

Inmunidad innata y fosfolipasas A₂

Jesús Balsinde

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

June 1, 2023

Nuestras investigaciones actuales se centran en las enzimas implicadas en el mantenimiento de la composición y niveles de diferentes ácidos grasos en las membranas biológicas, es decir, fosfolipasas y aciltransferasas. La familia de las fosfolipasas A₂ ha constituido tradicionalmente el eje de nuestras investigaciones. Estas enzimas generan lípidos con propiedades señalizadoras, lisofosfolípidos por un lado y ácidos grasos libres por otro, entre los que hay que destacar al ácido araquidónico. Más recientemente nos hemos centrado en la caracterización de especies moleculares de fosfolípidos que puedan servir como sustratos específicos de la acción de estas fosfolipasas A₂ en un contexto celular. Ello nos ha llevado a los plasmalógenos de etanolamina, especies celulares muy enriquecidas en ácido araquidónico. Más allá de su implicación en el metabolismo celular del ácido araquidónico y otros ácidos grasos poliinsaturados, los plasmalógenos ejercen un variado número de funciones.

Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria, Murcia, jueves 1 junio 2023 ([Slide 1](#)).

Las fosfolipasas A₂ son enzimas que actúan específicamente sobre el enlace éster presente en la posición sn-2 del esqueleto de glicerol del fosfolípido ([Slide 2 – Phospholipase A₂ Action on Phospholipids](#)). La reacción da lugar a un lisofosfolípido y un ácido graso libre, los cuales son ambos biológicamente activos. Pues bien, esta reacción es de gran importancia biológica, porque tiene consecuencias para un gran número de procesos y funciones celulares ([Slide 3 – Importance of Phospholipid Hydrolysis by Phospholipase A₂](#)). Por ejemplo, es una reacción que sirve para generar diversidad molecular; la fosfolipasa A₂ elimina un resto acilo, permitiendo que entre otro en su lugar a través de aciltransferasas específicas; esto es lo que se conoce como el ciclo de Lands y permite enriquecer las células con determinadas clases de ácidos grasos, lo que influye en sus propiedades biofísicas tales como la fluidez, etc. También, la fosfolipasa A₂ genera lisofosfolípidos cuya acumulación influye en la curvatura de una membrana, lo que es muy importante para la biogénesis de orgánulos tales como las gotas lipídicas, como veremos en un momento. Las fosfolipasas A₂ también ayudan en procesos de reparación, porque eliminan restos de ácidos grasos oxidados o truncados. Y por último, la función que haya hecho posiblemente más famosa a estas enzimas y en la que más nos hemos centrado en nuestro laboratorio: las fosfolipasas A₂ son las principales responsables de movilizar ácidos grasos poliinsaturados para la síntesis de eicosanoides y derivados de ácidos grasos omega-3 como las resolvinas, protectinas, etc, con papeles clave en inflamación. Un gran número de receptores señalizan activando fosfolipasas A₂ intracelulares que generan mensajero lipídicos ([Slide 4 – Role of Phospholipase A₂ in Arachidonic Acid Release](#)).

Hay una gran variedad de fosfolipasas A₂ en las células eucarióticas. Tal variedad hizo necesario establecer una clasificación de estas enzimas ([Slide 4 – Phospholipase A₂ Classification](#)). En realidad hay varias; una de las más útiles considera las propiedades bioquímicas de estas enzimas y es la que se muestra en esta diapositiva ([Slide 5 – Phospholipase A₂ Classification](#)). De acuerdo con esta clasificación, las fosfolipasas A₂ se agrupan en 6 grandes familias, a saber (empiezo por aquí siguiendo las agujas del reloj): las sPLA₂ o enzimas secretadas dependientes de calcio, todas ellas de bajo peso molecular; todas ellas usan un mecanismo común de catálisis utilizando la diada His/Asp; las cPLA₂ o enzimas citosólicas dependientes de calcio, de alto peso molecular y que utilizan la diada

catalítica Ser/Asp; las iPLA₂ enzimas citosólicas independientes de calcio, de alto peso molecular y que utilizan la diada catalítica Ser/Asp; las enzimas PAF-AH, cuya característica común es que hidrolizan específicamente PAF y usan la clásica tríada catalítica Ser/His/Asp; las L-PLA₂ o enzimas específicas de lisosomas y las adPLA₂ o enzimas específicas de tejido adiposo. De todas estas familias hoy voy a referirme solo a dos de ellas: sPLA₂ (V) y cPLA₂ (IV).

Comenzamos con la fosfolipasa A₂ citosólica de grupo IVA, comúnmente conocida como cPLA₂ α (**Slide 6 – Group IVA Phospholipase A₂**). Se trata de una enzima muy interesante porque tiene un poquito de todo y eso la hace muy atractiva desde muchos puntos de vista. La enzima tiene dos dominios, a la izquierda hay un dominio C2 en naranja, que es un dominio de unión de calcio y lípidos, similar al existente en numerosas proteínas, las PKCs son un claro ejemplo, y a la derecha el dominio catalítico con estructura en forma de α/β hidrolasa, característico de muchas hidrolasas, 8 láminas β conectadas por 6 hélices α . Esta enzima tiene sin embargo un dominio estructural que la hace única: la presencia de un tapa doble que protege al centro activo. No se conoce ninguna otra hidrolasa que tenga un mecanismo de tapa similar. En condiciones de reposo, esta enzima es soluble, se halla en el citosol. Cuando ocurre la activación celular, el Ca²⁺ libre citosólico aumenta, lo que hace que la enzima transloque a membranas gracias al dominio C2. Estos dos puntos violeta representan los dos átomos de Ca²⁺ que se precisan para la translocación. Dicha translocación puede ser fortalecida e incluso puede también ocurrir en condiciones de ausencia de elevaciones de calcio debido en la presencia en la proteínas de dos clusters de unión a lípidos aniónicos, uno a C1P y el otro a PIP₂. Bien, una vez que la enzima ha translocado, el dominio catalítico entra en contacto con el sustrato y lo hace abriendo la primera tapa, que son estas dos hélices α . Una vez ha ocurrido esto, la segunda tapa, en morado, se retira también, dejando al descubierto el pocket con los aminoácidos catalíticos. Una gran mayoría de hidrolasas usan la tríada Ser/Asp/His para la catálisis; la cPLA₂ α usa Ser/Asp asistidos por Arg. Y por último, la tercera gran característica única de esta enzima es que presenta una enorme predilección por fosfolípidos con AA, lo que no ocurre con ninguna otra lipasa. Esta gran predilección es consecuencia de su sitio activo tan particular que solo acomoda bien residuos poliinsaturados en configuración cis. En particular la presencia de un doble enlace en C5 parece jugar un papel importante en el reconocimiento del sustrato. Es importante enfatizar que esto no significa que la enzima no pueda hidrolizar los fosfolípidos sin AA; lo hará, pero un ritmo mucho más lento. Finalmente, otra característica importante de esta enzima es que se fosforila en Ser505, que se indica con este punto azul celeste en la figura. Esta fosforilación es necesaria para que la enzima muestre actividad plena, y es llevada a cabo por miembros de la familia MAPK, ERK, p38 y JNK y parece ser muy importante no tanto para aumentar la actividad enzimática como para mantener una configuración óptimamente activa que le permita translocarse a la membrana en cuestión. Dependiendo del tipo de la célula y del estímulo el MAPK implicado varía.

Estudios con quimeras de GFP han demostrado que la cPLA₂ α transloca de manera muy notoria a membranas perinucleares (**Slide 7 – Translocation of cPLA₂ α to Perinuclear Membranes**), pero estudios más exhaustivos y cuidadosos han mostrado que la enzima es bastante promiscua y también puede translocarse a otras membranas intracelulares. Por ejemplo, en células fagocíticas, la enzima se transloca al fagosoma, como veremos más adelante.

Esta figura muestra lo importante que es la cPLA₂ α para el proceso de movilización de ácido araquidónico mediada por receptor. Esto son células tipo macrófago RAW264.7 y estimuladas para estudiar la liberación del ácido graso, en este caso con un activador de TLR3 (aunque los macrófagos responden a muchísimos estímulos diferentes liberando ácido araquidónico). Para estudiar dicha liberación, se marcaron las células con ácido graso radiactivo y, a diferentes tiempos se ve con la marca radiactiva se libera de la célula al medio extracelular. Así es como se medía antes la liberación de ácido araquidónico; estos son experimentos antiguos, antes de tener un masas, que es como lo hacemos ahora (**Slide 8 – cPLA₂ α -Dependent Arachidonic Acid Mobilization**). Puede verse a la derecha que la activación de la liberación va a compañada por la fosforilación de la enzima. Y cuando inhibimos la cPLA₂ α por medios químicos o por knock-down con siRNA, la respuesta se inhibe por completo. Estos daos demuestran el papel fundamental de cPLA₂ α en el proceso. Estos experimentos son relativamente antiguos y se hicieron

marcando las células con ácido graso radiactivo. Precisamente en aquellos años surgió la gran revolución lipidómica y el uso cada vez más extendido de la espectrometría de masas para el análisis de lípidos. Tuvimos la suerte de subirnos a esa ola e implantar esta tecnología en nuestro laboratorio lo que nos dio la gran oportunidad de analizar especies moleculares definidas. Ello nos permitiría definir los sustratos a nivel molecular en un contexto celular; es decir, tratar de identificar posibles especies de fosfolípidos que se hidrolizaran por PLA₂ α y de este modo caracterizar la especificidad de sustrato de la enzima en la célula (**Slide 9 – Mass Spectrometry: Defined Molecular Species**).

Y en este punto, es importante recordar que no todos los glicerofosfolípidos de membrana son iguales, algo que para esta audiencia sonará muy familiar (**Slide 10 – Not All Glycerophospholipids...**). Un 80% del total de glicerofosfolípidos de membrana contienen dos ácidos grasos, pero un 20-25% que no, que solo contienen uno, porque en posición sn-2 contienen un alcohol graso (**Slide 11 – Not All Glycerophospholipids...**). Y entre estos los hay con un doble enlace conjugado al oxígeno del enlace éter; son los plasmalógenos. En las células de la inmunidad innata los plasmalógenos de etanolamina son muy abundantes: suponen un 70-75% del total de glicerofosfolípidos de etanolamina. Y lo que es más importante para nuestros intereses, constituyen un importante reservorio celular de ácidos grasos poliinsaturados en las células del sistema inmune. Esta figura muestra la composición de ácidos grasos de los plasmalógenos de etanolamina de macrófagos peritoneales de ratón (**Slide 12 – Plasmalogen Fatty Acid Composition in Murine Macrophages**). Según la naturaleza del alcohol graso en sn-1, existen tres tipos de plasmalógenos: los que contienen alcohol palmítico, alcohol oleico y alcohol esteárico. Puede verse claramente que, en todos los casos, casi todo lo que hay son poliinsaturados, siendo el ácido araquidónico, con mucho, el ácido graso más frecuente. Y si, yendo un poco más allá, observamos la distribución global de especies de ácido araquidónico entre todos los tipos de fosfolípidos de los macrófagos, puede apreciarse que los plasmalógenos se encuentran entre las especies más ricas en este ácido (**Slide 13 – Arachidonic Acid-Containing Species in Murine Macrophages**). Por tanto, parecería lógico sugerir que los plasmalógenos deben constituir una fuente importante de ácido araquidónico libre durante la activación celular (**Slide 14 – Plasmalogens Must Constitute...**).

Para estos estudios tuvimos la suerte de contar con células deficientes en plasmalógeno, generosamente donadas por el Dr. Raphael Zoeller, de la Universidad de Boston. Las células se prepararon por mutación química y selección clonal. Esta es la ruta biosintética de plasmalógenos en células de mamíferos, con la primera parte en el peroxisoma y el resto en el retículo endoplásmico (**Slide 15 – Plasmalogen Biosynthesis in Animal Cells**). Tenemos dos células mutantes de la línea celular de macrófagos RAW. La primera, llamada RAW.108, carece de la primera enzima de la vía (**Slide 15 – Plasmalogen Biosynthesis in Animal Cells**), y la segunda, llamada RAW.12, carece de la misma enzima, y también la desaturasa final PEDS-1 que tan familiar resultará a muchos de los presentes (**Slide 16 – Plasmalogen Biosynthesis in Animal Cells**). Lo primero que hicimos fue confirmar mediante LC-MS que efectivamente estas células carecían de plasmalógenos. Puede verse en esta diapositiva (**Slide 17 – Phospholipid Species Composition of Plasmalogen-Deficient Cells**) que las dos células mutantes carecían no solo de plasmalógenos sino también de éteres de PC, como era de esperar. Lo interesante aquí es que hay una elevación compensatoria en los niveles de diacilfosfolípidos portadores de AA, por lo que el resultado final es que los mutantes contienen los mismos niveles de AA y de otros ácidos grasos que las células normales. La cantidad total de ácido araquidónico celular y su distribución por clases de fosfolípidos, medida por GC-MS, tampoco cambia (**Slide 18 – Phospholipid Fatty Acid Composition of Plasmalogen-Deficient Cells**). Por lo tanto, parece claro que los mutantes compensan su deficiencia en fosfolípidos con éter produciendo más diacilfosfolípidos portadores de ácido araquidónico, algo que, bien pensado, tiene bastante sentido. En los siguientes experimentos medimos la liberación de AA en estas células después de estimulación con un estímulo clásico como es el zimosa y, para nuestra sorpresa, los mutantes liberan la misma cantidad de ácidos grasos que las células normales (**Slide 19 – AA Release by Plasmalogen-Deficient Cells**). Y en consonancia con estos datos, tampoco se vio ninguna diferencia en la producción de eicosanoides, tanto en cantidad como en calidad (**Slide 20 – Eicosanoid Production by Plasmalogen-Deficient Cells**). Así pues, la conclusión obvia de estos experimentos,

tan sorprendente como inesperada, es que los plasmalógenos no tienen influencia alguna en la respuesta de movilización de ácido araquidónico ni su ulterior conversión a eicosanoides (**Slide 21 – Cellular Plasmalogen Status Has No Influence...**). Lo que nos deja, entre otras cosas, con la pregunta sin responder de para qué pueden servir los plasmalógenos, qué papel biológico tienen.

Y la búsqueda de una respuesta a esta pregunta nos lleva a la segunda historia sobre plasmalógenos que quiero contar hoy, que trata de fagocitosis (**Slide 22 – Macrophage Polarization and Phagocytosis**). Dependiendo del entorno, los macrófagos pueden encontrarse en dos estados diferentes de activación, lo que se denomina polarización (**Slide 23 – Polarized Activation of Macrophages**). Por un lado está la respuesta clásica o M1, que lleva a los macrófagos a adquirir un fenotipo proinflamatorio y se desencadena por estímulos como LPS o $IFN\gamma$ y conduce a la secreción de citoquinas proinflamatorias como las indicadas en la figura; y por otro lado está la M2 o respuesta alternativa, antiinflamatoria, pro-resolutiva, IL-4 es el estímulo típico y finalmente conduce a la regulación positiva de genes antiinflamatorios como IL-10, $TGF\alpha$ o ARG-1 entre otros. Bien, pues lo primero que se nos ocurrió fue pensar en que pasaría con la expresión de las fosfolipasas A_2 de los macrófagos bajo condiciones de polarización. Entonces, estimulamos las células con LPS + $IFN\gamma$ para obtener macrófagos M1 e IL-4 para obtener macrófagos M2 (**Slide 24 – Expression of PLA_2 s During Human Macrophage Polarization**) y después analizamos por qPCR la expresión de los diferentes genes. Y lo que nos encontramos fue algo inesperado. Solo una fosfolipasa A_2 varió significativamente, la $sPLA_2-V$, y lo hizo en condiciones M2. Se comprobó por inmunoblot que la inducción del gen de $sPLA_2-V$ conduce a un incremento dependiente del tiempo de la proteína (**Slide 25 – Induction of $sPLA_2-V$ Protein During Macrophage Activation by IL-4**). Para verificar si esta inducción es algo particular de la IL-4 o es un rasgo general de la polarización a M2, probamos a continuación otros estímulos que también polarizan a M2, como son el C-MSF y la IL-10 (**Slide 26 – Induction of $sPLA_2-V$ Protein by Other M2 Stimuli**). En ambos casos, la $sPLA_2-V$ incrementó de forma bastante clara, lo que indica que la $sPLA_2-V$ es realmente un buen marcador del estado de activación M2. Bien, pues en la siguiente diapositiva os presento a la $sPLA_2-V$, la segunda fosfolipasa A_2 de la que voy a hablar hoy (**Slide 27 – Group V Phospholipase A_2**). Es muy diferente a la que presenté anteriormente, la $cPLA_2\alpha$. Aspecto muy importante: aunque se llame secretada, estas enzimas pueden funcionar, de hecho lo hace, dentro de las células. De bajo peso molecular y aspecto muy compacto, necesita niveles milimolares de calcio para la catálisis (bola magenta) y utiliza una diada His/Asp. Nótese por último que la enzima ataca al fosfolípido desde la cabeza polar, es decir no ve el ácido graso que va a cortar y esto explica por qué no muestra prácticamente especificidad por lo que respecta al ácido graso. Sí la muestran algo con respecto a la cabeza polar; por ejemplo la de grupo V que nos ocupa ataca mal fosfatidilcolina porque en la zona de interacción con el fosfolípido la enzima presenta aminoácidos hidrofóbicos que no se llevan bien con la carga positiva de la colina.

Cuáles son las consecuencias funcionales de este incremento de $sPLA_2-V$ inducido por IL-4? Una de las características funcionales más evidentes de los macrófagos polarizados a M2 es el incremento de su capacidad fagocítica. Por tanto, analizamos la capacidad de estas células para fagocitar zimosán, que es un homogeneizado de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae* en presencia y ausencia de $sPLA_2-V$ (**Slide 28 – $sPLA_2-V$ Depletion Inhibits IL-4- Stimulated Zymosan Phagocytosis**). Como puede verse en la diapositiva, las células tratadas con IL-4 fagocitan mucho más zimosán que las células sin tratar. Cuando se usaron células deficientes en $sPLA_2-V$, dicho incremento no se observa. En la siguiente diapositiva se muestra el experimento contrario, el efecto de sobreexpresar la $sPLA_2-V$ sobre la capacidad fagocítica de las células (**Slide 29 – $sPLA_2-V$ Overexpression Increases Zymosan Phagocytosis**). Puede apreciarse que, simplemente sobreexpresando la enzima, la capacidad fagocítica de las células incrementa tanto como si las células se hubieran tratado con IL-4, haciendo pues innecesario el tratamiento con IL-4 para observar el mismo nivel de respuesta.

La $sPLA_2-V$ es una enzima y por tanto, la cuestión obvia a investigar sería verificar si esos incrementos de la capacidad fagocítica de las células están relacionados con cambios en el contenido fosfolipídico de las células (**Slide 30 – Do these effects correlate with changes in phospholipid content?**). Para responder a esta pregunta procedimos a analizar el contenido fosfolipídico de estas células mediante cromatografía de líquidos acoplada a

espectrometría de masas. Utilizamos células deficientes en sPLA₂-V por siRNA. La siguiente diapositiva muestra el contenido celular de las especies mayoritarias de PC (**Slide 31 – Choline Phospholipid (PC) Species in IL-4-Treated Human Macrophages**) en células tratadas o no con IL-4 y con niveles normales o reducidos de sPLA₂-V. En ningún caso pudimos apreciar ninguna diferencia significativa. Tampoco observamos nada apreciable cuando analizamos fosfolípidos de etanolamina (**Slide 32 – Ethanolamine Phospholipid (PE) Species in IL-4-Treated Human Macrophages**) o de inositol (**Slide 33 – Phosphatidylinositol (PI) Species in IL-4-Treated Human Macrophages**). Estos experimentos se hicieron en macrófagos humanos, que son células muy grandes y tienen una enorme cantidad de lípidos; por tanto si la respuesta a IL-4 no es muy extensa el efecto se vería apantallado por la gran cantidad de lípido presente. Finalmente se nos ocurrió mirar el contenido celular en lisofosfolípidos, que son un producto directo de la acción de la sPLA₂-V y además su contenido celular es necesariamente menor (**Slide 34 – Lysophospholipid Species in IL-4-Treated Human Macrophages**). De nuevo, no se observaron diferencias entre las células tratadas con IL-4 frente a las control; sin embargo, cuando examinamos las células deficientes en sPLA₂-V se observó un cambio muy llamativo, resaltado por las flechas rojas. Los niveles de todas las especies de lisoPE disminuyeron significativamente. Téngase en cuenta que la disminución de los niveles de lisoPE se observa en las células tratadas con IL-4, pero no en las células no tratadas, lo que indica que esta bajada está relacionada con el estado de activación de la célula. En otras palabras, en las células tratadas con IL-4 la sPLA₂-V es necesaria para mantener los niveles de lisoPE (**Slide 35 – LysoPE levels are maintained by sPLA₂-V in IL-4-treated cells**).

Entonces, ¿cuál es la consecuencia biológica de este hallazgo? Para responder a esto volvimos a nuestro ensayo de fagocitosis y lo que tratamos de determinar fue si la adición de lisoPE exógena (se usó un lisoplasmalógeno!) tiene algún efecto sobre la fagocitosis (**Slide 36 – LysoPE Restores Phagocytosis in sPLA₂-V-Deficient Cells - Zymosan**). Igual que antes, la IL-4 aumentó la fagocitosis de las partículas de zimósán y la presencia de lisoPE no mostró ningún efecto significativo. Pero, ¿qué sucede si usamos células deficientes en sPLA₂-V? (**Slide 37 – LysoPE Restores Phagocytosis in sPLA₂-V-Deficient Cells - Zymosan**). La respuesta de IL-4 se inhibe y la adición de lisoPE restaura casi por completo la respuesta, por lo que lisoPE sustituye a sPLA₂-V en estas condiciones. Este experimento se repitió usando esta vez bacterias vivas, E. coli, como estímulo fagocítico, y los resultados fueron los mismos, de hecho se ve incluso mejor; lisoPE restauró el efecto IL-4 en células deficientes en sPLA₂-V (**Slide 38 – LysoPE Restores Phagocytosis in sPLA₂-V-Deficient Cells - Bacteria**). La siguiente diapositiva muestra que este efecto de lisoPE es específico, ya que ningún otro lisofosfolípido, lisoPC o lisoPI, lo reproduce (**Slide 39 – LPC and LPI Do Not Restore Phagocytosis in sPLA₂-V-Deficient Cells**). Por tanto, como conclusión de esta parte de la charla, hemos visto que lisoPE participa de modo clave en el incremento de la actividad fagocítica de los macrófagos polarizados a M2 y que este metabolito es producido por sPLA₂-V (**Slide 40 – LysoPE is involved in IL-4-induced phagocytosis**).

Para profundizar en estos efectos de sPLA₂-V, pensamos que podría ser importante investigar la compartimentación de la síntesis de lisoPE, es decir, en qué parte de la célula se produce esta lisoPE o, en otras palabras, determinar la localización subcelular de la enzima que lo está produciendo. Con este fin utilizamos células transfectadas con sPLA₂-V unidas a EGFP (**Slide 41 – sPLA₂-V Does Not Translocate to the Phagosome in Human Macrophages**). En la célula en reposo puede verse que el citoplasma está salpicado de puntos verdes que probablemente representan gránulos secretores. Cuando tratamos las células con zimósán para que comience la fagocitosis, los puntos verdes de sPLA₂-V en el citoplasma desaparecen muy probablemente porque la enzima se está secretando, pero no vemos ninguna acumulación de color verde alrededor de las partículas, lo que sugiere que la enzima no interacciona significativamente con el fagosoma. Esto es algo que nos sorprendió, ya que trabajos anteriores de otros habían demostrado que sPLA₂-V se transloca al fagosoma en macrófagos de ratón. Otra notable diferencia entre las células humanas y de ratón.

Este comportamiento de la sPLA₂-V también contrasta fuertemente con el de la cPLA₂α, a la que hacemos regresar a la charla, que se transloca al fagosoma (**Slide 42 – cPLA₂α Translocates to the Phagosome in Human Macrophages**). Estos son macrófagos humanos transfectados con EGFP-cPLA₂α, expuestos a zimósán en rojo. Se

puede ver claramente el desplazamiento de la enzima al fagosoma, que se aprecia aún mejor en pseudocolor. Y ya que estamos con la cPLA₂α, diremos que si lo que transfectamos es una cPLA₂α mutante que no se puede fosforilar porque le hemos reemplazado la Ser⁵⁰⁵ por una Ala, la enzima no transloca (**Slide 43 – S505A cPLA₂α Mutant Does Not Translocate to the Phagosome**), lo que demuestra la importancia de la translocación para que esta enzima manifieste su funcionalidad. En la parte superior de la figura se muestra mismo que en la anterior, translocación de la enzima. Pero si se usa un mutante S505A, que previene la fosforilación, la enzima no se transloca en absoluto.

Y bueno, ¿qué está haciendo cPLA₂α en el fagosoma? Los resultados que tenemos a este respecto son ciertamente sorprendentes (**Slide 44 – cPLA₂α Inhibition Modifies the Pattern of Phagosome Internalization**). En la parte superior se muestra un macrófago después de 2 h de exposición a zimosán; las partículas fagocitadas parecen estar concentradas en el interior de la célula, alrededor del núcleo. Sin embargo, si usamos pirrofenona, un inhibidor de cPLA₂α, hay muchas partículas alrededor del núcleo, pero también hay muchas dispersas alrededor del citoplasma. Y si usamos células deficientes en cPLA₂α por siRNA, vemos lo mismo, muchas células dispersas alrededor del citoplasma. Aquí a la derecha está la cuantificación. Con todo esto podemos mostrar un esquema como el que se muestra en esta diapositiva (**Slide 45 – Distinct Roles for sPLA₂-V and cPLA₂α in Regulating Phagocytosis**), que indica que hay dos fosfolipasas A₂ implicadas en fagocitosis en macrófagos humanos. Por un lado, la sPLA₂-V que no sabemos exactamente dónde está funcionando. Especulamos quizás en la membrana plasmática, cerca del fagosoma, donde hidroliza PE para generar lisoPE, que es necesario para regular la extensión o cantidad de partículas ingeridas. Por otro lado, tenemos la cPLA₂α, que interacciona con el fagosoma y de alguna manera regula la internalización de las partículas. Y una última pregunta que me gustaría abordar en este tema es si estas dos enzimas interaccionan, si hay algún tipo de cross-talk entre ellas. Y la respuesta es sí, hay interacción. Si tomamos células deficientes en sPLA₂-V por siRNA, las ponemos a fagocitar zimosán y examinamos el estado de fosforilación de cPLA₂α, encontramos que hay una disminución significativa; aquí a la derecha está la cuantificación. Así que esto es muy interesante porque si sPLA₂-V regula la fosforilación de cPLA₂α y la fosforilación de cPLA₂α es importante para la translocación al fagosoma, la sPLA₂-V está regulando la translocación de cPLA₂α al fagosoma (**Slide 46 – sPLA₂-V Depletion by siRNA Inhibits cPLA₂α Phosphorylation**). Por tanto como conclusión de esta parte, vemos que hay dos fosfolipasas regulando la fagocitosis pero su función no es redundante; una regula la extensión del proceso y la otra la internalización (**Slide 47 – Two Distinct Phospholipase A₂s Regulate Phagocytosis in a Non-Redundant Manner**).

Y ahora para la última parte de la charla, regresamos a nuestras líneas celulares deficientes en plasmalógeno con el fin de profundizar más en el papel de esta clase de fosfolípidos. Las células RAW no son muy buenas para fagocitar partículas de zimosán, por lo que, al igual que se hizo con los experimentos anteriores con macrófagos humanos, es necesario opsonizar el estímulo para obtener buenas respuestas. Los mutantes fagocitaron zimosán en mucha menor medida que las células normales, lo que no es especialmente sorprendente (**Slide 48 – Phagocytosis of Zymosan by Plasmalogen-Deficient Cells**). Y qué pasa cuando se realiza el ensayo de fagocitosis con células que han sido tratadas con lisoPE (lisoplasmalógeno vs lisofosfatidiletanolamina), en este caso? (**Slide 49 – LysoPlsEtn Increases Phagocytosis in Plasmalogen-Deficient Cells**). Sí, la respuesta se restaura por completo. Estos experimentos también son notables porque, en las mismas condiciones, el lisoPE (acilo) no tiene ningún efecto, por lo que está claro que el enlace éter vinílico aquí es crucial.

A continuación, con el fin de seguir explorando los efectos de los plasmalógenos en nuestros macrófagos, realizamos experimentos de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) por microscopía confocal para analizar fluidez de membrana (**Slide 50 – Analysis of Membrane Fluidity in Macrophages - FRAP**). Básicamente, lo que se hace aquí es quemar una zona definida de la membrana celular y, a continuación, medir la recuperación de la fluorescencia con el tiempo. Cuanto más fluida sea una membrana, menos tiempo tardará en recuperar la fluorescencia. Puede verse aquí que las células mutantes recuperan más fluorescencia que las normales, indicando pues que sus membranas son más fluidas. De estas medidas se puede calcular una “fracción móvil (recuperación de fluorescencia)” de modo que, cuanto mayor sea este valor, más fluida es la membrana. Cuando las células

RAW.108 se expusieron a lisoPlsEtn pero no a lisoPtdEtn, la fracción móvil de la membrana disminuyó, alcanzando valores similares a los de las células RAW 264.7 normales. Estos datos demuestran que el aumento de los niveles de plasmalógeno en las células RAW.108 reduce la fluidez de la membrana celular hasta los niveles que se encuentran en las células que muestran niveles normales de plasmalógeno (**Slide 51 – Analysis of Membrane Fluidity in Macrophages - FRAP**). Es decir, los plasmalógenos contrubeyen a rigidificar las membranas.

Y en consonancia con estos datos, se ha sugerido que los plasmalógenos de etanolamina son constituyentes frecuentes de las balsas lipídicas de membrana, que son microdominios de membrana que compartimentan los procesos celulares y sirven como centros organizadores para el ensamblaje de moléculas de señalización (**Slide 52 – Plasmalogens Accumulate in Lipid Rafts**). Se ha reportado igualmente que las balsas lipídicas se pueden visualizar con la subunidad B de la toxina del cólera (CT-B) marcada con Alexa Fluor 647, que se une al gangliósido GM1 presente en las balsas lipídicas. Así pues, en la siguiente serie de experimentos, se llevó a cabo un análisis por microscopía confocal de balsas lipídicas de los macrófagos para determinar la influencia del contenido de plasmalógeno en estas estructuras, así como su relación con la fagocitosis. Esta figura muestra que el tratamiento de células RAW 264.7 o células RAW.108 con lisoPlsEtn, pero no con lisoPtdEtn, aumentó tanto el número como el tamaño de las balsas lipídicas en los dos tipos de células de manera similar (**Slide 53 – LysoPlsEtn Increases the Number and Size of Lipid Rafts - Unstim**). Se obtuvo el mismo resultado con células fagocitando (**Slide 54 – LysoPlsEtn Increases the Number and Size of Lipid Rafts – Perlas de látex**). En estos experimentos de fagocitosis, se utilizaron perlas de látex opsonizadas como estímulo en lugar de zimósán, porque la autofluorescencia de este último interfiere con la señal de CT-B marcada con Alexa Fluor 647.

Y para finalizar, nuevamente en consonancia con lo anterior, el tratamiento con lisoPlsEtn de las células RAW.108 aumentó la fosforilación/activación de las quinasas p44ERK y p42ERK, sugieren que los plasmalógenos refuerzan la señalización intracelular que originan los receptores fagocíticos, lo que puede ser decisivo para una óptima fagocitosis (**Slide 55 – Lysophospholipid Effects on MAPK Signaling**).

Entonces, como conclusión de mi charla, podemos decir que, contrariamente a todas las expectativas, la presencia o no de plasmalógenos en las células no ejerce influencia alguna en la respuesta de producción de eicosanoides de los macrófagos. Pero, por otro lado, los plasmalógenos parecen ser clave para la fagocitosis. Los niveles de plasmalógeno determinan las propiedades de los lípidos de la membrana que pueden ser esenciales para una respuesta fagocítica adecuada (**Slide 56 – Cellular Plasmalogen Status Determining Specific Responses**). Existe por tanto una especificidad biológica sobre la que debemos seguir investigando.

Para concluir, agradecer a la “plasmalogen crew” de mi laboratorio... (**Slide 57 – Acknowledgments**). Gracias también a nuestros colaboradores y patrocinadores (**Slide 58 – Acknowledgments**). A continuación se incluye una amplia lista de artículos relevantes de nuestro laboratorio directamente relacionados con el tema desarrollado en esta comunicación.

REFERENCES

1. Casas, J., M. A. Gijón, A. G. Vigo, M. S. Crespo, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 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.
2. Pindado, J., J. Balsinde, and M. A. Balboa. 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.
3. Balsinde, J., M. V. Winstead, and E. A. Dennis. 2002. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid

mobilization. *FEBS Lett.* 531: 2-6.

4. Balsinde, J., and M. A. Balboa. 2005. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in activated cells. *Cell. Signal.* 17: 1052–1062.
5. Balboa, M.A., and J. Balsinde. 2006. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 385–391 .
6. Casas, J., M.A. Gijón, A.G. Vigo, M.S. Crespo, J. Balsinde, and M.A. Balboa. 2006. Overexpression of cytosolic group IVA phospholipase A₂ protects cells from calcium-dependent death. *J. Biol. Chem.* 281: 6106–6116.
7. Ruipérez, V., J. Casas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2007. Group V phospholipase A₂-derived lysophosphatidylcholine mediates cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* 179: 631–638.
8. Astudillo, A.M., M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A₂ enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* 1864: 772–783.
9. Pérez-Chacón, G., A. M. Astudillo, D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A₂ and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 1103-1113.
10. Astudillo, A. M., D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim Biophys. Acta* 1821: 249-256.
11. Gil-de-Gómez, L., A.M. Astudillo, C. Guijas, V. Magrioti, G. Kokotos, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 192: 752-762.
12. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, C. Meana, J. M. Rubio, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2013. A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses. *J. Immunol.* 190: 5169–5177.
13. Casas, J., C. Meana, E. Esquinas, M. Valdearcos, J. Pindado, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2009. Requirement of JNK-mediated phosphorylation for translocation of group IVA phospholipase A₂ to phagosomes in human macrophages. *J. Immunol.* 183: 2767–2774.
14. Casas, J., M. Valdearcos, J. Pindado, J. Balsinde, and M.A. Balboa. 2010. The cationic cluster of group IVA phospholipase A₂ (Lys⁴⁸⁸/Lys⁵⁴¹/Lys⁵⁴³/Lys⁵⁴⁴) is involved in translocation of the enzyme to phagosomes in human macrophages. *J. Lipid Res.* 51: 388–399.
15. Balgoma, D., A. M. Astudillo, G. Pérez-Chacón, O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J. Immunol.* 184: 3857–3865.
16. Balgoma, D., O. Montero, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Lipidomic approaches to the study of phospholipase A₂-regulated phospholipid fatty acid incorporation and remodeling. *Biochimie* 92: 645–650.
17. Astudillo, A. M., G. Pérez-Chacón, D. Balgoma, L. Gil-de-Gómez, V. Ruipérez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacylase activity in human monocytes and U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1811: 97–103.
18. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2011. Subcellular localization and cellular role of lipin-1 in human macrophages. *J. Immunol.* 186: 6004–6013.
19. Astudillo, A. M., G. Pérez-Chacón, C. Meana, D. Balgoma, A. Pol, M. A. del Pozo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Altered arachidonate distribution in macrophages from caveolin-1 null mice leading to reduced eicosanoid synthesis. *J. Biol. Chem.* 286: 35299–35307.
20. Guijas, C., A. M. Astudillo, L. Gil-de-Gómez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Phospholipid sources for adrenergic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages: comparison with arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 1386–1393.

21. Monge, P.; Garrido, A.; Rubio, J.M.; Magrioti, V.; Kokotos, G.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. The contribution of cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s to adrenergic acid mobilization in murine macrophages. *Biomolecules* **2020**, *10*, 542.
22. Ruipérez, V., A. M. Astudillo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Coordinate regulation of TLR-mediated arachidonic acid mobilization in macrophages by group IVA and group V phospholipase A₂s. *J. Immunol.* **182**: 3877–3883.
23. Pérez-Chacón, G., A. M. Astudillo, V. Ruipérez, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Signaling role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in receptor-regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes. *J. Immunol.* **184**: 1071-1078.
24. Guijas, C., G. Pérez-Chacón, A. M. Astudillo, J. M. Rubio, L. Gil-de-Gómez, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A₂-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J. Lipid Res.* **53**: 2343–2354.
25. Pérez, R., X. Matabosch, A. Llebaria, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2006. Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J. Lipid Res.* **47**: 484-491.
26. Lebrero, P., A.M. Astudillo, J.M. Rubio, L. Fernández-Caballero, G. Kokotos, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Cellular plasmalogen content does not influence arachidonic acid levels or distribution in macrophages: a role for cytosolic phospholipase A₂γ in phospholipid remodeling. *Cells* **8**: 799.
27. Astudillo, A. M., C. Meana, C. Guijas, L. Pereira, R. Lebrero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2018. Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *J. Lipid Res.* **59**: 237–249.
28. Guijas, C., J. P. Rodríguez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Phospholipase A₂ regulation of lipid droplet formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**: 1661–1671.
29. Rubio, J. M., J. P. Rodríguez, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2015. Group V secreted phospholipase A₂ is up-regulated by interleukin-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids. *J. Immunol.* **194**: 3327–3339.
30. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, P. Lebrero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2017. Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release. *Front. Immunol.* **8**: 1251.
31. Rubio, J. M., A. M. Astudillo, J. Casas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2018. Regulation of phagocytosis in macrophages by membrane ethanolamine plasmalogens. *Front. Immunol.* **9**: 1723.
32. Gil-de-Gómez, L., P. Monge, J.P. Rodríguez, A.M. Astudillo, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. Phospholipid arachidonic acid remodeling during phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. *Biomedicine* **8**: 274.
34. Balboa, M. A., and J. Balsinde. 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.
35. Pérez, R., R. Melero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 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.
36. Guijas, C., C. Meana, A. M. Astudillo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2016. Foamy monocytes are enriched in cis-7-hexadecenoic fatty acid (16:1n-9), a possible biomarker for early detection of cardiovascular disease. *Cell Chem. Biol.* **23**: 689–699.
37. Rodríguez, J. P., C. Guijas, A. M. Astudillo, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Sequestration of 9-hydroxystearic acid in FAHFA (fatty acid esters of hydroxy fatty acids) as a protective mechanism for colon carcinoma cells to avoid apoptotic cell death. *Cancers* **11**: 524.
38. Balsinde, J. 2002. Roles of various phospholipases A₂ in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem. J.* **364**: 695–702.
39. Fuentes, L., R. Pérez, M.L. Nieto, J. Balsinde, and M.A. Balboa. 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.

40. Gubern, A., J. Casas, M. Barceló, D. Barneda, X. de la Rosa, R. Masgrau, F. Picatoste, J. Balsinde, M. A. Balboa, and E. Claro. 2008. Group IVA phospholipase A₂ is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 283: 27369–27382.
41. Gubern, A., M. Barceló, J. Casas, D. Barneda, R. Masgrau, F. Picatoste, J. Balsinde, M. A. Balboa, and E. Claro. 2009. Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 284: 5697–5708.
42. Gubern, A., M. Barceló, D. Barneda, J. M. López, R. Masgrau, F. Picatoste, C. E. Chalfant, J. Balsinde, M. A. Balboa, and E. Claro. 2009. JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 284: 32359–32369.
43. Peña, L., C. Meana, A. M. Astudillo, G. Lordén, M. Valdearcos, H. Sato, M. Murakami, J. Balsinde, and M.A. Balboa. 2016. Critical role for cytosolic group IVA phospholipase A₂ in early adipocyte differentiation and obesity. *Biochim. Biophys. Acta* 1861: 1083–1095.
44. Astudillo, A.M., J.P. Rodríguez, C. Guijas, J.M. Rubio, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2021. Choline glycerophospholipid-derived prostaglandins attenuate TNF α gene expression in macrophages via a cPLA₂ α /COX-1 pathway. *Cells* 10: 447.
45. Balboa, M.A., and Balsinde, J. 2021. Phospholipases: from structure to biological function. *Biomolecules* 11: 428
46. Bermúdez M.A., M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2021. Lipid droplets, phospholipase A₂, arachidonic acid, and atherosclerosis. *Biomedicines* 9: 1891.
47. Bermúdez, M.A., Pereira, L., Fraile, C., Valerio, L., Balboa, and J. Balsinde. 2022. Roles of palmitoleic acid and its positional isomers, hypogeic and sapienic acids, in inflammation, metabolic diseases and cancer. *Cells* 11: 2146.
48. Bermúdez, M.A., Rubio, J.M., Balboa, M.A. & Balsinde, J. 2022. Differential mobilization of the phospholipid and triacylglycerol pools of arachidonic acid in murine macrophages. *Biomolecules* 12: 1851.
49. Casas, J., J. Balsinde, and M.A. Balboa. 2022. Phosphorylation of cPLA₂ α at Ser⁵⁰⁵ is necessary for its translocation to PtdInsP₂-enriched membranes. *Molecules* 27: 2347.
50. Guijas, C., M.A. Bermúdez, C. Meana, A.M. Astudillo, L. Pereira, L. Fernández-Caballero, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Neutral lipids are not a source of arachidonic acid for lipid mediator signaling in human foamy monocytes. *Cells* 8: 941.
51. Rodríguez, J.P., E. Leiguez, C. Guijas, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, C. Teixeira, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. A lipidomic perspective of the action of group IIA secreted phospholipase A₂ on human monocytes: lipid droplet biogenesis and activation of cytosolic phospholipase A₂ α . *Biomolecules* 10: 891.
52. Astudillo, A.M., C. Meana, M.A. Bermúdez, A. Pérez-Encabo, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. Release of anti-inflammatory palmitoleic acid and its positional isomers by mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* 8: 480.
53. Diez, E., J. Balsinde, M. Aracil, and A. Schüller. 1987. Ethanol induces release of arachidonic acid but not synthesis of eicosanoids in mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 921: 82–89.
54. Balsinde, J., B. Fernández, and E. Diez. 1990. Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C. *J. Immunol.* 144: 4298–4304.
55. Balsinde, J., B. Fernández, J.A. Solís-Herruzo, and E. Diez. 1992. Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1136: 75–82.
56. Balsinde, J. 1993. Mechanism of arachidonic acid liberation in ethanol-treated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1169: 54–58.
57. Balsinde, J., B. Fernández, and J.A. Solís-Herruzo. 1994. Ethanol inhibits zymosan-stimulated eicosanoid production in mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1210: 195–201.
58. Balsinde, J., B. Fernández, and J.A. Solís-Herruzo. 1994. Increased incorporation of arachidonic acid into phospholipids in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Biochem.* 221: 1013–1018.
59. Balsinde, J., and E.A. Dennis. 1996. The incorporation of arachidonic acid into triacylglycerol in P388D₁

macrophage-like cells. *Eur. J. Biochem.* 235: 480–485.

60. Johnson, C.A., M.A. Balboa, J. Balsinde, and E.A. Dennis. 1999. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidate phosphohydrolase in human amnionic WISH cells. *J. Biol. Chem.* 274: 27689–27693.
61. Balboa, M.A., J. Balsinde, E.A. Dennis, and P.A. Insel. 1995. A phospholipase D-mediated pathway for generating diacylglycerol in nuclei from Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 270: 11738–11740.
62. Balboa, M.A., J. Balsinde, and E.A. Dennis. 2000. Phosphorylation of cytosolic group IV phospholipase A_2 is necessary but not sufficient for arachidonic acid release in P388D₁ macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 145–148.
63. Balboa, M.A., J. Balsinde, C.J. Johnson, and E.A. Dennis. 1999. Regulation of arachidonic acid mobilization in lipopolysaccharide-activated P388D₁ macrophages by adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 274: 36764–36768.
64. Astudillo, A.M., Balboa, M.A. & Balsinde, J. 2023. Compartmentalized regulation of lipid signaling in oxidative stress and inflammation: Plasmalogens, oxidized lipids and ferroptosis as new paradigms of bioactive lipid research. *Prog. Lipid Res.* 89: 101207.

