



RATONES KNOCK-OUT DEL RECEPTOR LPA1 DE ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO PRESENTAN UN ACUSADO DÉFICIT DE LA ISOENZIMA GLUTAMINASA KGA (GLS) Y UNA MORFOLOGÍA ALTERADA EN LAS ESPINAS DENDRÍTICAS DE HIPOCAMPO Y CORTEZA

A. Peñalver¹, J.A. Campos-Sandoval¹, R. Sánchez-Varo², C. Cardona¹, L. Castilla¹, E. Blanco³, M. Martín-Rufián¹, J.A. Segura¹, J.M. Matés¹, F. J. Alonso¹, A. Gutiérrez², F. Rodríguez de Fonseca³, J. Márquez¹.

¹Dpto. Biología Molecular y Bioquímica Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga. Red RETICS de trastornos adictivos (RTA). Instituto de Investigación Biomédica (IBIMA) ²Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. IBIMA. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). ³Laboratorio de Medicina Regenerativa, Instituto de Investigación Biomédica (IBIMA), Complejo Hospitalario de Málaga (Hospital Carlos Haya), Pabellón de Gobierno, Málaga.

INTRODUCCIÓN

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un importante mediador fosfolipídico que actúa como señal extracelular activando a receptores acoplados a proteínas G. Se han descrito al menos seis tipos de receptores de LPA, de los cuales el LPA1 es el mejor caracterizado. LPA1 media sus respuestas a través de tres tipos de proteína G α : G α i/o, G α q/11 y G α 12/13 (Fig.1), y se ha relacionado con algunas importantes funciones fisiológicas entre las que destacan el desarrollo y la plasticidad neuronal. Como es bien conocido, el aminoácido glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador del cerebro y un importante mediador de la plasticidad sináptica requerida para adaptar el comportamiento de los organismos a los cambios producidos en el medio ambiente. Estudios previos de nuestro grupo con modelos de ratones knock-out (KO) del receptor LPA1 han puesto de manifiesto un acusado descenso de la expresión de la principal enzima responsable de la síntesis del Glu neuronal, la glutaminasa (GA) (isoforma KGA codificada por el gen *GLS*), tanto en corteza prefrontal como en hipocampo de animales KO. Estos resultados sugieren que la expresión de KGA guarda alguna relación con la transmisión de señales mediada por el receptor LPA1, si bien los detalles moleculares de este hecho están aún por determinar.

OBJETIVOS

En este trabajo continuamos el análisis de la relación entre la expresión de la enzima GA y la señalización mediada a través del receptor LPA1. Empleando como modelo ratones KOLPA1, hemos estudiado el patrón de isoenzimas GA comparado con su expresión en ratones silvestres (WT), mediante técnicas inmunohistoquímicas, PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), Western blot (WB) y medidas de actividad enzimática. Asimismo se han realizado tinciones de Golgi de cortes de cerebro de ambos animales para intentar relacionar los cambios de expresión GA observados con procesos de arborización y desarrollo de espinas dendríticas en neuronas corticales y del hipocampo.

RESULTADOS

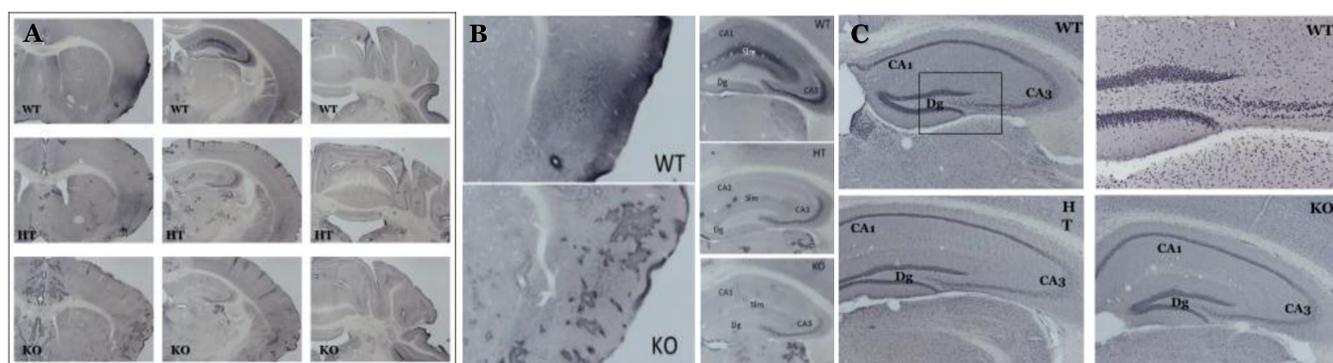


Fig 2. Expresión de isoenzimas GA en cerebro de ratones WT y KOLPA1 (A) Inmunotinción con anticuerpos KGA específicos. Puede observarse una disminución en los niveles de proteína en todas las áreas cerebrales estudiadas, particularmente en corteza e hipocampo. (B). Detalle de inmunorreactividad positiva en corteza e hipocampo a 10x. WT: animales silvestres (wild-type); KO, animales homocigotos KO para LPA1; HT, animales heterocigotos. (C) Detalle de inmunorreactividad positiva en hipocampo con anticuerpos anti-GA GLS2 específicos a 10x. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de las isoenzimas GLS2.

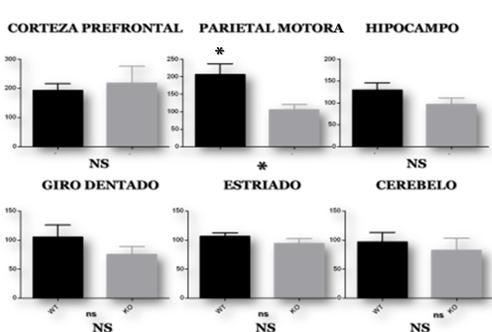


Fig 3. Medida de actividad GA total.

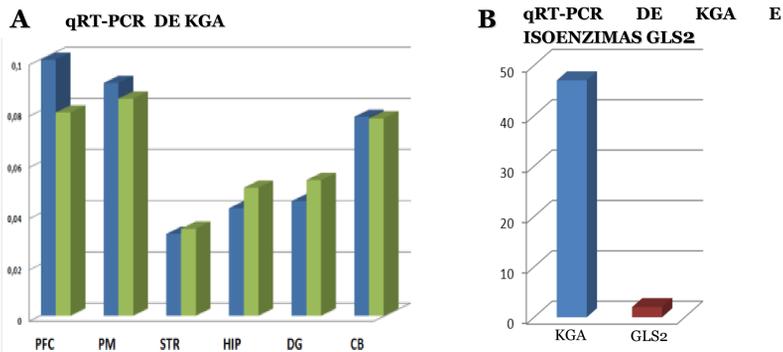


Fig 4. qRT-PCR de mRNA de GA en cerebro de ratones WT y KOLPA1

Fig 3. Análisis de actividad enzimática GA mediante determinación del amonio en las distintas áreas cerebrales. Sólo se observaron diferencias significativas en corteza parietal motora entre ratones KOLPA1 y WT. Los resultados se muestran como actividad GA específica (unidades internacionales por mg de proteína) y fueron analizados con el test de Mann Whitney (media \pm SEM; n=10; *p<0.05).

Fig 4. qRT-PCR de mRNA de GA (A) Niveles de mRNA de KGA, normalizados frente a β -actina, en las distintas regiones analizadas de cerebro de ratones WT (azul) y KOLPA1 (verde). (B). Cuantificación de los valores absolutos de mRNA de KGA (azul) y GLS2 (rojo) en cerebro total de ratones C57/Bl6 empleando poli(A⁺) mRNA y normalización frente a β -actina. PFC: corteza prefrontal; PM, corteza parietal motora; STR, estriado; HIP, hipocampo; DG, giro dentado; CB, cerebelo.

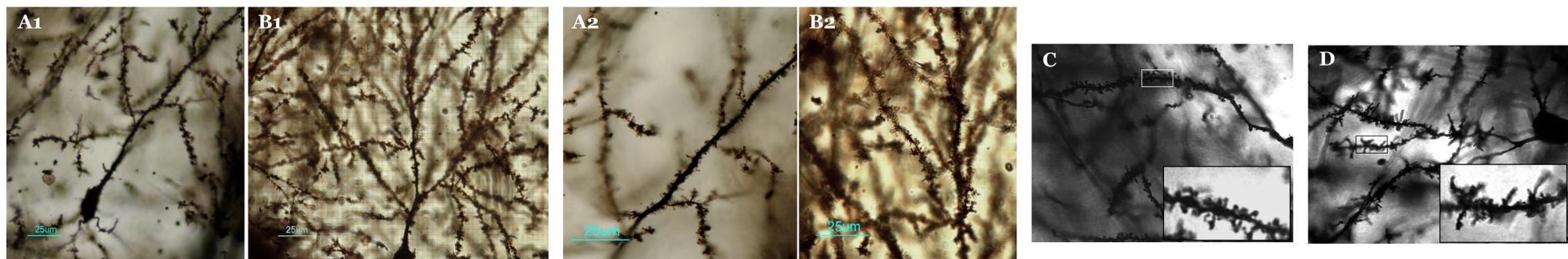


Fig 5. Tinción de Golgi de cortes de cerebro de ratones WT (A) y KOLPA1 (B). Se muestran neuronas piramidales del hipocampo, fotografiadas a 40x (1) y 60x (2). Aunque no se aprecian cambios en la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas de ratones KOLPA1, se ha podido observar un cambio fenotípico. En los ratones KOLPA1 (D) se observan mayor número de espinas filamentosas, asociado a un estadio más inmaduro, comparado con los ratones WT (C). Las figuras C y D muestran en detalle de las espinas dendríticas basales de CA1, fotografiadas a 63x.

CONCLUSIONES

- Existe una disociación entre los niveles de mRNA y proteína para la isoenzima KGA en cerebro de ratones KOLPA1. Mientras los niveles de proteína disminuyen en importantes regiones glutamatérgicas del cerebro (corteza e hipocampo) de los animales heterocigotos y KOLPA1 respecto a los silvestres, los niveles de mRNA se mantienen constantes. Al contrario de lo observado con KGA no se aprecian cambios cualitativos en la expresión de isoenzimas GLS2.
- Se ha observado una disminución significativa de actividad GA en la corteza parietal motora de animales KOLPA1.
- Existe una diferencia morfológica en las espinas dendríticas de los animales KOLPA1 con respecto a los WT. Se podría especular un posible papel de KGA en estos cambios, de tal forma que una regulación a la baja de esta proteína conlleve una regresión a un estado más inmaduro de las espinas dendríticas hipocámpales y de corteza alterando la plasticidad sináptica. Actualmente analizamos marcadores pre- y postsinápticos de dendritas para detectar alteraciones en su expresión.

REFERENCIAS

- Olalla et al. (2002). Nuclear localization of L-glutaminase in mammalian brain. J. Biol. Chem. 277, 38939-38944.
- Márquez et al. (2006). Glutaminase: a multifaceted protein not only involved in generating glutamate. Neurochem. Int. 48, 465-471.
- Márquez et al. (2009). New insights into brain glutaminases: Beyond their role on glutamatergic transmission. Neurochem. Int. 55, 64-70.
- Blanco et al. (2012). Attenuation of cocaine-induced conditioned locomotion is associated with altered expression of hippocampal glutamate receptors in mice lacking LPA1 receptors. Psychopharmacology 220, 27-42.
- Spohr et al. (2008). Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation. J. Biol. Chem. 283, 7470-9.
- Estivill-Torrús et al. (2008). Absence of LPA1 signaling results in defective cortical development. Cereb. Cortex. 18, 938-50.