntarse que este receptor distinguiría, entre otros motivos estructurales, RNAs de longitud mayor que los que reconocería RIG-I [41].

La estructura de la proteína MDA-5 está relacionada con RIG-I con una similitud aminoacídica del 23% en el dominio CARD y un 35% en el dominio helicasa, pero en el extremo C terminal de RIG-I existe un dominio denominado dominio regulador o dominio represor en el que se ha detectado una lisina conservada entre diferentes especies. Esta lisina, localizada mediante mutagénesis guiada por estructura, está situada en el fondo de un surco cargado positivamente y es la encargada del reconocimiento del motivo 5´ trifosfato de los RNAs [42]. Interesantemente, en esa posición LGP2 contiene una prolina mientras que MDA-5 posee una treonina o una isoleucina, dependiendo de la especie, cambios que incapacitan a ambas para interaccionar con alguna carga negativa presentes en los RNAs con un 5´ trifosfato .

La sobreexpresión de los dominios CARD de RIG-I o de MDA-5 es suficiente por si sola para activar constitutivamente IRF3, NF-κB y la subsecuente expresión de INF-β, evidencia que deja clara su implicación en la señalización [31]. Además el domino RD (del inglés repressor domain) de RIG-I actúa como represor manteniendo a RIG-I en la forma inactivada en la ausencia de una señal de activación. Una vez que las células están infectadas con virus, el RNA viral es reconocido por el dominio helicasa de RIG-I, lo que induce un cambio conformacional del receptor que conlleva la liberación del dominio CARD del dominio represor y permite el comienzo de la transducción de señales [43].

La proteína adaptadora tanto para RIG-I y MDA-5 es IPS-1 (también llamada VISA, Cardif y MAVS) descubierta y descrita simultáneamente en el año 2005 [44-47]. Una de las principales características de esta molécula, aparte de poseer dominios CARD con los que interacciona con RIG-I y MDA-5, es su localización, anclada en la membrana exterior de la mitocondria. Esta situación es crucial para su función, además de sugerir un papel nuevo para la mitocondria en la respuesta innata celular.

Se ha descrito, al igual que con TLR3, la interacción de IPS-1 con diferentes miembros de la familia de proteínas adaptadoras TRAF mediante sus múltiples dominios TIM (acrónimo del inglés TRAF-interacting motif) , en particular con TRAF3 [48] y TRAF6 [47]. De este modo, TRAF3 es reclutado en un complejo señalizador con las proteínas TRADD, FADD , RIP1 y TANK, llevando a la activación de los factores de transcripción tales como NF-κB e IRF3. Además este complejo puede activar la apoptosis de células infectadas a través de los dominios de muerte DD (acrónimo del inglés Death Domain) de las proteínas TRADD, RIP1 y FADD y del dominio efector de muerte DED (acrónimo del inglés Death Effector Domain) de FADD que en último caso activa las caspasas iniciadoras 8 y 10 [49]. Por otro lado, TRAF3 activaría la misma ruta descrita para TLR3 que implicaría la activación de IRF3 a través de IKKε y TBK1 [50, 51]. Por su parte el papel de TRAF6 es mas controvertido. Uno de los grupos que describió IPS-1 observaron que en ausencia de TRAF6, IPS-1 era incapaz de activar promotores dependientes de NF-κB [47]. También es necesaria para activar correctamente las MAPK, en concreto MEKK1 [52]. Sin embargo, Seth y sus colaboradores han descrito que la activación endógena del gen que codifica para el interferón-β ocurre normalmente en células que pierden TRAF6 e incluso IPS-1 es capaz de inducir interferón-β aun cuando ha perdido el dominio de unión a TRAF6 [46].

1.6. Metabolismo oxidativo del ácido araquidónico: eicosanoides

La respuesta inflamatoria es un conjunto de mecanismos desencadenados tras una infección dirigidos a eliminarla y a reparar el posible daño tisular generado. Uno de los primeros pasos en la reacción inflamatoria constituye la activación y localización de las células del sistema inmune innato en el foco infeccioso. Durante este proceso estas células activan su capacidad fagocítica, regulan su expresión génica produciendo citoquinas, quimioquinas y enzimas antimicrobianas y generan mediadores lipídicos bioactivos. Con este nombre se incluyen fosfolípidos como el factor activador de plaquetas PAF (acrónimo del inglés platelet activation factor), lisofosfolipidos con el ácido lisofosfatídico (LPA) y productos del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico.

El ácido araquidónico es un ácido graso con cuatro insaturaciones (ácido 5, 8, 11, 14- eicosatetranoico) que normalmente se encuentra esterificado en la posición sn-2 de los fosfolípidos de membranas celulares y que es hidrolizado por fosfolipasas de tipo A2 . Una vez libre el ácido araquidónico sirve como sustrato para una serie de enzimas que producirán una serie de metabolitos que en conjunto se conocen como eicosanoides [53] y que se pueden clasificar en: prostanoides, como las prostaglandinas y el tromboxano, producidos por la actividad enzimática de las

cicloxigenasas; leucotrienos y lipoxinas, generados por la acción de las lipoxigenasas. Las lipoxinas junto con otras familias de mediadores como las resolvinas y protectinas (derivados de los principales ácidos grasos ω–3, el ácido eicosapentanoico o EPA y el ácido docosahexaenoico o DHA) constituyen moléculas con actividad anti-inflamatoria y que promueven la resolución de la inflamación, protegiendo los tejidos de daños colaterales frente a una respuesta sostenida y exacerbada y permitiendo el regreso al estado basal homeostático [54].

La prostaglandina H2 (PGH2) es producida por las dos isoformas de COX (COX-1 y COX-2) y es el sustrato común para una serie de sintasas que producen prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina F2α (PGF2α), prostaglandina I2 (PGI2) y tromboxano A2 (TXA2). Es la expresión diferencial de estas enzimas dentro de las células presentes en los sitios de inflamación la que determinara el perfil de producción de prostanoides. Por ejemplo, los mastocitos generan predominantemente PGD2, mientras que los macrófagos producen, en adición a PGD2, PGE2 y TXA2. Además ocurren alteraciones en la síntesis de prostanoides tras la activación celular. Mientras los macrófagos en estado basal producen más TXA2 que PGE2, esta relación cambia a favor de la producción de PGE2 después de la activación con LPS.

Se han propuesto varios mecanismos bioquímicos para explicar esta alteración en el perfil de síntesis. Primero, se ha sugerido que la compartimentación física de COX-1 y COX-2 con sintasas terminales especificas podría ligar la actividad de estas enzimas con la síntesis de productos prostanoides finales específicos [55]. Segundo, alguna de las sintasas son inducibles y, por lo tanto, su expresión puede ser regulada por factores externos. Por ejemplo, la expresión de la isoforma dependiente de glutatión de la sintasa de PGE2 aumenta por la interleuquina-1β [56]. Finalmente, se ha propuesto también que la afinidad por el sustrato y la cinética de las sintasas de PGE2 y TXA2 puede cambiar entre monocitos en estado basal y activados [57]. Así pues, la cantidad y variedad de prostanoides que son producidos durante la inflamación están determinados por la naturaleza y el estado de activación de las células presentes en la zona de inflamación.

La diversidad de funciones de estos prostanoides viene condicionada también por la expresión de sus múltiples receptores celulares (pertenecientes a la familia de la receptores acoplados a proteínas G o GPCR´s) y las distintas cascadas de señalización ensambladas a los mismos.

1.6.1. Fosfolipasas A2

Las fosfolipasas de tipo A2 catalizan la hidrólisis del acido graso esterificado en la posición sn-2 de los fosfolípidos de membranas. Esta posición suele contener un ácido graso poliinsaturado (como el ácido araquidónico) que al ser liberado puede ser metabolizado para formar varios eicosanoides y otros mediadores lipídicos bioactivos relacionados. Por otro lado, el lisofosfolípido resultante también posee papeles importantes en procesos biológicos [58].

La superfamilia de enzimas con actividad fosfolipasa A2 (PLA2) está formada por un conjunto de proteínas con diversas funciones biológicas. Entre ellas, el ser el componente principal del veneno de muchas serpientes, constituir una de la principales enzimas digestivas en mamíferos o su papel preponderante en la liberación de intermediarios lipídicos en procesos inflamatorios.

Esta heterogeneidad ha llevado a la clasificación de las PLA2 en un total de 15 grupos y numerosos subgrupos hasta la fecha [59]. En términos de su mecanismo catalítico y características estructurales y funcionales se pueden clasificar en cinco tipos diferenciados: fosfolipasas A2 secretadas (sPLA2), fosfolipasas A2 independientes de Ca2+ (iPLA2), acetil-hidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH), fosfolipasas A2 lisosomales (LPLA2), y fosfolipasas A2 citosólicas (cPLA2).

Las fosfolipasas A2 secretadas o sPLA2 fueron el primer tipo de enzimas PLA2 en ser descubierta. Se encuentran en fuentes tan diversas como venenos de varias serpientes y escorpiones, componentes del jugo pancreático, líquido sinovial de enfermos de artritis y en diversos tejidos de mamíferos [60]. Se caracterizan por tener un bajo peso molecular (entre 13 y 15 kDa), una histidina en el sitio catalítico, requerimientos de concentraciones micromolares de calcio para su actividad enzimática y en su estructura suelen presentar, al menos, seis enlaces disulfuro.

Este tipo de estructura terciaria le confiere una gran estabilidad en ambientes extracelulares donde habitualmente realiza su actividad catalítica. Las sPLA2 comparten la propiedad de exhibir un aumento en su actividad catalítica cuando su sustrato se presenta en forma de agregados lipídicos situación que no ocurre si lo hace en forma monoméricas [61, 62].A esta propiedad característica de todas las sPLA2 se la denomina activación interfacial. Ciertas sPLA2 han sido reportadas en atacar ciertas membranas biológicas ejecutando con ello una respuesta inmune, de esta manera pueden bloquear la entrada del virus HIV en las células del huésped [63] así como neutralizar los virus vía degradación de la membrana viral en el caso de la sPLA2 del grupo X [64]. Las sPLA2 humanas de los grupos IIA, V, X y XII y las murinas de grupo IIA, IID, IIE y V poseen actividad bactericida frente a bacterias Gram positivas [65, 66]. En cuanto a la producción de eicosanoides la ausencia de la sPLA2 del grupo V en ratones knock out disminuye la capacidad de producir Leucotrieno C4 por macrófagos peritoneales tras el estimulo con partículas de zymosan de la pared celular de levaduras [67]. Sin embargo esta disminución no es total al contrario que lo que ocurre en el knock out para la fosfolipasa citosólico del grupo IVA, sugiriendo para la GV sPLA2, subordinado a la enzima GIVA cPLA2, un papel amplificador de la respuesta eicosanoide de los macrófagos[68].

Se han desarrollado varios compuestos químicos capaces de inhibir las sPLA2 de los cuales los que demostraron una potencia mas alta han sido los derivados de me-indoxam, el 12-epi-scalaradial y el LY311727. Tanto el me-indoxam como el LY311727 son compuestos impermeables a las células por lo que su uso solo es útil para ensayos en sistemas in vitro libres de células o donde la actividad de la sPLA2 ocurre en espacios extracelulares [69].

Las fosfolipasas A2 independientes de Ca+2 o iPLA2 reciben su nombre debido a que no requieren del ión Ca2+ ni para su reacción enzimática ni para acceder su sustrato. Esta característica las diferencia de otras PLA2 como la cPLA2α que sí depende del Ca+2 para translocar hacia las membranas. Todas las iPLA2 poseen en su centro activo una serina que actúa como nucleofílico durante la hidrólisis de los fosfolípidos.

El grupo más ampliamente estudiado es la iPLA2-GVIA que comprende al menos cinco variantes de “splicing” (procesamiento alternativo del RNA mensajero), todas ellas expresadas citosólicamente dentro de la célula. Estructuralmente se componen de una región con siete dominios repetidos tipo ankirina (ocho en el caso de la GVIA-1), una región de unión y el dominio catalítico donde se localiza la secuencia consenso clásico de las lipasas, GXSXG, que contiene la Serina catalítica. Los dominios tipo ankirina han sido descritos como dominios de interacción proteína-proteína. De las cinco variantes, solo dos de ellas la GVIA-1 y la GVIA-2 han demostrado ser activas enzimáticamente. Las variantes iPLA2-ankirina 1 y iPLA2-ankirina 2 pierden el dominio catalítico por lo que se descarta su actividad y se las asigna un papel regulador como inhibidores dominante negativos [70]. La iPLA2 GVIA-3 posee la secuencia lipasa, pero su actividad no ha sido verificada experimentalmente.

Además de su actividad intrínseca iPLA2, la GVIA posee actividad lisofosfolipasa así como actividad transacilasa [71]. No posee, al igual que las sPLA2, especificidad de sustrato por el acido graso situado en la posición sn-2 del fosfolípidos. La actividad de la GVIA PLA2 se ha sugerido estar regulada a través de múltiples mecanismos entre los que se encuentran la unión a ATP, la rotura por caspasas, interacción con la calmodulina y la posible agregación homomérica mediada por las repeticiones tipo ankirina.

Su función celular mejor definida consiste en el remodelamiento homeostático de los fosfolípidos de membrana [72], aunque diversos papeles en funciones tales como señalización, apoptosis, secreción de insulina y expresión proteica han sido reportados tanto en estudios celulares como con el ratón knock out para la GVIA-2 iPLA2 [73-75]. En los estudios celulares el compuesto químico mas ampliamente utilizado para inhibir la GVIA iPLA2 ha sido la bromoenol lactona o BEL, que afecta selectivamente a las iPLA2 frente a otras fosfolipasas. Sin embargo, BEL también inhibe la actividad ácido fosfatídico fosfohidrolasa dependiente de magnesio o PAP-1, e interactúa con otras enzimas celulares. Por lo tanto, es necesario tomar con preucación los resultados obtenidos con este inhibidor.

Dos grupos de PLA2, designados como GVIIA y GVIII, poseen la capacidad de hidrolizar el grupo acetilo situado en la posición sn-2 del factor activador de plaquetas y se las denominó, por lo tanto, PAF-AH. La PAF-AH del grupo VIIA está presente en el plasma sanguíneo. Los primeros estudios le adjudicaban un papel protector al detener los efectos pro-inflamatorios del PAF, sin embargo, recientes estudios clínicos muestran una concordancia entre los niveles de la GVIIA PLA2 y un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, por lo que se ha establecido como un marcador de estas afecciones. Un inhibidor de GlaxoSmithKline, SB-480848, ha demostrado ser efectivo a la hora de disminuir lesiones ateroscleróticas complejas en ensayos clínicos [76, 77].

Recientemente se clonó una enzima a partir de cerebro de vaca con actividad PLA2 independiente de Ca+2 y rápidamente se describieron las enzimas murina y humana. La actividad enzimática ocurre a pH 4.5 y la proteína colocaliza con marcadores lisosomales [78]. Los macrófagos alveolares y peritoneales del ratón Knock Out muestran acumulaciones de fosfatidil colina y fosfatidil etanolamina sugiriendo un posible papel en ciertas fosfolipidosis [79].

Las cPLA2 son proteínas citosólicas de un tamaño considerable (entre 61 y 114 kDa) y poseen una serina catalítica en su centro activo.

El prototipo de las cPLA2 es la GIVA PLA2, también conocida como cPLA2α. Es una de las más ampliamente estudiadas y esto se debe a que posee una propiedad única entre todas las demás PLA2, la cPLA2α hidroliza preferentemente fosfolípidos que contengan ácido araquidónico situado en su posición sn-2. Aunque es capaz de hidrolizar otros ácidos grasos, el grado de instauración, la posición del doble enlace y la longitud de las cadenas de los ácidos grasos en posición sn-2 influyen en la especificidad de sustrato de la cPLA2α. De este modo, el ácido oleico (C18:1) y el ácido linoleico (C18:2), que están presentes en abundancia en la membranas celulares, son liberados pobremente por la cPLA2α que, en cambio, hidroliza mejor ácidos grasos como el eicosapentaenoico (C20:5) y el α-linoleico (C18:3). Al estar estos últimos poco representados en la membranas biológicas, el ácido araquidónico (C:20:4) se convierte en el principal ácido graso liberado por las células [80-82]. Como se ha mencionado antes el acido araquidónico es precursor de todo un conjunto de moléculas activas (eicosanoides) con multitud de funciones en procesos biológicos. Estructuralmente, se pueden distinguir dos dominios funcionales dentro la cPLA2α, el dominio C2 y el dominio catalítico [83].

El dominio C2 esta formado por unos 125 aminoácidos en el extremo N terminal y recibe su nombre por la homología con el dominio C2 de la proteína quinasa C. Consta de 8 hojas-b antiparalelas y en uno de sus extremos es capaz de unir dos átomos de calcio a través de varios residuos de acido aspártico y asparragina. El domino C2 actúa como un dominio regulador de la actividad catalítica de la enzima ya que media la translocación de la cPLA2α hacia membranas intracelulares de una manera dependiente de Ca+2 [84-87]. El dominio catalítico se extiende desde el aminoácido 130 hasta el extremo C terminal y posee un núcleo formado por una lamina-β de 10 hojas rodeada de nueve helices-α que constituyen el motivo hidrolasa ampliamente conservado en numerosas lipasas. En su interior se encuentra la díada catalítica formada por la serina 228 y el ácido aspártico 549 [83]. Se ha propuesto que la enzima sufre un cambio

conformacional en la presencia de su sustrato que le permite ser accesible al centro catalítico, que de otra manera permanece enterrado en el interior de la molécula [88].

Entre los mecanismos que regulan la actividad de la cPLA2α se pueden citar el control de su expresión génica, su translocación a ciertas membranas, fosforilación, su interacción con otras proteínas, siendo estas tres últimas regulaciones post-transcripcionales las que más afectan a la actividad de la enzima. La cPLA2α se expresa de manera constitutiva en casi todas las células y tejidos [89, 90], con la notable excepción de los linfocitos T y linfocitos B [91]. Esta expresión puede ser aumentada por citoquinas pro-inflamatorias como el TNF-α [92], el interferón-γ [93], el factor estimulador de colonias de macrófagos [94] y la interleuquina-1α [95] y por factores de crecimiento como el EGF [96]. Tras el estimulo apropiado la cPLA2α cambia su localización citoplasmática y se dirige hacia la membranas intracelulares. Este proceso es dependiente de la unión de Ca+2 por parte del dominio C2, de manera que [Ca+2]i alrededor de 125 nM dirigen a la cPLA2α hacia las membranas del aparato de Golgi mientras que concentraciones superiores a 280 nM localizarán a la proteína en el retículo endoplasmático y en la envuelta nuclear. [97-99] Algunos mensajeros lipídicos como la ceramida-1-fosfato o el fosfatidil-inositol bisfosfato podrían actuar estabilizando esta unión a membranas o disminuyendo los requerimientos de Ca+2 para la translocación de la enzima [100, 101]. Se ha demostrado que la cPLA2α también puede se regulada por fosforilación de los residuos de serina en posiciones 505, 515 y 727. Las kinasas responsables serían las MAPK, MNK-1y calmodulina kinasa II respectivamente [102-106]. Las fosforilaciones no modificarían directamente la actividad catalítica de la proteína sino que aumentarían su afinidad de unión a fosfolípidos de membrana en respuesta a pequeños incrementos de Ca+2. Por último se han descrito interacciones con proteínas tales como la vimentina [107], p11, anexina-1, caveolina-1 [108] y PLIP [109] que aumentarían la cantidad de ácido araquidónico liberado por la cPLA2α, aunque se desconoce exactamente el mecanismo subyacente a este cambio.

El papel de la cPLA2α en fisiología y fisipatología ha sido sacado a la luz tras el estudio exhaustivo del ratón deficiente en el gen de esta fosfolipasa. Estos ratones knock out tienen una apariencia habitual y crecen normalmente. Estudios más minuciosos mostraron un defecto en la concentración renal y lesiones ulcerosas en el intestino. Aunque los machos son fértiles, las hembras quedan fecundadas con menor frecuencia que los ratones normales y los ratones recién nacidos tienen un menor tamaño. Además, defectos en el parto dan como resultado una menor supervivencia de las crías. Células primarias cultivadas de los ratones deficientes en cPLA2α producen cantidades significativamente menores de prostaglandinas y leucotrienos [110]. Así para diversos procesos donde la inflamación constituye un factor determinante, como pueden ser la ulceración intestinal, el daño pulmonar agudo, la poliposis, el daño cerebral tras isquemia/reperfusión y el choque anafiláctico, los ratones sin cPLA2α muestran fenotipos más suaves y respuestas menos dañinas [111-113]. También parece participar esta fosfolipasa en la percepción del dolor [114], procesos apoptóticos (tanto ejecutando un papel activador de la muerte celular como previniendo la misma) y en la fagocitosis de partículas de zimosán por parte de los macrófagos.

Se han desarrollado y utilizado ampliamente inhibidores químicos de la cPLA2α en estudios celulares, entre los que se pueden destacar el metil araquidonoil fluorofosfonato (MAFP), la araquidonoil trifluorometilcetona (ATFK) y un derivado de la pirrolidina llamado pirrofenona, que ha demostrado ser el mas potente y específico puesto, que inhibe la GIVA cPLA2 de manera preferente a otras PLA2 como las de grupo VI, IB, IIA, V y X.

1.6.2. Ciclooxigenasa-2

La prostaglandina H endoperoxido sintasa, comúnmente llamada ciclooxigenasa (COX) es la enzima clave para la conversión del acido araquidónico en prostaglandinas. Las dos isoformas conocidas se denominan COX-1 y COX-2

según el orden en el que fueron descubiertas. Mientras COX-1 es una enzima que se expresa de manera constitutiva en la mayor parte de las células y tejidos del organismo, COX-2 es una enzima inducible que puede aumentar su expresión de manera considerable, particularmente en células del sistema inmune [115]. Esta inducción aparece frente a diversos estímulos inflamatorios, entre los que se pueden mencionar TNF-α e interleuquina-1β, agentes microbianos como el lipopolisacárido bacteriano, mitógenos y factores de crecimiento como el derivado de plaquetas (PDGF) o el epidérmico (EGF) [116]. La expresión de COX-2 es un hecho característico de la mayoría de neoplasias malignas, y esta expresión se intensifica junto con el estado y la progresión del cáncer.

COX-1 produce prostaglandinas y tromboxano A2 que regula diversas funciones fisiológicas vasculares, renales y gastrointestinales mientras COX-2 controla la producción de prostaglandinas implicadas en la inflamación, el dolor y la fiebre. A pesar del amplio uso de drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINES) durante los últimos 100 años, su mecanismo de acción no fue completamente apreciado hasta que en 1971Vane publicó sus primeras observaciones, indicando que la capacidad de los AINEs para suprimir la inflamación es probablemente debida a su habilidad para inhibir la actividad COX [117].

Durante la década de los años 90 la industria farmacéutica se lanzó al descubrimiento y desarrollo de drogas que selectivamente inhibían COX-2 frente a COX-1 que proporcionó como resultado la introducción comercial de dos inhibidores altamente selectivos de COX-2, conocidos como coxibs (celecoxib y rofecoxib) sin apenas efectos sobre el tracto gastrointestinal. En el año 2004 fueron retirados del mercado tras comprobarse que celecoxib era responsable de accidentes cardiovasculares severos, y otros coxibs eran sospechosos de causar efectos secundarios similares.

1.7. Oxido nítrico sintasa inducible

La generación de óxido nítrico es uno de los múltiples mecanismos que median los procesos inflamatorios. Esta producción esta catalizada por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS, acrónimo del ingles oxide nitric synthases). Se han clonado tres isoformas denominadas NOS neural, NOS endotelial y NOS inducible (iNOS o NOS2). La enzima iNOS no está presente en células en estado basal, pero puede ser inducida por citoquinas inmunoestimulatorias, productos bacterianos, o infecciones en distintos tipos celulares, entre los que se encuentran monocitos y macrófagos del sistema inmune [118].

El óxido nítrico es formado directamente a partir del nitrógeno del grupo guanido de la L-arginina en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa que consume cinco electrones y que resulta en la formación, además del óxido nítrico, de L-citrulina.

Los inmunólogos llevan décadas explorando las propiedades citotóxicas de los macrófagos, que parecen ser dependientes de la generación de grandes cantidades de óxido nítrico en respuesta a una infección. El sistema inmune usa el óxido nítrico para combatir virus, bacteria, parásitos y tumores [119, 120]. Estudios de ratones deficientes en iNOS ha mostrado que es uno de los genes cruciales en la defensa del huésped frente a muchos patógenos letales [121]. En concreto, la habilidad del interferón–γ para inhibir la replicación de ciertos virus en macrófagos de ratón correlaciona con la producción celular de óxido nítrico y, por ello, la inducción de iNOS podría ser necesaria y suficiente para un efecto antiviral sostenido del interferón [122].

Los mecanismos moleculares que median las actividades biológicas del óxido nítrico pueden ser divididas en tres categorías. Una primera, el óxido nítrico reacciona rápidamente con metales de transición, tales como el hierro, cobre y zinc. Estos metales están presentes abundantemente en los grupos prostéticos de enzimas y otras proteínas y por este

mecanismo, el óxido nítrico regula la actividad de varias enzimas como la guanilato ciclasa soluble o la citocromo c oxidasa. Un segundo mecanismo de acción del óxido nítrico es su capacidad de formar S-nitrosotioles en los residuos de cisteína de ciertas proteínas, en una reacción llamada S-nitrosilación. Esta modificación se ha demostrado capaz de modificar la actividad de varias proteínas tales como factores de transcripción como AP-1y NF-kB, kinasas como la creatina kinasa, la ornitina kinasa, JNK y p21 RAS e incluso la caspasa 3 y la caspasa 9. Interesantemente se ha descrito recientemente que iNOS se une y S-nitrosila a la COX2 aumentando su actividad como resultado de esta modificación [123].

Una tercera vía de actuación del óxido nítrico es su aportación a la generación de radicales libres, puesto que el oxido nítrico reacciona rápidamente con el anión superóxido para formar el peroxinitrito. La forma ácida del peroxinitrito es el ácido peroxinitroso, una molécula muy reactiva e inestable con gran capacidad oxidante y capaz de modificar proteína, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos.

2. OBJETIVOS

En el contexto definido por los antecedentes anteriormente descritos, el objetivo fundamental de la presente tesis doctoral es el estudio de las rutas señalización lipídicas intracelulares que desencadena el dsRNA sobre una célula fundamental del sistama inmune innato: el macrófago. El trabajo se centrará en la caracterización de las PLA2 presentes en macrófagos activables por dsRNA, los metabolitos que surgen a partir de su acción sobre los fosfolípidos de membrana y su papel en la inducción génica de enzimas proinflamatorias.

Este objetivo principal puede ser desglosado en varios objetivos más específicos:

2.1. Caracterizar las PLA2s que expresan los macrófagos y cuales de ellas pueden incrementar su actividad y liberar AA de los fosfolídidos de membrana tras estimulacion con dsRNA.

2.2. Determinar los factores que producen la activación de la/las PLA2s.

2.3. Estudiar el papel de la actividad PLA2 en la inducción de enzimas proinflamatorias como COX-2 e iNOS.

2.4. Identificar el metabolito del AA involucrado en la inducción génica de iNOS.

2.5. Identificación del receptor celular de dsRNA que media todos estos procesos.

3. MATERIALES Y METODOS

4. RESULTADOS

5. DISCUSION

En el presente trabajo de tesis se ha evaluado en macrófagos la activación de la cPLA2α a través de la activación del receptor transmembrana de dsRNA, TLR3, y su implicación en la consecuente expresión génica de enzimas efectoras

en procesos inflamatorios como COX-2 e iNOS. Asimismo, se describe la PGE2 como el mensajero que media la señal producida por cPLA2α/COX-2 y la expresión de iNOS. También se desvela una nueva vía de activación de la cPLA2α, a través del receptor citosólico MDA-5.

5.1. Papel de las sPLA2 y la iPLA2 en la señalización inducida por poli-IC en los macrófagos RAW264.7

Las células RAW 264.7 expresan múltiples proteínas con actividad sPLA2, concretamente los grupos IB, IID, IIE, V y XII. Sin embargo inhibidores selectivos para esta familia de fosfolipasas fallaron en inhibir la liberación de acido araquidónico inducida por Poly I-C, descartando en principio, un papel de estas enzimas en la producción de eicosanoides en este modelo experimental. Se ha comprobado, en ensayos in vitro, con homogeneizados celulares de RAW 264.7, que estos inhibidores (LY311727 y 12-epi-scaradial), a las concentraciones empleadas, eliminan selectivamente la actividad de las sPLA2 (sin embargo, esto mismo no ha sido descrito en ensayos con células en cultivo). Por ello, no se puede descartar que estos inhibidores quizás no alcanzan sus dianas en el interior celular o que son degradados rápidamente antes de realizar su función sobre las fosfolipasas celulares.

La no implicación de las sPLA2 en nuestro sistema puede ser significativo en virtud del papel general que se adscribe a esta clase de enzimas como amplificadoras de la cascada eicosanoide [162]. Se ha demostrado recientemente que en ratones que pierden la sPLA2 del grupo V por eliminación génica, la movilización de AA en respuesta a estímulos del sistema inmune innato, tales como el zimosán, está reducida [67]. Así pues parece probable que las sPLA2 tengan algún papel distinto contra la infección de virus que la de proporcionar el sustrato para las enzimas que sintetizan eicosanoides. En este sentido, se ha descrito que ciertas sPLA2 bloquean la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana en las células hospedadoras [63], y pueden neutralizar los virus a través de la degradación de la membrana de las partículas virales [64].

En cuanto al grupo de las iPLA2, estudios previos han sugerido un papel para éstas en la inducción de iNOS por Poly I-C [163, 164]. En estos artículos, pertenecientes al grupo liderado por Corbett se identifica como mediador lipídico a un lisofosfolípido resultante de la actividad enzimática de la iPLA2, en concreto a la lisoplasmenil-colina (LPC). La cascada de señalización sería la siguiente: la LPC, mediante la activación de la proteína quinasa A (PKA) y la consecuente unión del factor de transcripción CREB al promotor del gen de iNOS, aumentaría la expresión de esta última enzima. Sin embargo, ciertos comentarios se pueden realizar sobre algunos de los experimentos llevados a cabo en estos trabajos. En primer lugar, para medir la actividad de la iPLA2 utilizan un sustrato como la plasmenilcolina que no es especifico de la iPLA2 y es susceptible de ser hidrolizado por PLA2 de otras familias. Por otro lado, realizan medidas de la producción de PGE2 por las células estimuladas con poli I-C y atribuyen esta producción exclusivamente a la actividad de la iPLA2. Si bien la iPLA2 puede hidrolizar fosfolípidos en cuya posición sn-2 esté el AA (precursor directo de la PGE2), esta fosfolipasa no tiene preferencia especial por estos fosfolípidos, al contrario que la cPLA2α (enzima clave en procesos de respuesta inflamatoria). Ésta no se menciona en los trabajos de Corbett y colaboradores, y podría ser la responsable de gran parte de la PGE2 detectada. En los experimentos realizados por este grupo donde se atribuye un papel clave a la iPLA2 se empleó el inhibidor químico BEL. Este inhibidor ha demostrado su alta especificidad por la iPLA2 frente a otras familias de fosfolipasas, en estudios in vitro [146], pero también inhibe otras actividades enzimáticas presentes en las células como la de la fosfohidrolasa de ácido fosfatídico dependiente de magnesio [165]. En nuestras manos, sin embargo, concentraciones de BEL tan bajas como 10 μM producen muerte celular (figuras 20 y 21). Estos datos apoyaban estudios previos [150, 151, 166], e impidien cualquier investigación posterior.

5.2. Papel de la cPLA2a en la señalización de los macrófagos RAW264.7 tratados con poli-IC

En los estudios objeto de esta tesis se ha comprobado inequívocamente la activación de la cPLA2α (figuras 22 y 23) en la misma línea celular (RAW 264.7) y con el mismo estímulo (poly I-C) que el utilizado en los estudios de Corbett [163]. Las células RAW 264.7 expresan constitutivamente y de manera abundante la cPLA2α, enzima reguladora clave en la liberación de ácido araquidónico en la mayoría de los sistemas celulares [81]. Hemos encontrado que la inhibición de la cPLA2α por estrategias farmacológicas selectivas reduce dramáticamente la hidrólisis de fosfolípidos inducida por el poli I-C. Además el poli I-C, induce la fosforilación de la enzima, un requisito importante para su activación [81]. Otro factor regulatorio importante para la activación de la cPLA2α es la elevación de la concentración de Ca+2 intracelular, que en nuestros estudios también ha sido detectado.

Junto con los resultados de la implicación de la iPLA2 [163, 164], nuestros resultados indican la posible existencia de dos rutas independientes reguladas por lípidos que llevan a la expresión de iNOS. La primera implica la generación de lisofosfolípidos derivados de la actividad iPLA2 [163], y el identificado en la presente tesis implica el acoplamiento de la cPLA2α y la COX-2 para generar PGE2. Parece probable que estas dos rutas puedan operar en paralelo bajo las mismas condiciones de estimulación, y conferiría al sistema una versatilidad más grandeen la regulación celular de iNOS. Estudios adicionales serán necesarios para determinar la contribución de cada una de estas rutas mediadas por distintas PLA2 en la regulación de la expresión de iNOS. Interesantemente, se ha descrito recientemente la inducción de iNOS a través deñ TLR9 y de la activación de la cPLA2α [167]. Este receptor de la familia de los TLRs es capaz de reconocer ácidos nucleicos (DNA) presentes en bacterias y virus con ciertas características diferenciadoras, en concreto, repeticiones del dinucleótido CpG con distinto patrón de metilación con respecto a la célula huésped.

5.3. Receptores de poli-IC que conducen a la activación de cPLA2α: TLR3 y MDA-5

En los resultados de la presente tesis la liberación de acido araquidónico inducida por el dsRNA mostró un retardo de 30 minutos. Un intervalo de tiempo similar es necesario para que se produzca el aumento de calcio intracelular (responsable en parte de la activación de la cPLA2α). También a partir de 30 minutos aumenta la fosforilación de la cPLA2α. Esta dilación no es observada cuando los macrófagos son enfrentados a otros estímulos de la inmunidad innata que desarrollan respuestas inmediatas a través de receptores de superficie, tales como el zymosan derivado de las levaduras [129, 131], el factor activador de plaquetas [130, 168] o la concavalina A [140]. Se ha demostrado que el Poly I-C debe ser internalizado por la célula de manera que pueda alcanzar los compartimentos endosomales intracelulares donde uno de sus receptores principales, TLR3, está localizado [17, 21, 169, 170], y que CD14 es un posible co-receptor de superficie que regula la internalización del Poly I-C [171]. Por lo tanto, la existencia de un retardo de tiempo en la activación intracelular (aumento de [Ca+2], fosforilación de la cPLA2α, liberación de AA) en los macrófagos tratados con poli I-C podría ser fácilmente explicado por el tiempo requerido para que este estímulo alcance su receptor intracelular. Esto sucede también durante la inducción en células dendríticas, estimuladas con poli I-C, de IFN-β mediada por el TLR3 localizado en endosomas. Apoyando esta idea está el hecho de que en fibroblastos, donde la expresión de TLR3 se produce en la superficie celular, no se registra este retardo en la respuesta [21].

Nuestros datos han mostrado que la reducción de la expresión del TLR3 por la tecnología del siRNA previene la activación de la cPLA2α, la liberación de AA, la generación de PGE2 y la inducción de COX-2 e iNOS en respuesta a

Poly I-C. Un punto interesante es que todos estos aspectos se ven fuertemente afectados, pero no eliminados totalmente (figuras 37 y 38). Este hecho se podría explicar argumentando que la eficacia del siRNA para eliminar la proteína del TLR3 no es del 100% (no así para el RNA mensajero como se demuestra en la figura 36). Quizá más plausible es la explicación de que parte de la señalización originada por el estímulo Poly I-C va a ser generada por alguno de los otros posibles receptores del RNA de doble cadena como son RIG-I o MDA-5 [31-33]. RIG-I, reconoce RNA con un grupo trifosfato en el extremo 5´ [39, 40] (entre otros determinantes moleculares), el Poly I-C no posee este grupo trifosfato y, por lo tanto, no sería un ligando efectivo de RIG-I. Por lo tanto, MDA-5 se erigiría como el mejor candidato conocido responsable de parte de la señal debida al Poly I-C. Las células RAW 264.7 expresan este receptor (figura 39) y en el modelo experimental de células HEK 293 hemos comprobado la activación de la cPLA2α por MDA-5 (figuras 40, 41 y 42) . Estudios en ratones "knock out" han confirmado que MDA-5 tiene un papel fundamental en la respuesta a Poly I-C [34]. Estos resultados tomados en conjunto sugieren que el TLR3 sería el principal receptor mediante el cual el Poly I-C produciría la activación de la cPLA2α en macrófagos RAW 264.7, y que la señal que permanece cuando se elimina el TLR3 sería debida, posiblemente, al reconocimiento del Poly I-C por el receptor citosólico MDA-5. Nuestros datos están en corcondancia con los de Flavell y colaboradores [16] quienes, usando células de ratones carentes en TLR3 demuestran que el TLR3 es el responsable de la activación de NFκB por Poly I-C. En contraste, Steer y colaboradores, también usando células de ratones deficientes en TLR3, no hallaron evidencia de la implicación del TLR3 en la señalización por Poly I-C que conduce a la inducción de COX-2 o la producción de peroxonitrito [157]. Cabe observar que en estos últimos estudios se añadió interferón-□ junto con el Poly I-C durante la estimulación celular, existiendo la posibilidad de que otras rutas señalizadoras se puedan haber activado y compensado por la perdida de la señalización por TLR3 [157].

5.4. Papel de las MAPK en la fosforilación y activación de cPLA2α

La fosforilación de la cPLA2α es llevada a cabo fundamentalmente por MAPKs [81], y se ha descrito recientemente que estas kinasas se activan en macrófagos tratados con poli I-C [159]. En concreto, dentro de los primeros eventos en las cascadas de señalización disparadas tras el reconocimiento del dsRNA, bien por parte del TLR3, bien por parte de MDA-5, se produce el reclutamiento de dos diferentes proteínas adaptadoras para cada ruta. Así en la ruta endocítica gobernada por TLR3, la proteína TRIF interacciona con el dominio TIR intracelular del receptor mientras que los receptores citosólicos (MDA5 y RIG-I) utilizan la proteína MAVS anclada a la membrana mitocondrial y que interacciona con estos receptores a través de los dominios CARD que poseen. A pesar de esta divergencia, tanto TRIF como MAVS, van a reclutar proteínas similares, entre los que cabe mencionar los miembros de la familia TRAF (TRAF2, TRAF3 y TRAF6) y proteínas kinasas como TBK-1, IKKε, NAP1, TAB/TAK. El orden y la magnitud de activación, así como la exacta composición de estos complejos moleculares señalizadores, no se conoce en detalle y varía dependiendo el tipo celular y la naturaleza del ligando. Pero un hecho común es la activación por parte de estos complejos proteicos de las MAPK [29, 30, 52, 157, 172]. En el caso de los receptores citosólicos como MDA-5 y RIG-I, las MAPK también van a ser activadas por una ruta que implica, entre otros componentes, a proteínas con dominios de muerte como FADD, TRADD y kinasas como RIP1, TAK1, IKKα e IKKβ [49, 173, 174].

Uno de los principales sustratos y mejor documentados, de las MAPK es el factor de transcripción AP-1 que se puede unir a promotores de distintas enzimas efectoras como COX-2 e iNOS y a genes de citoquinas. AP-1 junto con NFαB y los factores de regulación del interferón (IRF-3 e IRF-7) son los principales factores de transcripción que determinan la expresión génica en la respuesta inflamatoria frente a una infección vírica. Interesantemente, las tres familias más importantes de las MAPKs, a saber p38, ERK y JNK, han sido descritas como las kinasas que fosforilan la cPLA2α en

residuos específicos de serina, conduciendo a su activación [102, 104, 105]. En esta tesis (figura 43) se describe la fosforilación y activación de las MAPK ERK y p38 tras la activación de MDA-5 con Poly I-C en células HEK 293. Por lo tanto, este podría ser el nexo de unión entre las cascadas de señalización descritas tras el reconocimiento del dsRNA por alguno de sus receptores y la activación de la cPLA2α.

5.5. Papel de COX-2 y su metabolito PGE2 en la regulación de la expresión de iNOS

Un hecho remarcable del presente trabajo es el hallazgo de que la inducción de COX-2 en células tratadas con dsRNA ocurre bastante pronto, de hecho la proteína es claramente observable solo dos horas después de la estimulación, y la inducción no depende de la actividad de la cPLA2α (figuras 33 28 y 29). Sin embargo, la cPLA2α suministra a COX-2 su sustrato, el ácido araquidónico, que es necesario para la generación de la PGE2 que media la inducción de iNOS en respuesta a Poly I-C. Las células RAW 264.7 expresan tres tipos de receptores de PGE2, denominados EP2, EP3 y EP4 [175]. Por lo tanto, es probable que la PGE2 producida por el dsRNA vía cPLA2α/COX-2, actúe de una manera autocrina, uniéndose a sus receptores de superficie para inducir la expresión de iNOS. Es interesante destacar que cuando las células fueron estimuladas únicamente con PGE2 no se produjo la inducción de iNOS (figura 35). Existen al menos dos posibles explicaciones para este resultado. La primera es que las concentraciones de los receptores de PGE2 en la superficie celular en condiciones basales podría ser demasiado baja para proporcionar una señal sostenida para la inducción de iNOS. Sólo después de una activación celular los receptores EP alcanzarían la concentración apropiada para la inducción génica. Apoyando esta hipótesis se ha descrito que las células RAW 264.7 aumentan los niveles de RNA mensajero de los receptores EP2 y EP4 tras la estimulación con LPS [175]. La segunda posibilidad es que otras señales originadas por el Poly I-C independientes de la ruta cPLA2α/COX-2 estén implicados en la inducción de iNOS, en este caso la PGE2 actuaría como amplificador de la señal.

Un punto de continuación para los trabajos de esta tesis sería identificación del receptor o receptores de PGE2 responsable de la expresión de iNOS. Los tres receptores presentes en las RAW 264.7 son de la familia de receptores acoplados a proteínas G. En concreto, EP2 y EP4 se asocian con proteínas G del tipo Gs que activan la adenilato ciclasa y aumentan los niveles de AMP cíclico. Este AMPc podría activar la ruta PKA/CREB descrito en la figura 44 [163]. El receptor EP3, al contrario, está acoplado a proteínas G del tipo Gi que conducen a una disminución del AMPc intracelular.

La capacidad de la PGE2 para inducir la expresión génica a través de la activación de los receptores de la superficie celular ha sido reconocida en sistemas celulares no inmunes [176]. Un modelo de la ruta de transducción de señales descrita con los experimentos de esta tesis se representa en la figura 45.

5.6. Implicaciones fisipatológicas

Nuestros resultados podrían ayudar a clarificar los mecanismos a través de los cuales las infecciones virales pueden exacerbar ciertas enfermedades. Por ejemplo, se sabe que las infecciones virales del tracto pulmonar pueden agravar tanto el asma como la enfermedad obstructiva crónica, causando mucha de la mortalidad y morbilidad asociada con esos desordenes [177]. Basado en nuestros datos, es interesante especular con un papel para las células que expresan TLR3 en el tracto pulmonar y que en respuesta al dsRNA viral pudieran aumentar la inflamación generando prostaglandinas (a través de cPLA2α y COX-2) y óxido nítrico (a través de iNOS). Además, nuestros hallazgos pueden ser importantes, no solo durante las infecciones víricas sino también durante aquellos eventos inflamatorios

agudos en los que se presentan ligandos endógenos de los receptores de dsRNA. Entre estos ligandos, conocidos como "señales de peligro" [178-181]está el RNA mensajero liberado por las células apoptóticas [182, 183] o por las células de tejidos necróticos. A este respecto, el TLR3 agrava o potencia la inflamación preexistente derivadas de patologías asociadas al riñón [184], al líquido sinovial [185] y al tracto intestinal [186, 187]. Además, los ligandos del TLR3 amplifican la respuesta sistémica inflamatoria observada durante la sepsis [188]. La acumulación de RNA también ha sido detectada en los nodos neurofibrilares las placas neuríticas encontradas en los pacientes de la enfermedad de Alzheimer, una enfermedad con una componente inflamatorio importante [189, 190]. Sería posible especular pues con que el RNA procedente de las placas sería reconocido por la microglía a través del TLR3, conduciendo a la activación de la cPLA2α que a su vez exacerbaría la respuesta inflamatoria.

En el caso del receptor de dsRNA MDA-5, que también activa la cPLA2α, se ha relacionado recientemente mediante estudios genéticos con la diabetes tipo I [191-193], una enfermedad con un importante componente autoinmune y una respuesta inflamatoria exacerbada. En estos estudios se describen un número de mutaciones o variantes alélicas del gen que codifica para MDA-5 (y que afectarían a su función proteica) con una aumento de prevalencia en pacientes con diabetes tipo I. La descripción con detalle de estos marcadores genéticos permitirá no solo obtener una herramienta predictiva en la enfermedad sino la posibilidad de desarrollar un modelo murino de la diabetes tipo I, muy útil para el estudio de esta dolencia.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados descritos en esta memoria se han elaborado las siguientes conclusiones:

6.1. El poli-IC, cuya estructura se asemeja a la de los RNA de doble cadena biológicos, es un estímulo capaz de producir la inducción de una actividad PLA2 en la línea celular macrofágica RAW 264.7.

6.2. La fosfolipasa responsable de esta actividad es la cPLA2α. Fosfolipasas pertenecientes a las familias de las sPLA2 e iPLA2 tienen un papel nulo, o si acaso minoritario en la liberación de ácido araquidónico producida por el ácido poliinosínico-policitidílico.

6.3. El poli-IC induce la expresión de COX-2 y la producción de su metabolito PGE2 de una manera independiente de la actividad de la cPLA2α.

6.4. El poli-IC induce la expresión de iNOS de una manera dependiente de la actividad de la cPLA2α y COX-2. Ambas enzimas cooperan en el control de la expresión de iNOS, una, la cPLA2α, proporcionando el ácido araquidónico que la otra, COX-2, usará como sustrato.

6.5. La PGE2 es el metabolito secundario de COX-2 implicado en la inducción de iNOS.

6.6. El TLR3 es el principal receptor a través del cual el poli-IC induce la activación de la cPLA2α y regula la expresión de COX-2 e iNOS en la línea celular RAW 264.7.

6.7. El poli-IC, a través de su receptor citosólico MDA-5, es capaz de activar la cPLA2α en células HEK 293 que sobreexpresan ambas proteínas.

6.8. En estas mismas células, el ácido poliinosínico-policitidílico produce la fosforilación/activación de las MAPK ERK y p38. Este hecho coincide temporalmente con las fosforilación/activación de la cPLA2α, sugiriendo la conexión entre ambas rutas.

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Hasta la fecha de defensa, el trabajo realizado ha dado lugar a las publicaciones científicas indicadas en las referencias 194-195.

REFERENCES

1. Beutler, B. (2004) Innate immunity: an overview. Mol Immunol 40: 845-859.

2. Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V. (1988) The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell 52: 269-279.

3. Engstrom, Y., Kadalayil, L., Sun, S. C., Samakovlis, C., Hultmark, D. and Faye, I. (1993) kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in Drosophila. J Mol Biol 232: 327-333.

4. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell 86: 973-983.

5. Philpott, D. J., Yamaoka, S., Israel, A. and Sansonetti, P. J. (2000) Invasive Shigella flexneri activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. J Immunol 165: 903-914.

6. Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J. and Philpott, D. J. (2003) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. Science 300: 1584-1587.

7. Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. and Sansonetti, P. J. (2003) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J Biol Chem 278: 8869-8872.

8. Meylan, E. and Tschopp, J. (2006) Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. Mol Cell 22: 561-569.

9. Yoneyama, M. and Fujita, T. (2007) Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. J Biol Chem 282: 15315-15318.

10. Takeuchi, O. and Akira, S. (2008) MDA5/RIG-I and virus recognition. Curr Opin Immunol 20: 17-22.

11. Komuro, A. and Horvath, C. M. (2006) RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. J Virol 80: 12332-12342.

12. Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S. and Fitzgerald, K. A. (2005) The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. J Immunol 175: 5260-5268.

13. Samuel, C. E. (2001) Antiviral actions of interferons. Clin Microbiol Rev 14: 778-809.

14. Williams, B. R. (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. Oncogene 18: 6112-6120.

15. Bass, B. L. (1997) RNA editing and hypermutation by adenosine deamination. Trends Biochem Sci 22: 157-162.

16. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature 413: 732-738.

17. Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K. and Seya, T. (2002) Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. Biochem Biophys Res Commun 293: 1364-1369.

18. Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E. and Flavell, R. A. (2004) Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. Nat Med 10: 1366-1373.

19. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. and Mantovani, A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. J Immunol 164: 5998-6004.

20. Schmidt, K. N., Leung, B., Kwong, M., Zarember, K. A., Satyal, S., Navas, T. A., Wang, F. and Godowski, P. J. (2004) APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. J Immunol 172: 138-143.

21. Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A. and Seya, T. (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. J Immunol 171: 3154-3162.

22. Brandenburg, B. and Zhuang, X. (2007) Virus trafficking - learning from single-virus tracking. Nat Rev Microbiol 5: 197-208.

23. Sun, J., Duffy, K. E., Ranjith-Kumar, C. T., Xiong, J., Lamb, R. J., Santos, J., Masarapu, H., Cunningham, M., Holzenburg, A., Sarisky, R. T., Mbow, M. L. and Kao, C. (2006) Structural and functional analyses of the human Toll-like receptor 3. Role of glycosylation. J Biol Chem 281: 11144-11151.

24. Bell, J. K., Askins, J., Hall, P. R., Davies, D. R. and Segal, D. M. (2006) The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 8792-8797.

25. Pirher, N., Ivicak, K., Pohar, J., Bencina, M. and Jerala, R. (2008) A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. Nat Struct Mol Biol 15: 761-763.

26. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S. (2003) Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-like Receptor Signaling Pathway. Science 301: 640-643.

27. Jiang, Z., Mak, T. W., Sen, G. and Li, X. (2004) Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 3533-3538.

28. Jiang, Z., Zamanian-Daryoush, M., Nie, H., Silva, A. M., Williams, B. R. and Li, X. (2003) Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. J Biol Chem 278: 16713-16719.

29. Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L. C., Wang, G. G., Kamps, M. P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G., Mann, M. and Karin, M. (2006) Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. Nature 439: 204-207.

30. Oganesyan, G., Saha, S. K., Guo, B., He, J. Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A. and Cheng, G. (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. Nature 439: 208-211.

31. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. and Fujita, T. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol 5: 730-737.

32. Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S. and Randall, R. E. (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 17264-17269.

33. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A. and Fujita, T. (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. J Immunol 175: 2851-2858.

34. Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S. and Colonna, M. (2006) Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 8459-8464.

35. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O. and Akira, S. (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. Immunity 23: 19-28.

36. Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. and Akira, S. (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Nature 441: 101-105.

37. Saito, T., Owen, D. M., Jiang, F., Marcotrigiano, J. and Gale, M., Jr. (2008) Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. Nature 454: 523-527.

38. McCartney, S. A., Thackray, L. B., Gitlin, L., Gilfillan, S., Virgin, H. W. and Colonna, M. (2008) MDA-5 recognition of a murine norovirus. PLoS Pathog 4: e1000108.

39. Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S. and Hartmann, G. (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. Science 314: 994-997.

40. Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. and Reis e Sousa, C. (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. Science 314: 997-1001.

41. Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T. and Akira, S. (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. J Exp Med 205: 1601-1610.

42. Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K. K., Krug, A. and Hopfner, K. P. (2008) The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. Mol Cell 29: 169-179.

43. Saito, T., Hirai, R., Loo, Y. M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., Akira, S., Fujita, T. and Gale, M., Jr. (2007) Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 582-587.

44. Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. and Akira, S. (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. Nat Immunol 6: 981-988.

45. Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. and Tschopp, J. (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. Nature 437: 1167-1172.

46. Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. and Chen, Z. J. (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. Cell 122: 669-682.

47. Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z. and Shu, H. B. (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. Mol Cell 19: 727-740.

48. Saha, S. K., Pietras, E. M., He, J. Q., Kang, J. R., Liu, S. Y., Oganesyan, G., Shahangian, A., Zarnegar, B., Shiba, T. L., Wang, Y. and Cheng, G. (2006) Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. EMBO J 25: 3257-3263.

49. Michallet, M. C., Meylan, E., Ermolaeva, M. A., Vazquez, J., Rebsamen, M., Curran, J., Poeck, H., Bscheider, M., Hartmann, G., Konig, M., Kalinke, U., Pasparakis, M. and Tschopp, J. (2008) TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. Immunity 28: 651-661.

50. Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K. and Akira, S. (2004) The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. J Exp Med 199: 1641-1650.

51. Perry, A. K., Chow, E. K., Goodnough, J. B., Yeh, W. C. and Cheng, G. (2004) Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. J Exp Med 199: 1651-1658.

52. Yoshida, R., Takaesu, G., Yoshida, H., Okamoto, F., Yoshioka, T., Choi, Y., Akira, S., Kawai, T., Yoshimura, A. and Kobayashi, T. (2008) TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. J Biol Chem 283: 36211-36220.

53. Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science 294: 1871-1875.

54. Serhan, C. N., Chiang, N. and Van Dyke, T. E. (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nat Rev Immunol 8: 349-361.

55. Naraba, H., Murakami, M., Matsumoto, H., Shimbara, S., Ueno, A., Kudo, I. and Oh-ishi, S. (1998) Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. J Immunol 160: 2974-2982.

56. Jakobsson, P. J., Thoren, S., Morgenstern, R. and Samuelsson, B. (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 7220-7225.

57. Penglis, P. S., Cleland, L. G., Demasi, M., Caughey, G. E. and James, M. J. (2000) Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitors. J Immunol 165: 1605-1611.

58. Rivera, R. and Chun, J. (2008) Biological effects of lysophospholipids. Rev Physiol Biochem Pharmacol 160: 25-46.

59. Schaloske, R. H. and Dennis, E. A. (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. Biochim Biophys Acta 1761: 1246-1259.

60. Six, D. A. and Dennis, E. A. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. Biochim Biophys Acta 1488: 1-19.

61. Carman, G. M., Deems, R. A. and Dennis, E. A. (1995) Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics. J Biol Chem 270: 18711-18714.

62. Gelb, M. H., Jain, M. K., Hanel, A. M. and Berg, O. G. (1995) Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: lessons from secreted phospholipases A2. Annu Rev Biochem 64: 653-688.

63. Fenard, D., Lambeau, G., Valentin, E., Lefebvre, J. C., Lazdunski, M. and Doglio, A. (1999) Secreted phospholipases A(2), a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. J Clin Invest 104: 611-618.

64. Kim, J. O., Chakrabarti, B. K., Guha-Niyogi, A., Louder, M. K., Mascola, J. R., Ganesh, L. and Nabel, G. J. (2007)Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2. J Virol 81: 1444-1450.

65. 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.

66. 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.

67. 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.

68. 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.

69. Smart, B. P., Pan, Y. H., Weeks, A. K., Bollinger, J. G., Bahnson, B. J. and Gelb, M. H. (2004) Inhibition of the complete set of mammalian secreted phospholipases A(2) by indole analogues: a structure-guided study. Bioorg Med Chem 12: 1737-1749.

70. Larsson, P. K., Claesson, H. E. and Kennedy, B. P. (1998) Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A2 and their effect on enzyme activity. J Biol Chem 273: 207-214.

71. Winstead, M. V., Balsinde, J. and Dennis, E. A. (2000) Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. Biochim Biophys Acta 1488: 28-39.

72. 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.

73. Balsinde, J. and Balboa, M. A. (2005) Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. Cell Signal 17: 1052-1062.

74. Bao, S., Miller, D. J., Ma, Z., Wohltmann, M., Eng, G., Ramanadham, S., Moley, K. and Turk, J. (2004) Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. J Biol Chem 279: 38194-38200.

75. Bao, S., Song, H., Wohltmann, M., Ramanadham, S., Jin, W., Bohrer, A. and Turk, J. (2006) Insulin secretory responses and phospholipid composition of pancreatic islets from mice that do not express Group VIA phospholipase A2 and effects of metabolic stress on glucose homeostasis. J Biol Chem 281: 20958-20973.

76. Serruys, P. W., Garcia-Garcia, H. M., Buszman, P., Erne, P., Verheye, S., Aschermann, M., Duckers, H., Bleie, O., Dudek, D., Botker, H. E., von Birgelen, C., D'Amico, D., Hutchinson, T., Zambanini, A., Mastik, F., van Es, G. A., van der Steen, A. F., Vince, D. G., Ganz, P., Hamm, C. W., Wijns, W. and Zalewski, A. (2008) Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A(2) inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. Circulation 118: 1172-1182.

77. Wilensky, R. L., Shi, Y., Mohler, E. R., 3rd, Hamamdzic, D., Burgert, M. E., Li, J., Postle, A., Fenning, R. S., Bollinger, J. G., Hoffman, B. E., Pelchovitz, D. J., Yang, J., Mirabile, R. C., Webb, C. L., Zhang, L., Zhang, P., Gelb, M. H., Walker, M. C., Zalewski, A. and Macphee, C. H. (2008) Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. Nat Med 14: 1059-1066.

78. 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.

79. Hiraoka, M., Abe, A., Lu, Y., Yang, K., Han, X., Gross, R. W. and Shayman, J. A. (2006) Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. Mol Cell Biol 26: 6139-6148.

80. 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.

81. Ghosh, M., Tucker, D. E., Burchett, S. A. and Leslie, C. C. (2006) Properties of the Group IV phospholipase A2 family. Prog Lipid Res 45: 487-510.

82. Kramer, R. M., Roberts, E. F., Manetta, J. and Putnam, J. E. (1991) The Ca2(+)-sensitive cytosolic phospholipase A2 is a 100-kDa protein in human monoblast U937 cells. J Biol Chem 266: 5268-5272.

83. 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.

84. 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.

85. 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.

86. 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.

87. 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.

88. Burke, J. E., Hsu, Y. H., Deems, R. A., Li, S., Woods, V. L., Jr. and Dennis, E. A. (2008) A phospholipid substrate molecule residing in the membrane surface mediates opening of the lid region in group IVA cytosolic phospholipase A2. J Biol Chem 283: 31227-31236.

89. Hirabayashi, T. and Shimizu, T. (2000) Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). Biochim Biophys Acta 1488: 124-138.

90. Leslie, C. C. (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. J Biol Chem 272: 16709-16712.

91. Gilbert, J. J., Stewart, A., Courtney, C. A., Fleming, M. C., Reid, P., Jackson, C. G., Wise, A., Wakelam, M. J. and Harnett, M. M. (1996) Antigen receptors on immature, but not mature, B and T cells are coupled to cytosolic phospholipase A2 activation: expression and activation of cytosolic phospholipase A2 correlate with lymphocyte maturation. J Immunol 156: 2054-2061.

92. Hoeck, W. G., Ramesha, C. S., Chang, D. J., Fan, N. and Heller, R. A. (1993) Cytoplasmic phospholipase A2 activity and gene expression are stimulated by tumor necrosis factor: dexamethasone blocks the induced synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 4475-4479.

93. Wu, T., Levine, S. J., Lawrence, M. G., Logun, C., Angus, C. W. and Shelhamer, J. H. (1994) Interferon-gamma induces the synthesis and activation of cytosolic phospholipase A2. J Clin Invest 93: 571-577.

94. Nakamura, T., Lin, L. L., Kharbanda, S., Knopf, J. and Kufe, D. (1992) Macrophage colony stimulating factor activates phosphatidylcholine hydrolysis by cytoplasmic phospholipase A2. EMBO J 11: 4917-4922.

95. Lin, L. L., Lin, A. Y. and DeWitt, D. L. (1992) Interleukin-1 alpha induces the accumulation of cytosolic phospholipase A2 and the release of prostaglandin E2 in human fibroblasts. J Biol Chem 267: 23451-23454.

96. Maxwell, A. P., Goldberg, H. J., Tay, A. H., Li, Z. G., Arbus, G. S. and Skorecki, K. L. (1993) Epidermal growth factor and phorbol myristate acetate increase expression of the mRNA for cytosolic phospholipase A2 in glomerular mesangial cells. Biochem J 295: 763-766.

97. 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.

98. 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.

99. 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.

100. Casas, J., Gijon, 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.

101. 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.

102. Borsch-Haubold, A. G., Bartoli, F., Asselin, J., Dudler, T., Kramer, R. M., Apitz-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.

103. 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.

104. 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.

105. 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.

106. Muthalif, M. M., Hefner, Y., Canaan, S., Harper, J., Zhou, H., Parmentier, J. H., Aebersold, 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.

107. 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.

108. 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.

109. 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.

110. Nakatani, N., Uozumi, N., Kume, K., Murakami, M., Kudo, I. and Shimizu, T. (2000) Role of cytosolic phospholipase A2 in the production of lipid mediators and histamine release in mouse bone-marrow-derived mast cells. Biochem J 352: 311-317.

111. 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.

112. Fujishima, H., Sanchez Mejia, R. O., Bingham, C. O., 3rd, Lam, B. K., Sapirstein, A., Bonventre, J. V., Austen, K. F. and Arm, J. P. (1999) Cytosolic phospholipase A2 is essential for both the immediate and the delayed phases of eicosanoid generation in mouse bone marrow-derived mast cells. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 4803-4807.

113. 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: 618-622.

114. Lucas, K. K., Svensson, C. I., Hua, X. Y., Yaksh, T. L. and Dennis, E. A. (2005) Spinal phospholipase A2 in inflammatory hyperalgesia: role of group IVA cPLA2. Br J Pharmacol 144: 940-952.

115. Smith, W. L., Garavito, R. M. and DeWitt, D. L. (1996) Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. J. Biol. Chem. 271: 33157-33160.

116. Smith, W. L., DeWitt, D. L. and Garavito, R. M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem 69: 145-182.

117. Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol 231: 232-235.

118. Charles, I. G., Palmer, R. M., Hickery, M. S., Bayliss, M. T., Chubb, A. P., Hall, V. S., Moss, D. W. and Moncada, S. (1993) Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 11419-11423.

119. Marletta, M. A. (1989) Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. Trends Biochem Sci 14: 488-492.

120. Nathan, C. F. and Hibbs, J. B., Jr. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol 3: 65-70.

121. Wei, X. Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G. J., Huang, F. P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. and Liew, F. Y. (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Nature 375: 408-411.

122. Karupiah, G., Xie, Q. W., Buller, R. M., Nathan, C., Duarte, C. and MacMicking, J. D. (1993) Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. Science 261: 1445-1448.

123. Kim, S. F., Huri, D. A. and Snyder, S. H. (2005) Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. Science 310: 1966-1970.

124. Krajewski, S., Zapata, J. M. and Reed, J. C. (1996) Detection of multiple antigens on western blots. Anal Biochem 236: 221-228.

125. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37: 911-917.

126. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.

127. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150: 76-85.

128. 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.

129. Balsinde, J., Balboa, M. A. and Dennis, E. A. (2000) Identification of a third pathway for arachidonic acid mobilization and prostaglandin production in activated P388D1 macrophage-like cells. J Biol Chem 275: 22544-22549.

130. Balsinde, J., Barbour, S. E., Bianco, I. D. and Dennis, E. A. (1994) Arachidonic acid mobilization in P388D1 macrophages is controlled by two distinct Ca(2+)-dependent phospholipase A2 enzymes. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 11060-11064.

131. Balsinde, J., Fernandez, B., Solis-Herruzo, J. A. and Diez, E. (1992) Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. Biochim Biophys Acta 1136: 75-82.

132. Balsinde, J., Balboa, M. A., Yedgar, S. and Dennis, E. A. (2000) Group V phospholipase A(2)-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D(1) macrophages. J Biol Chem 275: 4783-4786.

133. Shinohara, H., Balboa, M. A., Johnson, C. A., Balsinde, J. and Dennis, E. A. (1999) Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A2s. J Biol Chem 274: 12263-12268.

134. Johnsen, I. B., Nguyen, T. T., Ringdal, M., Tryggestad, A. M., Bakke, O., Lien, E., Espevik, T. and Anthonsen, M. W. (2006) Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling. EMBO J 25: 3335-3346.

135. Matsumoto, M. and Seya, T. (2008) TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). Adv Drug Deliv Rev 60: 805-812.

136. Balsinde, J., Winstead, M. V. and Dennis, E. A. (2002) Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. FEBS Lett 531: 2-6.

137. 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.

138. Barnette, M. S., Rush, J., Marshall, L. A., Foley, J. J., Schmidt, D. B. and Sarau, H. M. (1994) Effects of scalaradial, a novel inhibitor of 14 kDa phospholipase A2, on human neutrophil function. Biochem Pharmacol 47: 1661-1667.

139. Marshall, L. A., Winkler, J. D., Griswold, D. E., Bolognese, B., Roshak, A., Sung, C. M., Webb, E. F. and Jacobs, R. (1994) Effects of scalaradial, a type II phospholipase A2 inhibitor, on human neutrophil arachidonic acid mobilization and lipid mediator formation. J Pharmacol Exp Ther 268: 709-717.

140. 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.

141. Balboa, M. A., Perez, R. and Balsinde, J. (2003) Amplification mechanisms of inflammation: paracrine stimulation of arachidonic acid mobilization by secreted phospholipase A2 is regulated by cytosolic phospholipase A2-derived hydroperoxyeicosatetraenoic acid. J Immunol 171: 989-994.

142. 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.

143. Balsinde, J. (2002) Roles of various phospholipases A2 in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. Biochem J 364: 695-702.

144. Perez, R., Balboa, M. A. and Balsinde, J. (2006) Involvement of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in macrophage engulfment of hydrogen peroxide-treated U937 cells. J Immunol 176: 2555-2561.

145. 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.

146. Hazen, S. L., Zupan, L. A., Weiss, R. H., Getman, D. P. and Gross, R. W. (1991) Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A2. Mechanism-based discrimination between calcium-dependent and -independent phospholipases A2. J Biol Chem 266: 7227-7232.

147. Jenkins, C. M., Han, X., Mancuso, D. J. and Gross, R. W. (2002) Identification of calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) beta, and not iPLA2gamma, as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10 smooth muscle cells. Enantioselective mechanism-based discrimination of mammalian iPLA2s. J Biol Chem 277: 32807-32814.

148. 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.

149. Tay, H. K. and Melendez, A. J. (2004) Fcgamma RI-triggered generation of arachidonic acid and eicosanoids requires iPLA2 but not cPLA2 in human monocytic cells. J Biol Chem 279: 22505-22513.

150. Fuentes, L., Perez, R., Nieto, M. L., Balsinde, J. and Balboa, M. A. (2003) Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A2. J Biol Chem 278: 44683-44690.

151. 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.

152. Ono, T., Yamada, K., Chikazawa, Y., Ueno, M., Nakamoto, S., Okuno, T. and Seno, K. (2002) Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A2alpha, pyrrophenone. Biochem J 363: 727-735.

153. Balsinde, J., Shinohara, H., Lefkowitz, L. J., Johnson, C. A., Balboa, M. A. and Dennis, E. A. (1999) Group V phospholipase A(2)-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. J Biol Chem 274: 25967-25970.

154. Bosetti, F. and Weerasinghe, G. R. (2003) The expression of brain cyclooxygenase-2 is down-regulated in the cytosolic phospholipase A2 knockout mouse. J Neurochem 87: 1471-1477.

155. Kita, Y., Ohto, T., Uozumi, N. and Shimizu, T. (2006) Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s. Biochim Biophys Acta 1761: 1317-1322.

156. Sapirstein, A., Saito, H., Texel, S. J., Samad, T. A., O'Leary, E. and Bonventre, J. V. (2005) Cytosolic phospholipase A2alpha regulates induction of brain cyclooxygenase-2 in a mouse model of inflammation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288: R1774-1782.

157. Steer, S. A., Moran, J. M., Christmann, B. S., Maggi, L. B., Jr. and Corbett, J. A. (2006) Role of MAPK in the regulation of double-stranded RNA- and encephalomyocarditis virus-induced cyclooxygenase-2 expression by macrophages. J Immunol 177: 3413-3420.

158. Samuelsson, B., Morgenstern, R. and Jakobsson, P. J. (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. Pharmacol Rev 59: 207-224.

159. Maggi, L. B., Jr., Heitmeier, M. R., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Buller, R. M. and Corbett, J. A. (2000) Potential role of PKR in double-stranded RNA-induced macrophage activation. EMBO J 19: 3630-3638.

160. Diez, E., Balsinde, J., Aracil, M. and Schuller, A. (1987) Ethanol induces release of arachidonic acid but not synthesis of eicosanoids in mouse peritoneal macrophages. Biochim Biophys Acta 921: 82-89.

161. Siren, J., Imaizumi, T., Sarkar, D., Pietila, T., Noah, D. L., Lin, R., Hiscott, J., Krug, R. M., Fisher, P. B., Julkunen, I. and Matikainen, S. (2006) Retinoic acid inducible gene-I and mda-5 are involved in influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines. Microbes Infect 8: 2013-2020.

162. Fitzpatrick, F. A. and Soberman, R., 2001. Regulated formation of eicosanoids. J Clin Invest, 107: 1347-1351.

163. Maggi, L. B., Jr., Moran, J. M., Scarim, A. L., Ford, D. A., Yoon, J. W., McHowat, J., Buller, R. M. and Corbett, J. A., (2002) Novel role for calcium-independent phospholipase A(2) in the macrophage antiviral response of inducible nitric-oxide synthase expression. J Biol Chem 277: 38449-38455.

164. Martinson, B. D., Albert, C. J., Corbett, J. A., Wysolmerski, R. B. and Ford, D. A. (2003) Calcium-independent phospholipase A2 mediates CREB phosphorylation in double-stranded RNA-stimulated endothelial cells. J Lipid Res 44: 1686-1691.

165. Balsinde, J. and Dennis, E. A. (1996) Bromoenol lactone inhibits magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase and blocks triacylglycerol biosynthesis in mouse P388D1 macrophages. J Biol Chem 271: 31937-31941.

166. Balsinde, J., Perez, R. and Balboa, M. A. (2006) Calcium-independent phospholipase A2 and apoptosis. Biochim Biophys Acta 1761: 1344-1350.

167. Lee, S. H., Lee, J. G., Kim, J. R. and Baek, S. H. (2007) Toll-like receptor 9-mediated cytosolic phospholipase A2 activation regulates expression of inducible nitric oxide synthase. Biochem Biophys Res Commun 364: 996-1001.

168. Balsinde, J., Balboa, M. A. and Dennis, E. A. (1997) Inflammatory activation of arachidonic acid signaling in murine P388D1 macrophages via sphingomyelin synthesis. J Biol Chem 272: 20373-20377.

169. Funami, K., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Akazawa, T., Yamamoto, A. and Seya, T. (2004) The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. Int Immunol 16: 1143-1154.

170. Nishiya, T., Kajita, E., Miwa, S. and Defranco, A. L. (2005) TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. J Biol Chem 280: 37107-37117.

171. Lee, H. K., Dunzendorfer, S., Soldau, K. and Tobias, P. S. (2006) Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. Immunity 24: 153-163.

172. Mikkelsen, S. S., Jensen, S. B., Chiliveru, S., Melchjorsen, J., Julkunen, I., Gaestel, M., Arthur, J. S., Flavell, R. A., Ghosh, S. and Paludan, S. R. (2009) RIG-I-mediated Activation of p38 MAPK Is Essential for Viral Induction of Interferon and Activation of Dendritic Cells. J Biol Chem 284: 10774-10782.

173. Balachandran, S., Thomas, E. and Barber, G. N. (2004) A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. Nature 432: 401-405.

174. Takahashi, K., Kawai, T., Kumar, H., Sato, S., Yonehara, S. and Akira, S. (2006) Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. J Immunol 176: 4520-4524.

175. Arakawa, T., Laneuville, O., Miller, C. A., Lakkides, K. M., Wingerd, B. A., DeWitt, D. L. and Smith, W. L. (1996) Prostanoid receptors of murine NIH 3T3 and RAW 264.7 cells. Structure and expression of the murine prostaglandin EP4 receptor gene. J Biol Chem 271: 29569-29575.

176. Timoshenko, A. V., Lala, P. K. and Chakraborty, C. (2004) PGE2-mediated upregulation of iNOS in murine breast cancer cells through the activation of EP4 receptors. Int J Cancer 108: 384-389.

177. Mallia, P., Contoli, M., Caramori, G., Pandit, A., Johnston, S. L. and Papi, A. (2007) Exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): focus on virus induced exacerbations. Curr Pharm Des 13: 73-97.

178. Gallucci, S., Lolkema, M. and Matzinger, P. (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. Nat Med 5: 1249-1255.

179. Marshak-Rothstein, A. (2006) Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. Nat Rev Immunol 6: 823-835.

180. Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S. and Bhardwaj, N. (2000) Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. J Exp Med 191: 423-434.

181. Shi, Y., Zheng, W. and Rock, K. L. (2000) Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 14590-14595.

182. Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. and Weissman, D. (2004) mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. J Biol Chem 279: 12542-12550.

183. Cavassani, K. A., Ishii, M., Wen, H., Schaller, M. A., Lincoln, P. M., Lukacs, N. W., Hogaboam, C. M. and Kunkel, S. L. (2008) TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. J Exp Med 205: 2609-2621.

184. Patole, P. S., Grone, H. J., Segerer, S., Ciubar, R., Belemezova, E., Henger, A., Kretzler, M., Schlondorff, D. and Anders, H. J. (2005) Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. J Am Soc Nephrol 16: 1326-1338.

185. Brentano, F., Schorr, O., Gay, R. E., Gay, S. and Kyburz, D. (2005) RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. Arthritis Rheum 52: 2656-2665.

186. Lang, K. S., Georgiev, P., Recher, M., Navarini, A. A., Bergthaler, A., Heikenwalder, M., Harris, N. L., Junt, T., Odermatt, B., Clavien, P. A., Pircher, H., Akira, S., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (2006) Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. J Clin Invest 116: 2456-2463.

187. Zhou, R., Wei, H., Sun, R. and Tian, Z. (2007) Recognition of double-stranded RNA by TLR3 induces severe small intestinal injury in mice. J Immunol 178: 4548-4556.

188. Doughty, L. A., Carlton, S., Galen, B., Cooma-Ramberan, I., Chung, C. S. and Ayala, A. (2006) Activation of common antiviral pathways can potentiate inflammatory responses to septic shock. Shock 26: 187-194.

189. Ginsberg, S. D., Galvin, J. E., Chiu, T. S., Lee, V. M., Masliah, E. and Trojanowski, J. Q. (1998) RNA sequestration to pathological lesions of neurodegenerative diseases. Acta Neuropathol 96: 487-494.

190. Marcinkiewicz, M. (2002) BetaAPP and furin mRNA concentrates in immature senile plaques in the brain of Alzheimer patients. J Neuropathol Exp Neurol 61: 815-829.

191. Nejentsev, S., Walker, N., Riches, D., Egholm, M. and Todd, J. A. (2009) Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. Science 324: 387-389.

192. Shigemoto, T., Kageyama, M., Hirai, R., Zheng, J., Yoneyama, M. and Fujita, T. (2009) Identification of Loss of Function Mutations in Human Genes Encoding RIG-I and MDA5. J Biol Chem 284: 13348-13354.

193. Smyth, D. J., Cooper, J. D., Bailey, R., Field, S., Burren, O., Smink, L. J., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Widmer, B., Dunger, D. B., Savage, D. A., Walker, N. M., Clayton, D. G. and Todd, J. A. (2006) A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. Nat Genet 38: 617-619.

194. Pindado, J., Balsinde, J. and Balboa, M. A. (2007) TLR3-dependent induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophage-like cells via a cytosolic phospholipase A2/cyclooxygenase-2 pathway. J Immunol 179: 4821–4828.

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.

THE EICOSANOID
RESEARCH DIVISION
VALLADOLID