



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Fisiología Celular

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

“La fosfatasa de lípidos fosfatados-3 regula el metabolismo y señalización de esfingosina-1-fosfato, el desarrollo del cerebelo y la coordinación motora”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

Biol. ALEJANDRO LÓPEZ JUÁREZ

Ciudad Universitaria, México D.F.

Febrero de 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular-UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Diana Escalante Alcalde. El autor recibió la beca de doctorado CONACyT No 195334 y el proyecto fue realizado con fondos del CONACyT 39995, 53777 y PAPIIT IN216009.

Le dedico este trabajo y cada día de mi vida a mi hija.
Toma sin miedo de este mundo la riqueza que se te ofrece alcanzar; el conocimiento, el arte y el amor.

Agradecimientos:

A Beatriz, a Daniela, a mis papás y hermanos que son principio y fin de mis sueños y son el impulso para hacerlos realidad.

A Diana Escalante por depositar su confianza en mí y por añadir su amistad al estupendo papel que desarrolló como mi mentora.

A Sara Luz Morales Lázaro, con quien compartí más que un proyecto, mis vivencias y mis esperanzas.

A mi comité tutorial, Dr. Gabriel Gutierrez Ospina y Dr. Gabriel Roldán Roldán, por ayudarme en los momentos más difíciles de esta tarea.

A mis compañeros de laboratorio por tener siempre 5 minutos para soportarme.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo y a la Biol. Teresa Montiel Montes, por sus enseñanzas y ayuda incondicional.

A los Drs. Julio Morán Andrade, Refugio García Villegas, Susana Castro Obregón y José Vázquez Prado, por fungir como mis sinodales y por sus valiosas aportaciones al presente trabajo

Al Dr. Arturo Ortega Soto, por sus enseñanzas.

Al Biol. Gabriel Orozco Hoyuela y a la unidad de microscopia IFC-UNAM.

Al IFC-UNAM y a México por darme toda mi formación académica.

Índice

1 RESUMEN

2 INTRODUCCIÓN

- 2.1 *Los lípidos como reguladores de procesos biológicos*
- 2.2 *Función de los lípidos fosfatados (LPs)*
- 2.3 *Regulación de la actividad de los LPs mediante su degradación*
- 2.4 *Características y distribución de las fosfatasas de lípidos fosfatados (LPPs)*
- 2.5 *Funciones de las LPPs*
- 2.6 *Estructura y función del cerebelo*
- 2.7 *Desarrollo y organización laminar del cerebelo*
- 2.8 *Justificación*
- 2.9 *Antecedentes*
- 2.10 *Hipótesis*
- 2.11 *Objetivo general*
- 2.12 *Objetivos particulares*

3 MATERIALES Y MÉTODOS

- 3.1 *Cepas de ratones e inactivación de LPP3 SN-específica (CKO)*
- 3.2 *Purificación de DNA genómico y genotipificación de ratones*
- 3.3 *Tinción de β -galactosidasa*
- 3.4 *Pruebas de coordinación motora*

- 3.5 *Ensayos de Western Blot*
- 3.6 *Inmunofluorescencias, ensayo TUNEL y microscopía confocal*
- 3.7 *Cuantificación celular*
- 3.8 *Evaluación de concentración de LPs*
- 3.9 *Aislamiento de RNA, amplificación de cDNA y PCR semicuantitativo*
- 3.10 *Cultivos organotípicos de rebanadas de cerebelo*
- 3.11 *Tratamiento farmacológico*

4 RESULTADOS

- 4.1 *LPP3 se expresa abundantemente en dominios específicos de la membrana de la glía de Bergmann (BG)*
- 4.2 *LPP3 se expresa en la glía radial y la BG inmadura durante el desarrollo del cerebelo*
- 4.3 *Inactivación específica del gen de LPP3 (Ppap2b) en el sistema nervioso*
- 4.4 *La ausencia de LPP3 en adulto y durante el desarrollo, incrementa el nivel de S1P y regula negativamente S1P₁ en el cerebelo*
- 4.5 *La inactivación de LPP3 produce defectos en la coordinación motora*
- 4.6 *La deficiencia de LPP3 en el sistema nervioso produce defectos en la foliación del cerebelo y daños en la citoarquitectura de la BG madura e inmadura*
- 4.7 *El origen del surco tipo línula se asocia a células gliales que expresan LPP3*

4.8 *La deficiencia de LPP3 en el cerebelo produce defectos de proliferación celular y un retraso en la migración de células granulares*

4.9 *El tratamiento in vitro e in vivo con un antagonista funcional de S1P₁, fenocopia parcialmente alteraciones del desarrollo del cerebelo*

5 DISCUSIÓN

5.1 *LPP3 es un marcador específico de la BG en cerebelo con posibles funciones en la interacción glía-neurona*

5.2 *S1P es un sustrato de LPP3 in vivo y la inactivación de LPP3 afecta la señalización mediada por S1P₁*

5.3 *Los defectos morfológicos en el cerebelo del ratón CKO son atribuibles a los daños en células gliales*

5.4 *LPP3 es un gen que regula la foliación del cerebelo*

5.5 *Posible origen del fenotipo motor encontrado en el ratón CKO*

5.6 *La manipulación de la expresión de S1P₁ conduce a alteraciones de la BG similares a las del CKO*

6 CONCLUSIONES

7 REFERENCIAS

8 APÉNDICE

8.1 *Artículo de investigación*

8.2 *Artículo de revisión*

Abreviaturas

AB	Lóbulo antero basal
ABC	Caset dependiente de cAMP
ACSF	Líquido cefalorraquídeo artificial
ATP	Adenosin trifosfato
BG	Glía de Bergmann
BLBP	Proteína de cerebro de unión a lípidos
C1P	Ceramida 1-fosfato
cATP	Adenosin trifosfato cíclico
Cb	Cerebelo
cDNA	DNA complementario
CKO	Mutación tipo Knock out condicional
ctx	Corteza cerebral
DAG	Diacil glicerol
DAGK	Cinasa de Diacil glicerol
Δf	Escisión de la zona flanqueada por sitios <i>loxP</i>
DCN	Núcleos profundos del cerebelo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
Dt	Árbol dendrítico
E#	Día embrionario #
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGC	Capa granular externa
f	Gen flanqueado por sitios <i>loxP</i>
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos
FTY720	Antagonista funcional de S1P₁
GC	Células Granulares
GCL	Capa de células granulares
GFAP	Proteína glial ácida fibrilar
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
hy	Hipotálamo
IC	Colículo inferior
IF	Inmunofluorescencia
IGL	Capa granular interna
in	Interneuronas
IP3	Inosito 1, 4, 5 trifosfato
iv	Cuarto ventrículo
KI	Mutación tipo Knock in
KO	Mutación genética tipo knock out
<i>lacZ</i>	Gen de la β-galactosidasa
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LP	Lípido fosfatado
LPA	Ácido lisofosfatídico

LPA ₁₋₅	Receptores de LPA 1-5
LPAAT	Acil transferasa de LPA
LPC	Lisofosfatidil colina
lisoPLD	Lisofosfolipasa D
LPP1-3	Fosfatasa de lípidos fosfatados 1-3
LPR	Proteína relacionada a las LPPs
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MB	Cerebro medio
mg	Meninges
MHB	Cerebro medio-posterior
ML	Capa molecular
mTOR	Proteína blanco de rapamicina
Ob	Bulbo olfatorio
P	Pía
P#	Día postnatal #
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Fosfatasa de PA
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PC	Célula de Purkinje
PCL	Capa de células de Purkinje
PCR	Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa
PKC	Proteína cinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLD	Fosfolipasa D
RGD	Arginina, Glicina y Aspartato
RGE	Arginina, Glicina y Glutamato
RMS	Corriente migratoria rostral
RNA	Ácido ribonucléico
rp	Procesos radiales
S1P	Esfingosina 1-fosfato
S1P ₁₋₅	Receptor de S1P 1-5
SEM	Media +/- error estandar
SN	Sistema nervioso
SphK	Esfingosina cinasa
SRF	Factor responsivo a suero
TUNEL	Ensayo de detección de muerte celular <i>in situ</i>
VM	<i>Velum medullaris</i>
vs	Sistema ventricular
WB	Inmunodetección tipo Western BLot
WM	Materia blanca

1 RESUMEN

Lípidos fosfatados (LPs) como el ácido lisofosfatídico (LPA) y la esfingosina-1-fosfato (S1P) regulan procesos propios del desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (SN). La fosfatasa de lípidos fosfatados 3 (LPP3) degrada a estos LPs, por lo que potencialmente regula los mismos procesos; sin embargo, hasta la fecha no se ha aclarado en que funciones del SN *in vivo* repercute realmente la actividad de esta enzima. En el presente trabajo describimos que en el cerebro de ratón adulto, la mayor expresión de LPP3 se encuentra en la capa de células de Purkinje y capa molecular del cerebelo, específicamente en los somas y procesos de la glía de Bergmann (BG), mientras que durante el desarrollo del cerebelo, LPP3 se expresa en la glía radial y BG inmadura.

Para indagar sobre las funciones de esta enzima en el SN, generamos una línea de ratones en los que la expresión de LPP3 es eliminada del linaje neuroglial (CKO). Concordante a la ausencia de LPP3, estos ratones presentaron un aumento en la concentración de S1P en el cerebelo. Además, se observaron alteraciones en el patrón de foliación del cerebelo y en el patrón de locomoción. A nivel celular, sólo la BG presentó cambios en su citoarquitectura, tanto en el adulto como en el cerebelo en desarrollo, lo que sugirió que los fenotipos del adulto se relacionan a una función glial deteriorada. En efecto, los ratones CKO presentaron; una disminución temporal y regional de la proliferación celular, problemas en el establecimiento de la frontera anterior del cerebelo, y un retraso en la migración de células granulares, todo lo anterior asociado los daños descritos en la BG inmadura. Por último, describimos que el receptor de S1P mas abundante del cerebelo (S1P₁), es expresado por la BG y además es regulado negativamente en los ratones CKO, por lo que podría estar implicado en las afecciones de la BG. La aplicación de FTY720, un modulador de S1P₁, a modelos *in vitro* e *in vivo*,

fue capaz de fenocopiar defectos observados en la BG del CKO así como la regulación negativa de S1P₁, por lo que sugerimos que la ausencia de LPP3 y el inherente incremento de S1P, conducen a cambios citológicos de la BG. Estos resultados muestran a LPP3 como una enzima que regula de manera específica el desarrollo del cerebelo y por ende la arquitectura del cerebelo adulto.

ABSTRACT

Lipids Phosphates (LPs) such as lysophosphatidic acid (LPA) and sphingosine-1-phosphate (S1P) regulate cellular processes in adult and developing nervous system (NS). Lipid phosphate phosphatase-3 (LPP3) degrades these lipids and is a potential regulator of the processes mediated by the lipids however, specific roles of LPP3 in the brain *in vivo* remain poorly understood. Here we described that LPP3 is abundantly expressed in the cerebellar molecular and Purkinje cell layers, specifically in plasma membrane domains of Bergmann glia (BG). In the developing cerebellum, LPP3 is expressed in radial glia and immature BG.

Mice selectively lacking expression of LPP3 in the nervous system (cKO), exhibit an increased concentration of S1P, as well as defective cerebellar foliation and locomotion patterns. Cellular analysis showed cytoarchitectonic alterations of BG in the adult and developing cerebellum, which suggested a defective glial function as the origin of the adult phenotypes. Concordantly, the cKO mice showed an impaired cellular proliferation and granule cell migration as well as defects in the development of the anterior boundary of the cerebellum also associated to alterations in BG morphology. We described that the most abundant S1P receptor of the cerebellum (S1P₁), is expressed in BG and is down regulated in the cKO mice. Finally, the S1P₁ modulator FTY720 mimics the altered morphology of BG and the down regulation of S1P₁ both *in vivo* and *in vitro*. Thus, we suggest that LPP3 ablation increases the S1P concentration which leads to an altered BG morphology. Altogether our data indicate that LPP3 participates in several aspects of neuron-glia communication required for proper cerebellum development.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Los lípidos como reguladores de procesos biológicos

Al grupo de biomoléculas insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, se les define como lípidos. Dentro de esta clasificación se encuentra una gran diversidad de moléculas con funciones variadas aunque, en el panorama clásico los lípidos son primordialmente identificados como elementos estructurales de la célula, al encontrar su mayor abundancia constituyendo la bicapa lipídica de la membrana plasmática y de los organelos celulares. Por otro lado, existen lípidos capaces de regular funciones celulares y procesos biológicos, por lo que se les ha llamado lípidos bioactivos. Un ejemplo muy conocido de este tipo de lípidos es el diacilglicerol (DAG), el cual es un segundo mensajero necesario para la activación de la proteína cinasa C (PKC), la cual se encarga de fosforilar diferentes proteínas blanco dependiendo del contexto celular. Además, el DAG puede ser metabolizado para formar ácido araquidónico y posteriormente eicosanoides, las cuales son moléculas clave en los procesos inflamatorios y de dolor, por lo que son blanco de la mayoría de fármacos anti-inflamatorios (Alberts et al, 2002). Otro grupo de lípidos bioactivos son los lípidos fosfatados, que han sido descritos como reguladores de diversos procesos celulares como la proliferación celular, la diferenciación, la migración entre otros procesos biológicos.

2.2 Funciones de los lípidos fosfatados (LPs)

La propiedad anfipática de los glicerofosfolípidos y los esfingofosfolípidos, entre otros lípidos, es precisamente la que confiere a la bicapa lipídica de las membranas celulares su forma y propiedades. Estas moléculas, genéricamente conocidas como fosfolípidos, se constituyen por una molécula de glicerol o de esfingosina respectivamente, unida a cadenas de ácidos grasos (hidrofóbicos) y a un grupo fosfato (hidrofílico), el cual a su vez se une a diversos compuestos como por ejemplo la colina (Alberts et al, 2002). Existe un grupo de lípidos que poseen un grupo fosfato y que son conocidos como lípidos fosfatados (LPs) por haber sido primeramente identificados como precursores y metabolitos de los fosfolípidos de membrana. Recientemente se ha descrito que estos LPs pueden regular procesos celulares, por lo que se les ha incorporado a la clasificación de lípidos bioactivos y ya no sólo como moléculas del metabolismo intermediario. Tal es el

caso del ácido lisofosfatídico (LPA), la esfingosina 1 fosfato (S1P), el ácido fosfatídico (PA) y la ceramida 1 fosfato (C1P). A continuación se describen las características y funciones generales de estos lípidos, así como sus funciones específicas en el Sistema Nervioso (SN).

LPA: El LPA (1 ó 2-acil-sn-glicerol-3-fosfato) está compuesto por un esqueleto de glicerol con un grupo hidroxilo en la posición sn-1 ó 2, a la que se une un grupo fosfato en la posición sn-3 y una cadena de ácido graso en la posición restante. Se ha demostrado que el LPA se encuentra presente en diferentes tejidos y fluidos biológicos, llegando a alcanzar concentraciones de 5-25 μM en el plasma como consecuencia de la actividad de las plaquetas (Eichholtz et al., 1993). El LPA puede regular procesos como la contracción muscular, agregación plaquetaria, quimiotaxis, etc, además de encontrarse en altas concentraciones en condiciones patológicas como el cáncer (Mills y Moolenaar, 2003). Como se detalla en la figura 1, el LPA puede ser sintetizado a partir de diferentes sustratos mediante la actividad de las enzimas correspondientes; la fosfolipasa A1 o A2 (PLA), la monoacilglicerol cinasa, la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa y la lisofosfolipasa D (LisoPLD o autotaxina). Como es de esperarse, la vía específica de generación del LPA dependerá de la disponibilidad de sustratos, de las enzimas y de las características del contexto intracelular e inclusive extracelular. Así, el LPA es producido por la actividad de la glicerofosfatoaciltransferasa en retículo endoplásmico y mitocondrias durante la cadena de síntesis de glicerofosfolípidos, y también puede ser producido por la reducción del acildihidroacetonafofosfato en los peroxisomas (Pages et al., 2001). Aunque aún es materia de debate el mecanismo por el que el LPA producido intracelularmente puede ser secretado al medio extracelular, se ha propuesto que la presencia de la autotaxina en el plasma tiene el potencial de generar LPA extracelular *di novo* a partir de fosfolípidos de membrana como la lisofosfatidilcolina (Okudaira et al., 2000).

Debido a la propiedad hidrofóbica parcial de los LPs, para que el LPA pueda ser movilizado en los fluidos biológicos, necesita acompañarse de moléculas de transporte intracelulares y extracelulares como la proteína de unión a ácidos grasos (FABP) y la albúmina respectivamente (Thumser et al., 1994). El LPA presente en el espacio extracelular es reconocido de manera específica por una familia de receptores de siete segmentos integrados en la membrana plasmática acoplados a proteínas G triméricas

(GPCRs). La nomenclatura de estos receptores (propuesta por la unión internacional de farmacología), se compone por el nombre del principal agonista seguido de un número arábigo en subíndice, que indica el orden cronológico de la publicación de la secuencia del receptor. Actualmente se han descrito cinco receptores para LPA (LPA₁₋₅; Chun et al., 2002). Los efectos producidos por la activación de los receptores de LPA son diversos, y van desde la proliferación celular hasta la diferenciación (Fig. 2). Esta diversidad de efectos en respuesta al mismo estímulo, se explica en parte por la presencia de diferentes subunidades α acopladas a las proteínas G de sus receptores. Así, los LPA₁₋₅ pueden presentar a la subunidad α del tipo estimuladora (s) e inhibidora (i) de la actividad de la adenilato ciclasa, así como a la α activadora de la moléculas PLC (q/11) y Rho (12/13). La subunidad α -i puede también activar a PLC y a otras moléculas de señalización como Ras y PI3K (Choi et al., 2010).

La expresión de cada subtipo de receptor de LPA es regulada de una manera específica en cuanto a temporalidad, tejido, tipo celular e incluso especie animal. De esta manera, en el cerebro murino y de humano adulto, el transcrito de LPA₁ es muy abundante, el de LPA₃ se detecta en menor medida, mientras que el de LPA₂ se presenta sólo en humano (Choi et al., 2010). En el ratón, los receptores LPA_{1,2,4,5} se expresan abundantemente durante el día embrionario 8.5 (E8.5) y posteriormente en E12.5, se detectan solo LPA₁₋₂ en zonas neurogénicas (zona ventricular del cerebro), en tanto que LPA₃ es mayormente expresado en el periodo postnatal temprano (Ohuchi et al., 2008). Los receptores de LPA han sido descritos también en tipos celulares específicos, lo que sugiere su participación en procesos de neurogénesis, migración neuronal, mielinización y proliferación de astrocitos (Cervera et al., 2002; McGiffert et al., 2002; Sorensen et al., 2003). Adicionalmente, se ha reportado que el transcrito de la autotaxina es regulada diferencialmente a lo largo del desarrollo del sistema nervioso (Ohuchi et al., 2007; Savaskan et al., 2007). En su conjunto los datos presentados, sugieren que el LPA desempeña importantes funciones durante el desarrollo y en la fisiología del sistema nervioso.

La presencia de LPA ha sido evaluada en diferentes tejidos, encontrando que el cerebro contiene la mayor concentración de LPA en el organismo (Das y Hajra, 1989; Edsall y Spiegel, 1999), lo cual concuerda con la mayor cantidad del transcrito de autotaxina

encontrada en esta región (Lee et al., 1996). La barrera hematoencefálica es medianamente impermeable a LPs, y aún así es posible detectar concentraciones de pmoles/ml de LPA en el líquido cefalorraquídeo (LCR; Sato et al., 2005), lo que también se relaciona a la presencia de autotaxina en este fluido (Nakamura et al., 2009). Además, en condiciones patológicas que comprometen la integridad de la barrera hematoencefálica, el LPA y otros LPs pueden incrementar en el LCR, como se ha descrito en un modelo de hemorragia intracraneal donde la concentración de LPA incrementa hasta a 10 μ M, lo que se asocia a una reactividad vascular alterada y a la vasoconstricción post-hemorrágica (Tigyi et al., 1995). Otros indicios de las funciones del LPA se han obtenido generando y estudiando ratones con alteraciones genéticas de los receptores de LPA o de sus enzimas de síntesis.

Actualmente se han realizado ratones nulos (KO) de los primeros 4 receptores de LPA, y a pesar de la abundante y dinámica expresión de estos receptores en el SN, solo el KO de LPA₁ presenta anomalías relacionadas a la función y desarrollo de este sistema (Choi et al., 2010), lo que plantea una posible redundancia o compensación de funciones entre estos receptores. Aunque sin fenotipos estructurales anormales en el cerebro, los primeros reportes del KO de LPA₁, sugirieron la participación de este receptor en la conducta olfativa, además de evidenciar una mayor apoptosis en nervios periféricos (Contos et al., 2000). Posteriormente, la variante “Málaga” del KO de LPA₁ indicó su participación en la neurogénesis embrionaria así como en la de organismos adultos (Matas-Rico et al., 2008). No obstante, que los ratones KO de los receptores de LPA generaron poca información de la función de LPA en el organismo, la vital importancia de este LP se hizo evidente con el estudio de los ratones KO de autotaxina, los cuales presentaron severos defectos en la formación del tubo neural y sistema vascular por lo que fallecen al día E9.5 (Tanaka et al., 2006; van Meeteren et al., 2006).

Por otro lado, resultados obtenidos al utilizar modelos experimentales, *ex vivo* e *in vitro*, han sugerido que el LPA puede regular otros importantes procesos del SN. En modelos del desarrollo del SN se ha descrito que el LPA es secretado por neuronas postmitóticas y que puede provocar cambios morfológicos de neuroblastos y migración neuronal (Fukushima et al., 2000) además, que la activación de los receptores LPA₁₋₂ induce un aumento en la tasa de crecimiento de la corteza cerebral y la formación de

dobleces tipo “gyrus” en respuesta al aumento en la mitosis terminal y el decremento en la muerte celular (Kingsbury et al., 2003). En cultivos y líneas neuronales, la aplicación de LPA es capaz de provocar la retracción de neuritas (Fukushima et al., 2002; Tigyi et al., 1996). Además, el LPA promueve la diferenciación de astrocitos (Shano et al., 2008) así como la de neuronas, teniendo como mediadores a los astrocitos (Spohr et al., 2008). El LPA puede inducir corrientes despolarizantes en neuroblastos (Dubin et al., 1999), modificar corrientes de sodio en células cromafines (Seung Lee et al., 2005), reducir la recaptura de glutamato realizada por astrocitos (Keller et al., 1996; Shano et al., 2008), además de modular los niveles intracelulares de Ca^{2+} en neuronas y células gliales (Holtberg et al., 1997; Young et al., 1999; Rao et al., 2003).

S1P; La esfingosina-1-P se compone por el esqueleto básico de todos los esfingolípidos, la esfingosina (2-amino-4-octadecene-1,3-diol), a la cual se une un grupo fosfato en la posición 1. La S1P fue originalmente considerada como molécula intermediaria en la vía de degradación de la esfingosina sin embargo, a partir de las investigaciones de principio de los años 90’s, que evidenciaron sus implicaciones en procesos de proliferación celular y supresión de apoptosis (Spiegel y Milstien, 2003), esta relativamente sencilla molécula fue considerada como un lípido bioactivo con importantes funciones de señalización tanto intracelular como extracelular. La S1P es producida dentro de las células por la reacción catalizada por la esfingosina cinasa (SphK) sobre la esfingosina (Fig.1). Otras vías de síntesis de S1P, como la desacilación de la C1P, son teóricamente posibles aunque esta última no ha sido descrita aún en sistemas biológicos. De manera similar, también es posible la síntesis de S1P a partir de esfingosilfosforilcolina mediante la actividad de la fosfolipasa D *in vitro* (Van Veldhoven et al., 1989). Se han reportado dos isotipos de SphK (SphK1-2) con una distribución celular y subcelular diferente, además de que sus ligandos de activación y efectos celulares también pueden variar. Así, la producción de S1P puede ser activada por factores de crecimiento, citocinas y hormonas entre otros. Esta S1P puede participar en procesos biológicos como la angiogénesis, función cardiovascular, la inmunidad y en procesos patológicos como la aterosclerosis, asma, cáncer, etc. (Kim et al., 2009).

La gama de concentraciones de S1P en el organismo es muy variada, siendo el suero el sitio de mayor abundancia de este lípido que alcanza concentraciones de 0.1-0.6 μ M

(Edsall y Spiegel, 1999). Se ha propuesto que tal abundancia se debe principalmente a la actividad plaquetaria, aunque recientemente se ha demostrado una alta contribución de eritrocitos y células endoteliales (Jessup, 2008).

Se ha descrito que la S1P puede funcionar como un segundo mensajero, mediando señales que conducen a la movilización intracelular de Ca^{2+} , a la sobrevivencia y proliferación celular (Olivera y Spiegel, 1993; Olivera et al., 1999), aunque sus blancos moleculares no han sido aún identificados (Kim et al., 2009). Otra forma en la que la S1P puede mediar señalización celular es como mensajero extracelular que, aunque se ha descrito que la síntesis de S1P que es principalmente intracelular, también existe un sistema de síntesis de S1P en el medio extracelular mediante la exportación de la SphK-1 (Ancellin et al., 2002). Este sistema tiene como reactivo limitante la baja presencia de esfingosina extracelular, por lo que aún es materia de controversia su funcionalidad *in vivo*. Por lo tanto, la manera en la que la S1P, sintetizada dentro de la célula, puede alcanzar el medio extracelular representa un campo de investigación de gran interés. El carácter polar de este lípido le impide una fácil difusión a través de la membrana, por lo que para su transporte requeriría de proteínas especializadas en este proceso. Se ha propuesto que las proteínas encargadas de tal transporte, corresponden a la familia de los “Caset dependiente de ATP” (ABC), y esta teoría ha sido apoyada por experimentos realizados con mastocitos (Mittra et al., 2006), astrocitos del cerebelo (Sato et al., 2007) y plaquetas, aunque en estas últimas se ha sugerido un segundo mecanismo independiente de ATP, y dependiente de Ca^{2+} (Kobayashi et al., 2006). Como sucede con el LPA, el carácter lipídico de la S1P representa un problema para su solubilidad, por lo que en los fluidos orgánicos, ésta se acompaña de proteínas como la albúmina y lipoproteínas, especialmente de alta densidad, las cuales aunque tienden a reducir la actividad de la S1P, pueden protegerla de su degradación (Murata et al., 2000).

Tal vez una de las principales funciones de la S1P al actuar de manera extracelular tanto como intracelular, es la de su participación en el sistema conocido como “reóstato de esfingolípidos” que se relaciona al equilibrio sobrevivencia-muerte celular. Tal y como sucede en los circuitos eléctricos donde un reóstato regula la resistencia, la disponibilidad de S1P versus la de la esfingosina y ceramida controlarían el destino celular de proliferación y muerte respectivamente. En este sentido, se ha recalado que la

actividad de la SphK es un punto clave de regulación del reóstato y diversas patologías se han asociado al detrimento de esta enzima (Maceyka et al., 2002).

La comparación de concentraciones de S1P entre diferentes tejidos mostró que el cerebro presenta la mayor abundancia de este LP en el organismo, alcanzando concentraciones de hasta 6 pmol/mg (Edsall y Spiegel, 1999). En el LCR la concentración de S1P es menor a 20 nmol/L aunque, de la misma manera que otros componentes abundantes de la sangre, puede aumentar en el LCR como resultado de un daño de la barrera hematoencefálica.

Hasta este punto en la descripción de la S1P, y como se seguirá detallando mas adelante, llama la atención que aunque con un origen metabólico distinto, S1P comparta muchas características estructurales (Fig. 1), efectos celulares (Fig. 2) y mecanismos de acción con el LPA. En este último aspecto, la S1P y el LPA señalizan a través de receptores GPRCs, los cuales son muy similares en cuanto a su abundancia, distribución y sus vías de señalización, encontrando además convergencia en sus efectos biológicos (Sorensen et al., 2003), por lo que es muy común encontrar a estos dos LPs descritos conjuntamente en la literatura. Existen reportados hasta la fecha 5 GPCRs que unen con gran afinidad a la S1P (S1P₁₋₅). La subunidad G α a la que se acoplan dichos receptores, puede ser tipo i, q ó 12/13, por lo que pueden activar a diversas moléculas de señalización (como las mencionadas anteriormente para el LPA), además de regular diversos procesos biológicos relacionados a la sobrevivencia celular, diferenciación y migración (Fig. 3; Anliker y Chun, 2004b). La distribución de estos receptores es regulada de manera tejido específica tanto en adulto como en las diferentes etapas del desarrollo embrionario. De manera general, en roedores los S1P₁₋₅ son abundantes en corazón, pulmón, hígado, bazo así como en cerebro adulto y en desarrollo (Anliker y Chun, 2004a). Es de hacerse notar que durante el desarrollo del cerebro, los receptores de S1P tienen una importante expresión en zonas ventriculares en periodos de alta neurogénesis (McGiffert et al., 2002; Ohuchi et al., 2008). Se ha reportado que el transcrito de S1P₁ es muy abundante en el cerebro de ratón E14-18, mientras que el de S1P₂₋₃ presenta niveles bajos y los de S1P₄₋₅ son apenas detectables por la técnica de Northern blot (McGiffert et al., 2002).

La inactivación genética de los diferentes receptores de S1P en modelos de ratón, ha revelado fenotipos más graves que los encontrados en los KO de LPA. El ratón KO de

S1P₁ presenta problemas en la maduración vascular, lo que conduce a hemorragias abundantes y a la muerte del embrión a los 12.5-14.5 días (Liu et al., 2000). Además la deficiencia de S1P₁ provoca que a los 12.5 días de desarrollo embrionario haya una disminución celular masiva en el cerebro anterior, relacionada al aumento de apoptosis y disminución de proliferación celular (Mizugishi et al., 2005). Aunque los ratones deficientes de S1P₂ son viables, entre las 3 y 7 semanas de edad presentan convulsiones que se asocian a la hiperexcitabilidad de neuronas piramidales de la corteza (MacLennan et al., 2001). Los ratones en los que se ha inactivado S1P₃ presentan una reducción de tamaño, al igual que la presentan los KO de S1P₂, mientras que esta reducción es mas pronunciada en el doble mutante S1P₂₋₃, lo que puede conducir a la muerte del individuo en la infancia (Ishii et al., 2002). Por otro lado, resulta interesante que la inactivación genética de la SphK1 o 2 no presente fenotipos claramente distinguibles del silvestre, sin embargo la inactivación conjunta de SphK1 y 2 resulta letal para el ratón, debido a defectos en la angiogénesis y neurogénesis, lo que incluye defectos en el cierre del tubo neural. Los datos presentados revelan la vital importancia de la señalización realizada por S1P en el cerebro en desarrollo y adulto (Mizugishi et al., 2005).

Los modelos de pérdida de función de los receptores de S1P y de la inactivación de su síntesis, han señalado la gran importancia que este LP puede tener en el SN. Adicionalmente diversos modelos *in vitro* han contribuido a enriquecer el conocimiento de sus vías de señalización y a proponer nuevos procesos regulados por la S1P. Anteriormente se había propuesto que la síntesis de S1P en el SN se remitía a células gliales para ser liberada como factor neurotrófico (Edsall et al., 2001), sin embargo recientemente se reportó que su síntesis y liberación puede realizarse tanto por astrocitos como por células granulares (GC) cultivadas del cerebelo (Anelli et al., 2005). En esta región se encuentra particularmente enriquecido el transcrito de S1P₁, aunque aún no existen propuestas de su función en este sitio (Chae et al., 2004; Liu y Hla, 1997). Se ha descrito que la S1P regula la retracción del cono de crecimiento y del axón durante la neuritogénesis (Postma et al., 1996; Van Brocklyn et al., 1999), así como la diferenciación y proliferación astrocítica (Sorensen et al., 2003, Bassi et al., 2006;), además de modular los niveles intracelulares de Ca²⁺ en ambos tipos celulares (Giussani et al., 2007). Por otro lado, la S1P puede potenciar la liberación de glutamato dependiente

de despolarización en neuronas hipocámpales e inclusive, a concentraciones nanomolares, provocar una liberación de glutamato *per se* (Kajimoto et al., 2007). Se ha observado que en cultivos de neuronas corticales, la S1P puede reducir la frecuencia y amplitud de las corrientes excitadoras postsinápticas espontáneas. En este mismo estudio se demostró que la administración intracerebroventricular de S1P a ratones adultos conduce a efectos reductores de la nocicepción, mediante la activación de receptores S1P₁ (Sim-Selley et al., 2009). Por último, la inyección de S1P y de LPA en el estriado de ratones adultos conduce a la activación astrocítica *in vivo* (Sorensen et al., 2003).

PA: El PA (1, 2-diacilglicerol 3-fosfato) es la molécula mas sencilla del grupo de los glicerofosfolípidos, y se encuentra estructurado por un esqueleto de glicerol que, de manera general, se une a un ácido graso saturado en el carbono 1, a uno insaturado en el carbono 2 y a un grupo fosfato en el carbono 3. La importancia del PA es reconocida desde hace mucho tiempo por su participación en el metabolismo de glicerofosfolípidos, sin embargo en la última década se ha descrito que este LP posee la propiedad de regular procesos celulares como el tráfico membranal, la secreción y el rearrreglo del citoesqueleto, lo que a su vez asocia al PA con procesos biológicos como sobrevivencia y proliferación, así como procesos patológicos como transformación celular y progresión tumoral (Wang et al., 2006).

La producción del PA puede ser catalizada por la fosfolipasa D (PLD), la cual hidroliza al grupo colina de la fosfatidilcolina, para producir colina y PA. Además, mediante la actividad de la diacilglicerol cinasa (DAGK), el DAG puede ser fosforilado para producir el PA, mientras que la acilación del LPA mediada por la aciltransferasa del LPA puede también generar al LP en cuestión (Fig. 1). De esta manera, la concentración de PA llega a representar cerca del 1% del total de los fosfolípidos en la membrana plasmática.

La hidrólisis de la fosfatidilcolina, mediada por enzimas con su sitio activo presentado hacia el lado extracelular, puede hacer que este LP se presente en el medio extracelular (Wang et al., 2006). Aunque existen varios reportes en los que se propone la existencia de receptores de membrana específicos para PA, que median diversos efectos en fibroblastos (Murayama y Ui, 1987), a la fecha no se ha podido comprobar dicha teoría y mas bien los efectos observados han sido atribuidos a la contaminación del PA con LPA (Jalink et al., 1990). Así, en ausencia de receptores, el PA extracelular debe ingresar a la célula para

mediar sus efectos. En este sentido se ha propuesto que el PA extracelular difunde a través de la membrana gracias al proceso de fosforilación y defosforilación (Pagano y Longmuir, 1985).

Ya sea sintetizado al interior de la célula o proveniente del medio, el mecanismo por el que el PA puede mediar efectos celulares es a través de la interacción directa con sus moléculas blanco. Se han descrito interacciones de alta afinidad entre el PA y al menos 22 diferentes proteínas distribuidas en diversos organismos y, aunque las regiones de interacción de estas proteínas no presentan homología de secuencias, concuerdan en presentar residuos de aminoácidos básicos, lo que ha llevado a proponer que dichas interacciones con proteínas se deben a propiedades únicas de ionización del grupo fosfato del PA (Kooijman y Burger, 2009). Por ejemplo, la interacción de PA con mTOR promueve la síntesis de proteínas, lo que genera señales de sobrevivencia en células de cáncer de mama, donde además se ha visto que la actividad de PLD1 es fundamental para el proceso (Foster y Xu, 2003). También, se ha descrito que el PA tiene funciones anti-apoptóticas y mitogénicas en respuesta a la activación de la PLD. En este caso, el PA interacciona con Raf-1 y juntos se translocan a la membrana plasmática facilitando su activación por el regulador Ras para así iniciar la cascada de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK; Rizzo et al., 2000).

La información acumulada acerca de las funciones del PA *in vivo* (y de la CIP como veremos mas adelante), es escasa comparada con la gran cantidad de reportes que se han generado acerca de las funciones del LPA y la S1P. Establecer funciones específicas o generales del PA *in vivo* se dificulta debido a sus diferentes vías de síntesis, su mecanismo de acción como segundo mensajero al interior de la célula y a las múltiples moléculas con las que interacciona. Por ejemplo, de una de las principales enzimas de síntesis de PA, la DAGK, se conocen a la fecha diez isoformas. En este sentido, se ha descrito que el ratón KO de la DAGK ϵ presenta una mayor resistencia a shock electroconvulsivo, así como una potenciación a largo plazo atenuada en el hipocampo. Sin embargo, mas que a la ausencia de síntesis de PA, estos hallazgos han sido atribuidos a la acumulación de 20:4-DAG (Rodriguez de Turco et al., 2001). De manera similar, la inactivación de las DAGK α y DAGK ζ , ha demostrado que su función es importante en procesos inmunes como la anergia, proceso en el que los linfocitos T tienen alterado el

metabolismo del DAG (Olenchock et al., 2006). Respecto a la otra vía de síntesis de PA; existen dos productos génicos de PLD (PLD1-2), de los cuales hasta la fecha sólo se ha generado el ratón deficiente de PLD1 el cual es viable y fértil, lo que sugiere que la ausencia de PLD1 puede ser funcionalmente compensada por la presencia de la PLD2 u otras enzimas que promuevan el aumento de PA. Las plaquetas de estos ratones mostraron deficiencias en la activación de integrinas así como en la agregación dependiente de glicoproteínas, lo que condujo a la protección contra trombosis y daño isquémico del cerebro (Elvers et al., 2010).

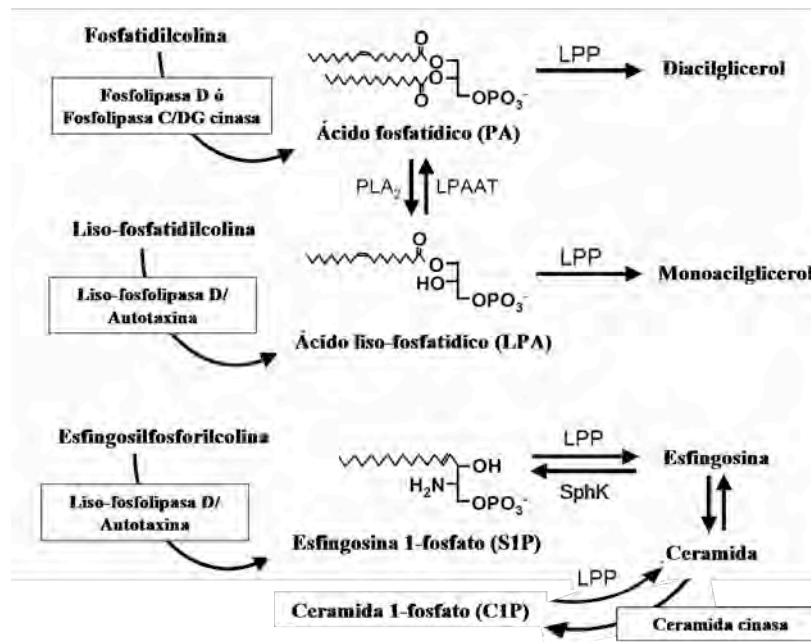


Figura 1. Ruta de síntesis y degradación de lípidos fosfatados. El ácido fosfatídico, generado por la hidrólisis de fosfolípidos de membrana via la activación de la fosfolipasa D y/o la fosfolipasa C/diacilglicerol cinasa, puede ser transformado a ácido lisofosfatídico mediante la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA₂). La producción de LPA puede también ser catalizada por la actividad de la lisofosfolipasa D/autotaxina a partir de la lisofosfatidilcolina. Este LPA puede ser acilado por la LPA acil-transferasa (LPAAT) para producir ácido fosfatídico. La S1P es típicamente producida por la fosforilación de la esfingosina que cataliza la esfingosina-cinasa (SphK) aunque también puede generarse por actividad de la lisofosfolipasa D/autotaxina sobre la esfingosilfosforilcolina. La actividad de la ceramida cinasa sobre la ceramida cataliza la producción de ceramida-1-fosfato. La defosforilación de PA, LPA, S1P y C1P es catalizada por la actividad de las LPPs y genera; diacilglicerol, monoacilglicerol, esfingosina y ceramida respectivamente (Modificado de Pyne et al., 2004).

C1P: La C1P (N-exadecanoilesfingosina-1-fosfato, especie molecular natural más abundante) es un esfingolípido considerado como el principal metabolito de la ceramida y como su nombre lo indica, es la forma fosforilada de este lípido. Además de ser un punto

clave en el metabolismo de todos los esfingolípidos, la C1P puede regular eventos de señalización celular. Los primeros reportes de efectos biológicos de la C1P indicaron que especies moleculares de este LP con cadenas cortas, inducen la síntesis de DNA en fibroblastos de rata (Gómez-Munoz et al., 1995). Hoy en día se ha descrito con gran detalle que la C1P puede regular proliferación y apoptosis (Gangoiti et al., 2010), es un potente pro-inflamatorio (Chalfant y Spiegel, 2005), participa en el proceso de fagocitosis (Hinkovska-Galcheva et al., 2005) y recientemente se ha descrito que es un factor clave en la regulación de la quimiotaxis de macrófagos (Gangoiti et al., 2010).

La C1P es producida por la actividad de la ceramida cinasa (CerK) sobre la ceramida. Aunque esta es la única vía descrita para la generación de C1P en células de mamífero, macrófagos derivados de médula ósea provenientes de ratones nulos para la CerK, producen niveles significativos de C1P, lo que sugiere la existencia de otras rutas metabólicas para la generación de C1P (Boath et al., 2008). Acerca de la disponibilidad de C1P, se ha postulado que la C1P viaja desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática y es liberada al medio extracelular para unirse a proteínasceptoras como la albúmina y lipoproteínas (Boath et al., 2008).

La inactivación del gen de la ceramida cinasa, sugiere que la C1P producida por esta enzima tiene importantes funciones en el sistema inmune ya que los ratones presentan una reducción considerable en la cantidad de neutrófilos en sangre y bazo, mientras que los leucocitos presentan una elevación (Tuson et al., 2004). Se ha descrito que en el SNC la C1P puede ser producida por las células granulares del cerebelo diferenciadas e indiferenciadas, lo que además parece estar mediado por diferentes rutas metabólicas (Riboni et al., 2002). Al igual que la S1P, la C1P ha sido implicada en procesos de liberación de neurotransmisores (Alemany et al., 2001; Bajjalieh et al., 1989). Algunas funciones de moléculas relacionadas a la C1P son: que la ceramida inhibe canales de Ca^{2+} tipo L en pinealocitos de rata (Chik et al., 1999), induce arresto del ciclo celular, promueve la apoptosis, regula diferenciación celular y respuestas inflamatorias (Zheng et al., 2006). Además el producto defosforilado de la C1P desencadena cascadas de señalización con efectos opuestos a los de S1P. Por todo lo anterior, la regulación de la disponibilidad de estos dos LPs puede ser de gran importancia para el destino celular.

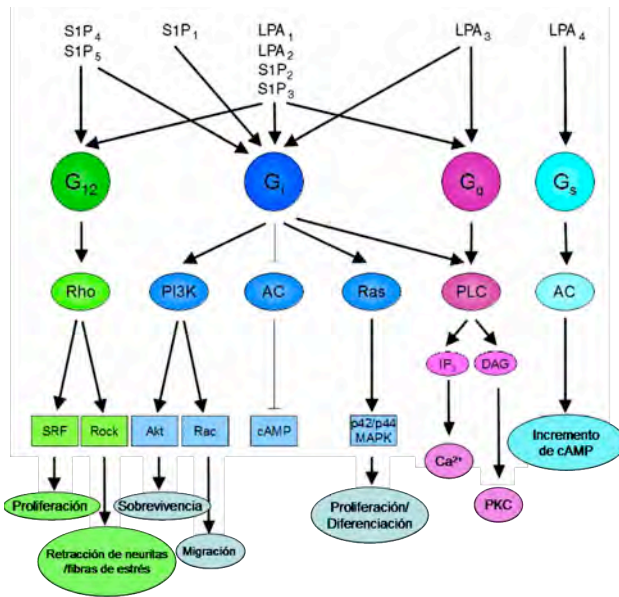


Figura 2. Vías de señalización celular reguladas por los receptores de LPA y S1P. Se ejemplifica el repertorio de interacciones que los receptores de LPA y S1P tienen con diferentes subunidades $G\alpha$ de las proteínas G triméricas a las que se acoplan. La activación de estos receptores conduce a la subsecuente activación de los segundos mensajeros y moléculas efectoras como lo indican las flechas. AC, adenilato ciclasa; cAMP, adenosilmonofosfato cíclico; DAG diacilglicerol; p42/44 MAPK, proteína cinasa activada por mitógeno; IP3, inositol 1,4,5 trifosfato; PI3K, cinasa de fosfoinosítidos-3; PKC, proteína cinasa C; PLC, fosfolipasa C; Rock, cinasa asociada a Rho; SRF, factor responsivo a suero. Modificado de (Anliker y Chun, 2004b).

2.3 Regulación de la actividad de los LPs mediante su degradación.

Los efectos biológicos que son mediados por los LPs y la importancia de la regulación de su disponibilidad espacio-temporal han sido explicados en términos de síntesis y transporte. Sin embargo, el control de los efectos mediados por los LPs por medio de su degradación, es tema central de nuestro trabajo por lo que se trata de manera independiente a continuación.

Cualquier modificación en la estructura de los LPs conduce a cambios de configuración y de propiedades químicas, lo que a su vez modifica sus propiedades bioactivas. Las posibles modificaciones son diversas por ejemplo; se ha descrito que la liso-fosfolipasa LPAAT, presente en microsomas y membrana plasmática celular, posee propiedades de acetil transferasa sobre el LPA y lo transforma a PA (Thompson y Clark, 1994). Como se ha tratado anteriormente, estos dos LPs promueven funciones celulares importantes a través de mecanismos muy distintos por lo que, mientras que la degradación de LPA mitigará sus efectos, el consecuente aumento de PA podría marcar un diferente destino celular. Otro ejemplo es la degradación de S1P a través de la actividad de su respectiva liasa presente en microsomas y organelos (Ikeda et al., 2004), lo que genera hexadecenal y fosfoetanolamina. Estos ejemplos citan a enzimas altamente selectivas de sus sustratos y que han sido implicadas principalmente en la ruta metabólica de los fosfolípidos.

La degradación de LPs a través de su desfosforilación es una importante manera de “inactivar” sus funciones biológicas. Existe un grupo numeroso de enzimas con actividad de fosfatasa que tienen como sustrato a los LPs en cuestión, que sin embargo presentan importantes diferencias entre ellas y han sido clasificadas por separado. El grupo de fosfatasas que tienen como sustrato al PA (PAP), ha sido subdividido con base en las propiedades de regulación de su actividad, además de su distribución subcelular diferente, en; a) PAP tipo 1, las cuales requieren del ión Mg^{2+} como cofactor para su actividad, son bloqueadas por N-etil-maleimida y se presentan en la superficie de membranas internas orientadas hacia el lado del citosol, y en b) PAP tipo 2 las cuales son enzimas no reguladas por Mg^{2+} o N-etilmaleimida y que se encuentran ancladas a membranas, ya sea presentando su sitio activo en la superficie extracelular de la membrana plasmática o en el lumen de organelos intracelulares como el retículo endoplásmico o aparato de Golgi (Brindley, 2004). Este último grupo de fosfatasas presenta un mayor rango de sustratos, pues además de su primeramente descrita capacidad de desfosforilar al PA, también tiene como sustratos al LPA, a la S1P y a la C1P. Por su amplio repertorio de sustratos, este grupo de enzimas es ahora conocido como fosfatasas de lípidos fosfatados (LPPs por sus siglas en inglés), y su estudio ha conducido a importantes hallazgos en cuanto a la regulación de diversos procesos biológicos como se detalla en el siguiente apartado.

2.4 Características y distribución de las fosfatasas de lípidos fosfatados (LPPs)

Por similitud de secuencias de aminoácidos principalmente de su sitio activo, las LPPs pertenecen a la superfamilia de fosfatasas que incluye a fosfatasas bacteriales, fosfatasas de fitoesfingosina fosfato de levaduras y haloperoxidasas de hongos, a las fosfatasa de la glucosa-6-fosfato en mamífero y a las proteínas Wunen en *Drosophila* (Brindley, 2004). En mamífero se han clonado tres isoenzimas de las LPPs (1-3), que tienen la capacidad de desfosforilar al PA, LPA, S1P y C1P con una eficiencia similar (Brindley y Waggoner, 1998; Nanjundan y Possmayer, 2001). Cabe mencionar que la LPP1 cuenta con tres isoformas (a-c). La estructura deducida de las LPPs es de 6 segmentos transmembranales con un sitio activo, conservado en todas las LPPs, compuesto por tres

dominios orientados hacia el lado extracelular de la membrana plasmática o hacia el lado del lumen cuando se presenta en membranas intracelulares (Fig. 3) (Sciorra y Morris, 1999). Esta topología, junto con la identificación de sitios de N-glicosilación (Zhang et al., 2000b), es consistente con la actividad de “ecto-fosfatasa” que ha sido descrita en diversos tipos celulares y que se refiere a la capacidad que tienen las LPPs para actuar sobre sustratos extracelulares, modificando así su disponibilidad en el medio. Adicionalmente se ha reportado la existencia de una familia de proteínas relacionadas a las LPPs (LPR o PRG por; Genes Relacionados a Plasticidad), las cuales comparten una gran similitud de secuencia y estructura general con las LPPs pero carecen de las secuencias conservadas del sitio catalítico de las LPPs y poseen un largo extremo carboxilo terminal. Como es de esperarse, estas enzimas carecen de actividad de fosfatasa, aunque se ha visto que pueden regular la liberación de neurotransmisores y la actividad sináptica (Trimbuch et al., 2009). Otras secuencias interesantes que presentan las LPPs y proteínas relacionadas, son las secuencias de 35 aminoácidos de su carboxilo terminal las cuales son útiles para que Wunen, así como las LPPs de mamífero, puedan formar homodímeros, aunque esta característica parece no ser necesaria para su actividad de fosfatasa (Burnett et al., 2004).

Por otro lado, existen secuencias únicas para cada LPP e inclusive algunas relativas a las LPPs de cierta especie. Por ejemplo, existen secuencias que sirven como señales para dirigir a las LPPs a sitios específicos de la membrana. A este respecto podemos citar a las secuencias responsables de la ubicación de LPP1 en la superficie de la membrana apical, mientras que otras secuencias son necesarias para la ubicación de LPP3 en la membrana basolateral en células polarizadas (Jia et al., 2003). Otros trabajos han sugerido que las LPPs pueden mediar funciones de una manera independiente a su actividad de fosfatasa a través de regiones de interacción con otras proteínas. Así, se ha descrito que la LPP3 de humano contiene secuencias de adhesión celular “RGD” expuestas al espacio extracelular, las cuales pueden inducir agregación celular a través de moléculas de señalización como FAK, AKT y GSK3 (Humtsoe et al., 2003). A diferencia de la LPP3 de humano, la LPP3 de rata y la de ratón contienen una secuencia RGE en lugar de RGD.

Las LPPs también presentan diferencias en su patrón de expresión específico de tipo celular, tejido y etapa del desarrollo del organismo, por lo que se infieren funciones

diferentes para cada isoenzima. Por ejemplo, se ha reportado que el patrón de expresión de LPP3 es altamente tejido-específico durante el desarrollo post-implantación, mientras que la LPP1 y LPP2 están uniforme y ampliamente expresadas (Escalante-Alcalde et al., 2003). El mRNA de LPP1 es altamente expresado en próstata, aorta, vejiga, útero, riñón, pulmón, placenta e hígado (Waggoner et al., 1999), el mRNA de LPP2 se encuentra principalmente en cerebro, páncreas y placenta, mientras que el mRNA de LPP3 es abundante en cerebelo adulto (Suzuki et al., 1999). Además, se ha descrito que en el pulmón de rata LPP3 se expresa abundantemente en dominios enriquecidos con caveolina y que su actividad puede ser inducida mediante ésteres de forbol en células de epitelio de pulmón (Nanjundan y Possmayer, 2001).

En la rata adulta, la mayor actividad general de las LPPs se encuentra en cerebro y riñón (Waggoner et al., 1995) y que esta actividad, así como su expresión, puede ser regulada de manera conjunta como sucede en modelos de diferenciación de adipocitos (Simon et al., 2002). Sin embargo, son más abundantes los reportes de la regulación de la expresión de las LPPs de manera independiente. Así, el mRNA de LPP3 incrementa tres veces en respuesta al tratamiento de células HeLa con el factor EGF, mientras que el mRNA de LPP1 no sufre cambios con este tratamiento (Kai et al., 1997), pero sí en respuesta a andrógenos en células de adenocarcinoma prostático humano (Ulrix et al., 1998). La hormona liberadora de gonadotropina incrementa la expresión de las LPPs en modelos de cáncer de ovario (Imai et al., 2000), en tanto que la transcripción de LPP3 incrementa en respuesta al factor de crecimiento vascular endotelial en células endoteliales (Humtsoe et al., 2003), lo que podría regular procesos de angiogénesis. La expresión del homólogo de LPP3 en rata, Dri42, incrementa durante la diferenciación epitelial en la mucosa intestinal (Barila et al., 1996).

Durante el desarrollo post-implantación del ratón, el patrón de expresión de LPP3 es altamente regulado, mientras que la expresión de LPP1 y LPP2 es uniforme, lo que sugiere que LPP3 cumple con funciones muy específicas durante esta etapa del desarrollo (Escalante-Alcalde et al., 2003). Utilizando al gen reportero *lacZ* expresado en fase con el gen que codifica para la LPP3 (*Ppap2b*), recientemente se describió la distribución de LPP3 en embriones de 8.5 a 13.5 días (E8.5-13.5), encontrando una expresión muy dinámica principalmente en los brotes de extremidades, primordios de glándulas

mamarias, y en el corazón en desarrollo (Escalante-Alcalde et al., 2009). Sin embargo, aunque desde hace tiempo se sabe que LPP3 es abundante en el cerebro adulto (Sciorra y Morris, 1999), donde además su actividad es muy alta (Waggoner et al., 1995), no se ha descrito la distribución celular y subcelular de esta proteína ni sus funciones en este sitio.

2.5 Funciones de las LPPs

Las primeras funciones descritas para las LPPs derivan de trabajos realizados en la mosca *Drosophila* y en modelos mamíferos *in vitro*. Experimentos realizados con Wunen, el homólogo de LPP3 en la mosca, demostraron que esta enzima está involucrada en la regulación de la migración de las células germinales primordiales (Zhang et al., 1997), volviéndose este proceso aberrante en respuesta a la sobre expresión de la LPP3 de ratón, mientras que la introducción de LPP1 no indujo cambios observables (Burnett y Howard, 2003). Por otro lado, la sobre-expresión de LPP3 ocasiona una reducción en el crecimiento, sobrevivencia y tumorigenesis de células derivadas de cáncer de ovario, mediado por el aumento en la degradación del LPA (Tanyi et al., 2003).

Las investigaciones realizadas con ratones modificados genéticamente han reforzado la idea de funciones diferentes para cada LPP. Los ratones que sobre expresan LPP1 presentan una reducción del 50% en su peso corporal, problemas de espermatogénesis y en los folículos pilosos, lo que daña la estructura del pelo (Yue et al., 2004). Los ratones KO para la LPP1 resultaron ser viables, fértiles y sin distinciones fenotípicas al ser comparados con su contraparte silvestre, aunque los niveles en plasma de LPA presentaron un incremento atribuible a la falta de actividad de esta enzima (Tomsig et al., 2009). Por otro lado, el ratón con la mutación nula para LPP2 resultó ser fértil, viable, sin defectos fenotípicos notables (Zhang et al., 2000a). En contraste los ratones KO de LPP3 presentan múltiples e importantes fenotipos que conducen a la muerte en etapas embrionarias tempranas (Escalante-Alcalde et al., 2003). Los embriones deficientes de LPP3 no logran formar la placenta corio-alantoidea ni la vasculatura del saco vitelino por lo que mueren a los 9.5 días. Adicionalmente se observó un acortamiento del eje anteroposterior y problemas de gastrulación en etapas más tempranas. Además se observó en fibroblastos embrionarios cambios en la concentración de LPA, PA y DAG en el sentido esperado.

Haciendo el recuento de la información referente a las LPPs, resulta interesante analizar las características únicas que presenta la LPP3 respecto a las otras isoenzimas. Por ejemplo LPP3 cuenta con una fina regulación tejido específica durante el desarrollo y su presencia es fundamental para la sobrevivencia embrionaria. Sin embargo, aunque el patrón de expresión de LPP3, la abundancia de sus sustratos y la de los receptores de estos últimos en el SN adulto y en desarrollo sugieren importantes funciones para esta enzima, no se cuenta con información comprobada de las funciones de LPP3 en este sistema *in vivo*. La información de la que se puede partir para proponer alguna hipótesis de investigación deriva de las funciones de sus sustratos en el SN, lo cual ha sido tratado para cada uno de ellos, al inicio de la introducción.

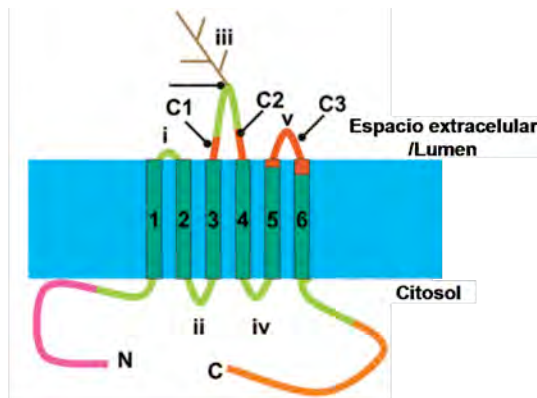


Figura 3. Topología general de las LPPs. Se muestran las 6 regiones de las secuencias hidrofóbicas que forman α -hélices numeradas 1-6. Las secuencias restantes forman asas extra-membranales numeradas de i-v. En el asa iii se encuentran los sitios para glicosilación (café). En anaranjado se muestran las secuencias que forman el dominio catalítico (C1-C3), conservado en todas las LPPs. N, amino terminal; C, carboxilo terminal (Modificado de Sigal et al., 2005).

¿Qué funciones podrían desempeñar LPP3 en el SNC?. Como se ha mencionado antes, la mayor actividad de las LPPs se encuentra en cerebro (Waggoner et al., 1995), siendo precisamente este tejido el que presenta mayor cantidad de la enzima LPP3 (Sciorra y Morris, 1999). Cualquiera que sea la función de LPP3 en el SNC, ya sea durante el desarrollo o en el adulto, se puede relacionar con la regulación de las actividades que sus sustratos tienen en este sistema. Por lo tanto, LPP3 podría interferir en procesos de diferenciación neuronal y astrocítica, migración celular, regulación de la actividad sináptica e inclusive controlar el destino celular de proliferación y muerte mediante la regulación del reostato de esfingolípidos.

La expresión de LPP3, analizada a través de genes reporteros e inmunohistoquímica, es dinámica a lo largo del desarrollo del SNC y se presenta en sitios clave como lo es la placa del piso en el estadio E8.5-10.5. También se ha descrito la presencia de LPP3 en los

axones de neuronas de ganglios craneales y ganglios de la raíz dorsal, así como de neuronas motoras y sensoriales de embriones de ratón de 9.5-12.5 días, lo que sugirió la participación de LPP3 en el crecimiento axonal durante el desarrollo (Escalante-Alcalde et al., 2009). Datos generados por nuestro grupo de trabajo indican que la deficiencia de la actividad de LPP3 en cultivos de motoneuronas, diferenciadas a partir de células troncales, ocasiona defectos en la extensión de neuritas (Sanchez-Sanchez et al, en preparación). Aparte de esta información, no existen otra indicaciones acerca de la posible función de LPP3 en el SNC por lo que resulta importante la realización de este tipo de estudios especialmente *in vivo*.

La muerte temprana del embrión KO de LPP3, demuestra que al menos durante el desarrollo, la función de LPP3 no puede ser remplazada por algún otro miembro de su familia, sin embargo esta mortalidad también ha impedido una descripción adecuada de funciones de LPP3 en el desarrollo del SN posterior a E9.5. Durante el desarrollo del cerebro de la rata la expresión mas elevada del mRNA de LPP3 se detecta en las zonas ventriculares hasta el día postnatal 7 (P7), mientras que en la zona intermedia y del manto no se detecta su mRNA, por lo que se ha sugerido una expresión de LPP3 dominante en células progenitoras y glía radial en el sistema nervioso. En el adulto, el transcrito de LPP3 se reduce a pocos sitios siendo el mas abundante el cerebelo, donde el patrón regional sugiere que se expresa en la glía de Bergmann (BG) (Suzuki et al., 1999), lo que apunta a posibles funciones en la fisiología y desarrollo de esta región del cerebro.

2.6 Estructura y Función del cerebelo

Debido a que en el organismo adulto se ha detectado la mayor expresión de LPP3 en el cerebelo y con el fin de generar una base de información útil para la descripción y entendimiento de los resultados observados, a continuación se describen características sobresalientes acerca de la función del cerebelo, de su estructura y del desarrollo que conduce a su organización laminar.

El cerebelo es la región mas posterior del cerebro que presenta una organización laminar antero-posterior acomodada en pliegues conocidos como lóbulos o folias, lo que permite la ampliación del área de este patrón laminar. En el plano sagital, el cerebelo presenta una parte central conocida como vermis y dos lóbulos o hemisferios a los lados

del vermis (Fig. 4). El tamaño relativo y la complejidad de su foliación se relacionan estrechamente a la posición filogenética del organismo de análisis. En los mamíferos el cerebelo representa tan solo el 10% del peso del encéfalo, sin embargo contiene la mitad del total de las neuronas de éste. Si se desplegara la superficie foliar del cerebelo humano en el eje antero-posterior, sería una lámina de 1 metro de longitud (Delgado-García, 2001).

Una de las clasificaciones más sencillas acerca de la función del cerebelo, es la que agrupa a sus folias (principalmente a nivel del vermis), de acuerdo a las funciones corporales que regulan. Esta clasificación se basa primordialmente en estudios de daño y función, además de enfocarse al desarrollo de las folias en la escala evolutiva. De esta manera el cerebelo queda clasificado en arquicerebelo, paleocerebelo y neocerebelo.

Arquicerebelo o cerebelo vestibular: Es la región filogenéticamente más primitiva que corresponde al lóbulo X o noduloflocular (Fig. 4). Se relaciona con el aparato vestibular, es decir con el mantenimiento de la postura corporal en reposo y movimiento. Además controla los movimientos oculares y el equilibrio. Se ha descrito que los núcleos del cerebelo reciben eferencias vestibulares y visuales que se relaciona con cambios en la ganancia (relación entre la entrada sensorial y la respuesta motora) del reflejo vestíbulo ocular, en función de las circunstancias del entorno. Así, las lesiones de esta parte del cerebelo producen síntomas relacionados con el mantenimiento de la mirada (nistagmo espontáneo), o con los reflejos posturales (dificultad para mantener la postura erguida sin ayuda visual).

Paleocerebelo o cerebelo espinal: corresponde a los lóbulos I-V y VIII-IX con aferencias de origen espinal y trigeminal. Se le atribuyen funciones de control y regulación de la musculatura axial. Controla la musculatura espinal proximal a través de proyecciones del vermis con relevos en el núcleo fastigial y la musculatura de las extremidades. Las lesiones de esta región del cerebelo afectan funciones relacionadas a la coordinación motora, a la marcha, a la realización de secuencias de actos motores coordinados o a la localización de las diferentes partes del cuerpo en su entorno físico inmediato. Por lo tanto los síntomas de la lesión de esta región (o de su vía de salida, el núcleo interpósito) se basan en la presencia de temblor al realizar actos voluntarios como alcanzar un objeto y a su vez una pobre amortiguación de reflejos espinales.

Neocerebelo ó cerebelo cerebral: corresponde a lo lóbulos VI y VII que alcanzan su máximo desarrollo en los hemisferios de primates. Las principales aferencias de esta región provienen de la corteza cerebral a través del haz córtico-ponto-cerebeloso compuesto por unos 20 millones de axones (una gran cantidad en comparación con el nervio óptico de solo 1 millón de fibras). También recibe aferencias espinales, visuales y acústicas. Interacciona con regiones corticales de funciones motoras así como perceptivas y cognitivas, a través de sus proyecciones de los hemisferios cerebelosos hacia el núcleo dentado. La lesión de esta región afecta funciones motoras menos estereotipadas y de más compleja ejecución como el desarrollo de nuevas habilidades motoras, el cálculo de la amplitud y fuerza con las que hay que realizar un movimiento, o incluso la elaboración mental de actos motores en procesos de aprendizaje (Delgado-García, 2001; Kandel et al., 2000; Manni y Petrosini, 2004).

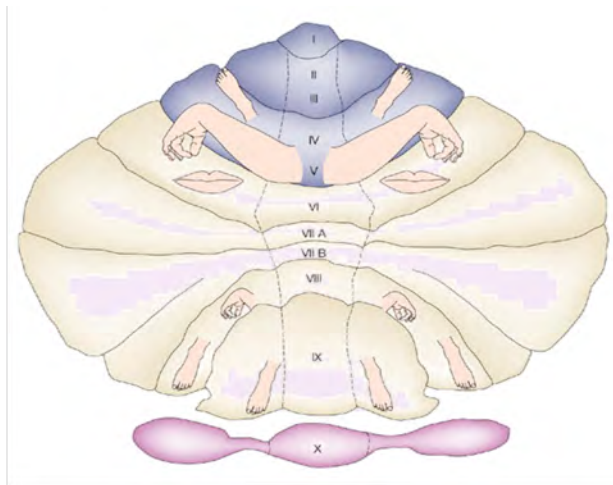


Figura 4. Representación de la organización de somatotopía del cerebelo. El mapeo sensorio-motor del cerebelo propuesto (Grodd et al., 2001), clasifica a las regiones del cerebelo por las partes del cuerpo que controlan (pies, brazos, manos y labios, representados sobre el cerebelo). Los números romanos identifican al número de folias. En azul se muestra el lóbulo anterior, en crema el posterior y en violeta el lóbulo floclonodular (Modificado de Manni y Petrosini, 2004).

2.7 Desarrollo y organización laminar del cerebelo

El cerebelo se forma a partir de la zona dorsal del rombomero 1 del cerebro posterior en desarrollo, en el día E9 en el ratón. Una serie de movimientos del eje antero-posterior hacia la línea media-lateral, le dan al primordio del cerebelo una apariencia tipo salchicha en el plano transversal en el día E15 (Sillitoe y Joyner, 2007). Este primordio uniforme, para el día 17.5 comienza a desarrollar una fisura en su zona mas anterior y posterior. Consecutivamente se desarrollan nuevas fisuras siguiendo una secuencia cronológica y antero-posterior. Como se mencionó anteriormente el patrón de foliación se encuentra mas elaborado conforme avanza la escala evolutiva y presenta especificidad de ciertas

folias para tareas sensorio-motoras llegando a toda una clasificación de somatotopia (Manni y Petrosini, 2004). Se ha descrito que un evento clave para el desarrollo de estas folias es la aparición de los “sitios de anclaje” los cuales se convertirán en la base de las folias. La proliferación de las células granulares (GC) en la capa granular externa (EGL) y su posterior migración hacia la capa granular interna (IGL), promueven una invaginación en el centro de anclaje, comenzando así la formación de las folias. Así, en el día postnatal 5, el crecimiento de las folias continúa por la migración de las GC, mientras que en la base se puede apreciar aún el sitio de anclaje de la folia. Durante este proceso, la glia radial o BG inmadura juega un papel importante al ser el andamio de migración de las GC, formando radios en forma de abanico en los sitios de anclaje para el adecuado crecimiento de las folias (Sudarov y Joyner, 2007). Otra importante función de la BG durante el desarrollo es su participación en el establecimiento del árbol dendrítico de las células de Purkinje (PC), proceso que tiene su mayor actividad durante la etapa postnatal hasta el día P15. Recíprocamente, la interacción de las PC con la BG, es necesaria para que esta última forme ramificaciones secundarias y terciarias a partir de sus procesos principales (Yamada et al., 2000).

Una vez que la proliferación en la capa granular externa ha cesado y todas las GC han migrado sobre los radios de la BG, la capa granular externa desaparece y el cerebelo obtiene la configuración del cerebelo adulto, la cual es relativamente sencilla y se repite a lo largo y ancho del cerebelo. Así, en el cerebelo adulto existen tres capas definidas por los tipos celulares que las componen; de la zona mas interna o medular del cerebelo (axones de las PC) hacia la zona mas cortical y cercana a la pía: 1) La capa granular, que es donde se encuentran los somas de las células granulares y de las células de Golgi, 2) la capa de PC (PCL) donde se encuentran los somas de las PC y de la BG, y 3) la capa molecular que es donde se encuentran las interneuronas como las células estrelladas y en cesta, además de los árboles dendríticos de las PC en estrecha interacción con los procesos de la BG y las fibras paralelas que corresponden a los axones ascendentes y bifurcados de las GC. En esta última capa es donde toda la información recibida y procesada del cerebelo converge en las sinapsis establecidas con el árbol dendrítico de las PC, las cuales integran toda la información y emiten la única respuesta del sistema a través de sus axones. Resulta útil señalar que ya en el cerebelo adulto la BG cumple con

las funciones típicas de un astrocito, como son: aportar de sustratos metabólicos a las neuronas, proveerles del ambiente iónico que necesitan y responder al daño neuronal con el proceso de activación astrocítica. Además uno de los procesos mas estudiados en la BG, debido a su estrecha relación con la PC, es el de la recaptura de neurotransmisores liberados en la sinapsis. Por ejemplo, cambios en la actividad de su transportador de glutamato Glast, pueden afectar las corrientes postsinápticas excitadoras medidas en la PC (Bordey y Sontheimer, 2003). Además, se ha descrito que la BG presenta cambios a corto plazo en sus propiedades electrofisiológicas (Bellamy y Ogden, 2005) y que incluso puede generar distintas ondas de Ca^{2+} en respuesta a la actividad motora (Nimmerjahn et al., 2009).

2.8 Justificación

El estudio de los lípidos bioactivos, como los LPs, es un campo de creciente interés debido a las importantes funciones que éstos regulan en el desarrollo, la fisiología y la patología de los organismos. La regulación de la disponibilidad de los LPs llevada a cabo por las LPPs, es un tema de gran interés del cual se sabe muy poco hasta la fecha, especialmente en el sistema nervioso. La necesidad vital de la expresión de la LPP3 durante el desarrollo temprano, además de su alta expresión y actividad en el cerebro adulto, establecen la necesidad de describir su distribución específica, y las funciones en las que participa esta enzima especialmente en modelos de estudio del SN *in vivo*.

2.9 Antecedentes

Con el objeto de describir el patrón de expresión regional y temporal de la LPP3 en el ratón, Escalante-Alcalde y colaboradores (Escalante-Alcalde et al., 2009), generaron una línea de ratones “Knock-in”, que expresan a la proteína reportera β -galactosidasa (β -gal) bajo el control transcripcional del gen que codifica a la LPP3 (**LPP3-KI**). Con este modelo, se estudió la expresión de LPP3 durante el desarrollo temprano. Específicamente en el SN se describió que los axones de neuronas de ganglios craneales y de raíz dorsal, así como de neuronas motoras y sensoriales de embriones de 9.5-12.5 días expresan LPP3 en abundancia, lo que además condujo al estudio de la participación de LPP3 en el crecimiento axonal *in vitro* (Sanchez-Sanchez et al, preparación).

Con el fin de describir los efectos producidos por la ausencia de la actividad de LPP3 *in vivo* de una manera temporal y tejido-específica, Escalante-Alcalde y colaboradores (Escalante-Alcalde et al., 2007), establecieron una línea de ratones en los que los exones 3 y 4 del gen que codifica a la LPP3 (región crítica para su actividad catalítica) se encuentran flanqueados por secuencias *loxP* (**LPP3 f/f**), y por lo tanto la escisión de esta región puede ser dirigida por la recombinasa Cre. Los ratones en los que se llevó a cabo la recombinación generalizada mediada por Cre presentan un fenotipo letal, idéntico al descrito anteriormente para los ratones carentes de la actividad de LPP3 (Escalante-Alcalde et al., 2003). Como se mencionó anteriormente el transcrito de Dri42 (homólogo de LPP3 en rata), se expresa dinámicamente durante el desarrollo del cerebro, y que en adulto es principalmente expresado en la BG del cerebelo (Suzuki et al., 1999), lo que sugirió un posible papel de esta enzima en el desarrollo y función de esta región del cerebro.

2.10

Hipótesis

La fosfatasa de lípidos fosfatados-3 se expresa en la glia de Bergmann del cerebelo de ratón y regula el metabolismo de lípidos fosfatados por lo que su ausencia afecta el desarrollo y la fisiología de esta región del cerebro.

2.11

Objetivo general

Caracterizar el patrón de expresión temporal y regional de la LPP3 durante el desarrollo y madurez del cerebelo de ratón, así como los efectos de su ausencia en el linaje neuroglial.

2.12

Objetivos particulares

- Caracterizar el patrón de expresión celular y subcelular específico de la LPP3 en el cerebelo de ratón durante el desarrollo y en el organismo adulto, a través de la detección del gen reportero β -galactosidasa expresado bajo el control transcripcional de *Ppap2b*, así como utilizando herramientas de inmunodetección.
- Inactivar la función de LPP3 de manera condicionada al linaje neuroglial de ratón (CKO), mediante la escisión de los exones 3 y 4 (flanqueados por sitios *loxP*) de *Ppap2b* promovida por la recombinasa Cre, expresada bajo la regulación transcripcional del marcador neuroglial nestina.
- Describir modificaciones histológicas y citológicas del cerebelo del ratón CKO en desarrollo y maduro a través de técnicas histológicas y de inmunodetección.
- Analizar cambios en la concentración de lípidos sustratos de LPP3 en los organismos CKO utilizando espectrometría de masas.
- Analizar conductas asociadas al funcionamiento del cerebelo del ratón CKO, mediante la aplicación de una batería de pruebas conductuales.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas de ratones e inactivación de LPP3 SNC-específica (CKO)

- Para analizar el patrón de expresión de LPP3 se utilizó el alelo *Ppap2b*^{tm2Stw} previamente descrito, que expresa al gen bacterial que codifica para la β-galactosidasa como reportero de la expresión LPP3 (Escalante-Alcalde et al., 2009).

- Para la inactivación de LPP3 en el linaje neuroglial (CKO), hembras homocigotas o heterocigotas de la cepa *Ppap2b*^{tm3Stw} o alelo *f* (Escalante-Alcalde et al., 2007), fueron cruzadas con machos *Tg(Nes-Cre) 1Kln; Ppap2b*^{tm3Stw/tm3Stw} [Nes-Cre, Jackson laboratories, (Tronche et al., 1999)]. En la figura 5 se esquematizan las características de cada genotipo (A), el proceso de recombinación (B) y los análisis realizados a los ratones resultantes (C).

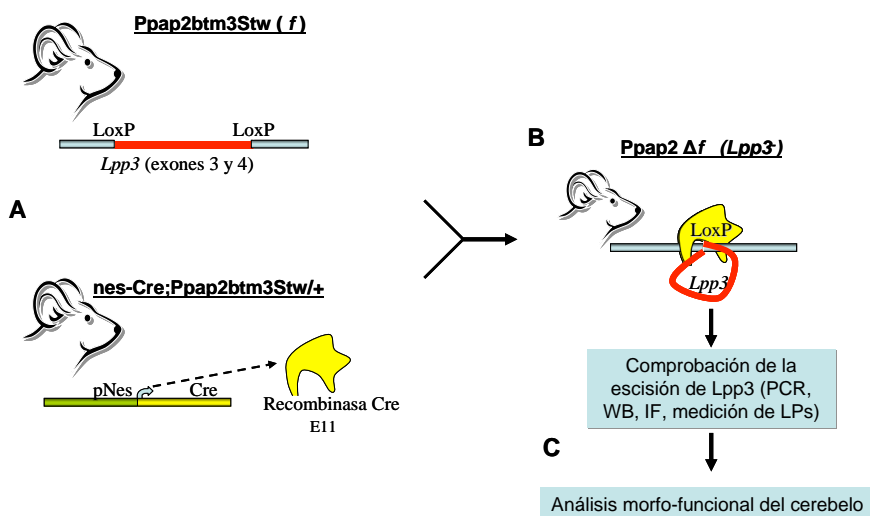


Figura 5. Proceso de escisión condicional de LPP3 en sistema nervioso. A) Los ratones LPP3CKO o Δf se obtuvieron a partir de ratones que llevan a los exones 3 y 4 de LPP3 (región roja) flanqueados por sitios *loxP* (*Ppap2b*^{tm3Stw} o *f*). Dichos sitios son reconocidos por la recombinasa Cre, expresada bajo la dirección del promotor del marcador neuroglial nestina (región verde) en los ratones *nes-Cre; Ppap2b*^{tm3Stw/tm3Stw} a partir del día embrionario 11 (E11). B) Un porcentaje de la progenie de la cruce de estos ratones, hereda el transgen *nes-Cre*, por lo que se escinde una región de DNA que codifica a la LPP3 (Δf) resultando en su inactivación. C) La comprobación de la escisión del gen se realizó mediante PCR, mientras que la ausencia de la proteína se comprobó por ensayos de Western Blot (WB) e inmunofluorescencias (IF). La inactivación de LPP3 se ve reflejada en un aumento en la concentración de sus LPs sustrato. Una vez comprobada la eficiencia del sistema, se procede al análisis conductual, histológico y citológico en adulto o durante el desarrollo.

3. 2 Purificación de DNA genómico y genotipificación de ratones

Para la obtención de DNA se utilizaron trozos de cola de ratón o tejido nervioso y se dirigieron con solución de lisis (SDS 2%, NaCl 10 mM, EDTA 10 mM, Tris/HCl 10 mM,

proteinas K 1.5 mg/ml [Roche]) a 37°C por toda la noche. La digestión fue sometida a purificación por fenol: se agregó 1 vol de fenol, 1 vol de cloroformo, se agitó y se recuperó la fase acuosa a la que se agregó 1 vol de cloroformo. Después de recuperar la fase acuosa, el DNA se precipitó con 1 vol de alcohol isoamílico y se dejó secar para después resuspender en TE.

El genotipo *f* o Δf , fue identificado por PCR a partir del DNA purificado, como previamente se ha reportado (Escalante-Alcalde et al., 2007). La mezcla de reacción de PCR contiene solución amortiguadora (Roche), dNTPs 0.2 mM, Taq polimerasa (Unidad de microarreglos IFC-UNAM) 0.2 u y 30 pmoles de los oligonucleótidos por reacción. Lo oligonucleótidos empleados fueron: c. sentido 5' GAA GTG CCA TTA CTC TCT CAG C 3'; d. antisentido 5' CCA GGG TGC TAT CTA TCT GTA AC 3'; a. sentido: 5' CTA CAG ATG TCA GTC AGT GTG G 3'. En estas condiciones los oligonucleótidos generan amplicones de distinta longitud dependiendo el genotipo del individuo como se detalla en la figura 6. Para detectar al presencia de Cre se utilizaron las mismas condiciones pero con los oligonucleótidos siguientes; 5'GCGGTCTGGCAGTAAAA CTATC 3' y 5' GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT 3'. En ambas PCR se utilizaron 30 ciclos de amplificación con una temperatura de alineamiento de 60°C para el alelo condicional y 56°C para Cre. Los productos amplificados por PCR se separaron por electroforesis y se tiñeron con bromuro de etidio.

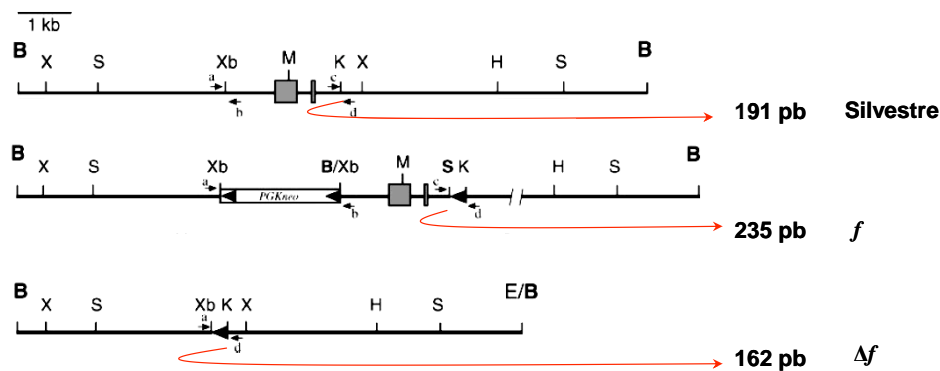


Figura 6. Comprobación de la escisión de la región de *Ppap2b*. La región genómica del fragmento *BamHI* (B) que contiene a los exones 3 y 4 del gen que codifica para la LPP3 muestra la posición de los oligos c y d (en letras minúsculas) con los que se genera por PCR un fragmento de 191 pares de bases en la condición silvestre. En medio se muestra la misma región a la que se introdujeron: un caset PGKneo flanqueado por sitios *loxP* y un sitio *loxP* huérfano en el sitio S (triángulos oscuros). En esta condición (*f*) los oligos c y d amplifican un fragmento de 235 pb. Por último, la actividad de la recombinasa Cre, escinde la región contenida entre los sitios *loxP* distantes, lo que incluye al caset PGKneo y a los exones 3 y 4. En esta condición (Δf), los oligonucleótidos a y d amplifican un fragmento de 162 pb. X, *XmaI*; S, *Sall*; Xb, *XbaI*; M, *MunI*; K, *KpnI*; H, *HindIII*; E, *EcoRI* (modificado de Escalante-Alcalde et al., 2007).

3.3 Tinción de β -galactosidasa

Ratones heterocigotos de la cepa *Ppap2b*^{tm2Stw} (Escalante-Alcalde et al., 2009), que llevan al gen reportero *lacZ* en el locus *Ppap2b*, fueron cruzados entre ellos y los cerebros de su progenie de las edades de interés, fueron cortados en el plano sagital y sometidos a la tinción de β -galactosidasa (Nagy A. et al, 2003) de la siguiente manera. Los cortes de cerebro fueron incubados por 15 min. en solución fijadora (Amortiguador de fosfatos 0.1 M, glutaraldehído 0.2%, EGTA 5 mM, MgCl₂ 2mM), lavados tres veces en solución de lavado (amortiguador de fosfatos 1 mM, MgCl₂ 2mM, Nonidet P-40 0.02%) e incubados por toda la noche en solución de tinción (amortiguador de fosfatos 1 mM, MgCl₂ 2mM, Nonidet P-40 0.02%, ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, X-gal 20 mM). Las muestras fueron fotografiadas, post-fijadas en paraformaldehído 4% (en PBS) y embebidas en parafina, para ser cortadas en secciones de 6-10 μ m y contrateñidas en caso de ser necesario. La visualización de las muestras se hizo por microscopia usando óptica de Nomarski o estereoscópica.

3.4 Pruebas de coordinación motora

Defectos graves en la coordinación motora fueron evaluados usando la prueba de Rota-rod en animales de 1 o 3-5 meses de edad. Después de dos sesiones de entrenamiento, los ratones fueron puestos a prueba en el Rota-rod por 240 seg o hasta que cayeran de la rueda (tiempo de permanencia en Rota-rod). Se dejaron pasar 2 minutos entre cada ensayo independientemente al tiempo de permanencia de cada ratón. Cada prueba consistió de 10 ensayos. Las pruebas se hicieron a velocidades de 20 y 30 rpm en días consecutivos. Para evaluar defectos en la coordinación motora fina, ratones de 1 mes de edad fueron sometidos a la prueba de locomoción de la barra fija. Los parámetros evaluados fueron el tiempo de permanencia sobre barras de 7mm y 5 mm de diámetro (hasta 240 seg) y el patrón de locomoción sobre la barra.

3.5 Ensayos de Western Blot

Cerebelos y pulmones de ratones silvestres y CKO fueron homogenizados en solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP40) con inhibidores de proteasas

(Roche) y fosfatasas (1mM NaVO₄, 10 mM NaF). Después de centrifugar (14000 rpm, 5 min, 4°C) se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína. Una muestra de 30 µg de proteína fue hervida en solución de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% glicerol, 100 mM DTT, 0.001 % azul de bromofenol), separada por electroforesis en un gel SDS-poliacrilamida y transferida a membranas de PVDF (Hybond-P Amersham). Las membranas fueron incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios en las siguientes diluciones: anti-LPP3 (conejo), 1:2000 [(Sciorra y Morris, 1999); Sigma-Aldrich]; anti-Glast (cuyo), 1:3000 (Chemicon); anti-GAPDH (ratón), 1:3000 (Chemicon); anti-BLBP (conejo), 1:3000 (Millipore); anti-GFAP (conejo), 1:2000 (DAKO); anti-EDG1 (S1P₁, conejo) y anti-Actina (cabra), 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology); (conejo) anti-ERK1/2, anti-pERK1/2, anti-AKT, anti-pAKT y anti-pPKCpan 1:1000 (Cell Signaling); anti-PKC (ratón), 1:500 (BD Biosciences). Las membranas se revelaron usando el sistema de quimioluminiscencia ECL-Plus (Amersham). El análisis densitométrico de las películas se realizó empleando el programa Image J (NIH), y los datos normalizados respecto a actina, GAPDH, total ERK1/2, AKT o pan-PKC y expresados como niveles de proteína en relación al control.

3.6 Inmunofluorescencias, ensayo TUNEL y microscopía confocal

Los cerebros de ratones perfundidos con PBS, fueron fijados en paraformaldehído 4% toda la noche y cortados en secciones sagitales de 30 µm con la ayuda de un vibratomo (Leyca microsystems). Para las inmunofluorescencias; cortes en flotación fueron permeabilizados y bloqueados en solución de bloqueo 1% (Roche cat 1 096 176) diluida en PBS-Tween 0.3 % por 2 horas. Los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo fueron incubados toda la noche: anti-calbindina (conejo) (1:100, AB1778 Millipore), anti-parvalbumina (ratón) (1/1000, P3088 Sigma), anti-BLBP (conejo) (1/200, AB9558 millipore), anti-GFAP (conejo) (1/1000, Dako), anti-PCNA (ratón) (1/100, Vector), anti-p-Histona-H3 (conejo) (1/100, Cell Signaling), anti-Glast (cuyo) (1:1000); anti-p27 (conejo) (1:100, Santa Cruz); anti-S100B (ratón) (1:100, Millipore); anti-EDG1 (conejo) (1:100). Para la inmunodetección de LPP3, se desarrolló en conejo (Sigma) un anticuerpo basado en la región del amino terminal de la LPP3 de humano previamente descrita (Sciorra y Morris, 1999), la cual presenta reacción cruzada con la proteína de

ratón. Este anticuerpo se usó a una dilución 1:200. Los anticuerpos secundarios usados están acoplados a Alexa 488 y 594 (Invitrogen) o peroxidasa de rábano. Para la evaluación de muerte celular *in situ* los cortes de cerebro fueron montados en laminillas, se incubaron con solución para permeabilizar (proteínasa K 10 µg/ml, Tris-HCl 10 mM pH 7.4) por 5 min a temperatura ambiente, y se trataron según las indicaciones del proveedor (TUNEL kit assay, Roche); la mezcla de soluciones de marcado y de enzima se incubó por 1 hora a 37°C en atmosfera húmeda y posteriormente se lavó con PBS. Todas las preparaciones (inmunofluorescencia y TUNEL) fueron montadas con medio Vectashield (Vector) previa tinción con DAPI y examinadas por microscopía confocal (FV1000, Olympus). Las imágenes de doble o triple color fueron adquiridas con adquisición secuencial para evitar la excitación cruzada.

3.7 Cuantificación celular

Para la evaluación morfológica del cerebelo y sus tipos celulares, imágenes de los cerebros de ratones mutantes y silvestres en zonas equivalentes fueron obtenidas por microscopía óptica o confocal en las mismas condiciones de adquisición. El número de somas de PC y BG en 300 µm lineales de PCL fueron considerados por su inmunoreactividad a los marcadores calbindina y BLBP respectivamente. Así mismo fueron cuantificadas las interneuronas inmunoreactivas a parvalbúmina y los somas de la BG con núcleo evidente, contenidos en la capa molecular y por encima de los mismos 300 µm de PCL. Las células positivas a TUNEL y a fosfo-histona H3 encontradas en la EGL, PCL y ML (si se encontraron presentes) se contaron por lóbulo o folia. El número total de células positivas por capa del cerebelo se cuantificó y la cantidad encontrada en los CKO se expresó como el porcentaje relativo a la cantidad encontrada en sus hermanos control (100%).

3.8 Evaluación de concentración de LPs

Para la extracción de lípidos, fragmentos de cerebelos perfundidos (aprox. 20 mg) se homogenizaron en 2 ml de CH₃OH frío y 0.5 ml 0.1 M HCl. Se agregó 1 ml de CHCl₃ con 50 pmol de LPA C17 (especie no natural de LPA), se agitó la muestra por 5 min y se incubó a 4°C por 1 hora. Se agregó 1 ml de CHCl₃ y 1.3 ml de HCl 0.1 M, se agitó por 5

min y la muestra se centrifugó a 3000xg por 10 min. La fase inferior fue recuperada y el solvente fue evaporado con N₂. Las muestras evaporadas se enviaron al laboratorio del Dr. Andrew Morris (U. Kentucky, USA) para su análisis por espectrometría. Cada muestra se resuspendió en 100 µl de CH₃OH:CHCl₃ 4:1 de los que se tomaron 10 µl para la determinación de lípidos totales fosforilados después del tratamiento con ácido perclórico. La muestra restante se analizó por HPLC seguido de espectrometría de masas para evaluar: S1P, dihidro-S1P, y 16 especies moleculares abundantes de LPA, PA y lisofosfatidilcolina (LPC) utilizando el modo de monitoreo de reacción selectiva (Su et al., 2009). En resumen, un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal y triple cuadrupolo (ABI 4000 Q-Trap) se operó en el modo de ionización negativa para evaluar el LPA, la S1P y el PA, y en ionización positiva para la evaluación de LPC. Los potenciales de separación y las energías de colisión fueron optimizadas utilizando estándares sintéticos para cada clase de lípidos (Avanti Polar Lipids). Los lípidos se separaron en columnas Macherey-Nagel C8 (5 mm, 4.6 X 150 mm), y fueron eluidos por un gradiente de pasos del solvente A (CH₃OH:H₂O:HCOOH, 75:25:0.5, 5 mM NH₄COOH), y solvente B (CH₃OH:H₂O:HCOOH, 99:1:0.5, 5 mM NH₄COOH) para posteriormente ser analizados en el modo de detección de reacción selectiva que detecta pares de iones, productos de los precursores específicos de las especies de lípidos. Los datos se corrigieron considerando la cantidad del estándar interno de C17 recuperado. Las especies de lípidos se cuantificaron con respecto a curvas de calibración generadas con los estándares sintéticos los cuales se cuantificaron independientemente por mediciones exactas de masa o por determinación de lípidos fosfatados. Los datos mostrados representan la media de tres determinaciones en muestras independientes. Los valores representan la media ± el error estándar y se utilizó una prueba de t de Student para comparar los grupos.

3.9 Aislamiento de RNA, síntesis de cDNA y PCR semicuantitativo

El RNA total de cerebelos silvestres o mutantes se extrajo mediante el uso de Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor; 100 mg de tejido fueron incubados con 1 ml de Trizol por 5 minutos y se agregaron 200 µl de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó por 3 min a temperatura ambiente para

después centrifugar a 12000 x g por 10 min. a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el RNA agregando 500 µl de isopropanol. La mezcla se incubó por 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g por 10 min. 4°C. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol 75% (centrifugando a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C), se dejó secar y se resuspendió en 100 µl de agua libre de RNasas (DEPC). La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando dos mezclas de reacción. La mezcla #1 incluyó 2 µg de RNA total, 0.5 µg de hexámeros con secuencia aleatoria (random primers, Invitrogen) en un volumen final de 11 µl. La mezcla #2 incluyó solución amortiguadora para RT, 1 mM de dNTPs, 30u de la enzima transcriptasa reversa AMV (Promega) en un volumen final de 14 µl. La mezcla #1 se incubó a 70°C por 5 minutos para relajar las estructuras secundarias en el RNA y permitir su apareamiento con los primers. Posteriormente se incubó por 1 min a 4°C y se le agregó la mezcla #2. La mezcla final se incubó por 60 minutos a 37°C y se inactivó la transcriptasa a 95°C por 10 minutos. Para la reacción de PCR semicuantitativa se realizó la co-amplificación de *Slpr1* y el control endógeno *Hprt* en las siguientes condiciones; 1X de solución amortiguadora para PCR (Roche), 0.4 mM dNTPs, 0.4 u de Taq, 2 µl del cDNA y 30 pmolas de cada oligonucleótido (*Slpr1* Sentido: 5' GGC CAC CAC TTA CAA GCT CAC 3', *Slpr1* Antisentido: 5' GAC TCA GAA CTG CGA CTG 3', *Hprt* Sentido: 5' CCT GCT GGA TTA CAT TAA AGC ACT G 3', *Hprt* Antisentido: 5'GTC AAG GGC ATA TCC AAC AAC AAA C 3'). La temperatura de alineamiento fue de 57°C con 25 ciclos de amplificación. Los productos amplificados por PCR se separaron por electroforesis y se tiñeron con bromuro de etidio. El producto amplificado a partir de *Slpr1* corresponde a 435 pb y de *Hprt* a 352pb

3.10 Cultivos organotípicos de rebanadas de cerebelo

Ratones silvestres o CKO de 7 días de edad, fueron perfundidos con solución ACSF (cloruro de colina 124 mM; KCl 2,5 mM, MgCl 1,3 mM; NaH₂PO₄ 1,2 mM; NaHCO₃ 26 mM; CaCl₂ 2,4 mM y glucosa 33 mM). En condiciones asépticas, fueron obtenidos los cerebelos y se cortaron en secciones parasagitales de 300 µm utilizando un vibratomo (Leica microsystems). Las rebanadas se trasladaron a dispositivos de cultivo Millicell CM (Millipore) y se colocaron en cajas de 30 mm con 1 ml de medio de cultivo (DMEM-F12 50%, suero de caballo 25%, HBSS 25%, glutamina 1 mM, KCl 25 mM, glucosa 6

mg/ml, y antibióticos). Estos cultivos se mantuvieron durante 48 horas a 37 ° y 5% de CO₂. Los tratamientos farmacológicos se añadieron al inicio del cultivo. Las rebanadas se fijaron con metanol y DMSO (4:1) durante la noche, se rehidrataron y se bloquearon con PBSTM (PBS 1X, tween 0.5% y leche descremada al 2%). La incubación de anticuerpos (BLBP 1:200 y anti-conejo Alexa 488 1:500) se realizó en PBSTM durante toda la noche y se hicieron 5 lavados de 1 hora después de cada incubación y las rebanadas se montaron en laminillas con medio de montaje Vectashield (Vector). La tinción de cada grupo se visualizó utilizando los mismos parámetros de microscopía confocal.

3.11 Tratamiento farmacológico

Para los tratamientos farmacológicos crónicos *in vivo*, el FTY720 (Cayman Chemical) fue administrado diariamente (0.3µg/g de peso corporal) vía i.p. El tratamiento abarcó 11 días a partir del día P3. El grupo control fue inyectado con el mismo volumen de vehículo. Los ratones fueron sacrificados en el día P14 y sus cerebelos fueron tratados conforme a los protocolos para inmuno-fluorescencia o -histoquímica como anteriormente se ha detallado.

4 RESULTADOS

4.1 LPP3 se expresa abundantemente en dominios específicos de la membrana de la glía de Bergmann (BG)

La expresión de LPP3 en el cerebro se analizó inicialmente con un alelo reportero del gen que codifica a la LPP3 (*Ppap2b*) el cual expresa a la β -gal bajo el control transcripcional del propio gen (Escalante-Alcalde et al., 2009). En los ratones adultos, la detección de β -gal fue mayor en la corteza del cerebelo, seguida del bulbo olfatorio, la corriente migratoria rostral, el sistema ventricular y en menor medida en el hipotálamo (Fig. 7A). En el cerebelo, β -gal se restringe a la capa molecular y capa de células de Purkinje (PCL, Fig. 7B), en donde los somas de la BG presentaron la mayor actividad del reportero. Este tipo celular es la glía radial que participa en el desarrollo del cerebelo, ayudando en la migración de las células granulares (GC) y en la morfogénesis del árbol dendrítico de las células de Purkinje (PC). Por otro lado, aunque en el adulto conserva la morfología radial, la BG se considera como un tipo de astrocito especializado, que se encarga de la remoción de neurotransmisores liberados durante la transmisión sináptica contribuyendo así al procesamiento de la información en el cerebelo (Bordey y Sontheimer, 2003). Además se ha descrito recientemente que posee propiedades características de células troncales (Alcock et al., 2007).

Para analizar la distribución sub-celular de LPP3 en la BG, se realizaron inmunofluorescencias dobles o triples utilizando anticuerpos contra LPP3, marcadores de la BG (Glast, S100b) y contra marcadores de las PC e interneuronas (Parvalbúmina, Fig. 7C-Q). La señal correspondiente a LPP3 se detectó en toda la ML, con un patrón de expresión similar al del transportador de glutamato Glast, es decir en dominios de la membrana de la BG que rodean al árbol dendrítico de la PC (Yamada et al., 2000). De hecho, imágenes de microscopía confocal revelaron que LPP3 colocaliza con Glast y que es indetectable en las PC. Además, LPP3 colocaliza con los procesos laterales de la BG inmunoreactivos a S100b pero fue difícil encontrarla en los procesos radiales principales, a no ser en regiones cercanas a la pía (Fig. 7 L-N, P). Estos resultados muestran que la expresión de LPP3 en la BG se restringe a dominios membranales que envuelven al árbol dendrítico de las PC y sus sinapsis.

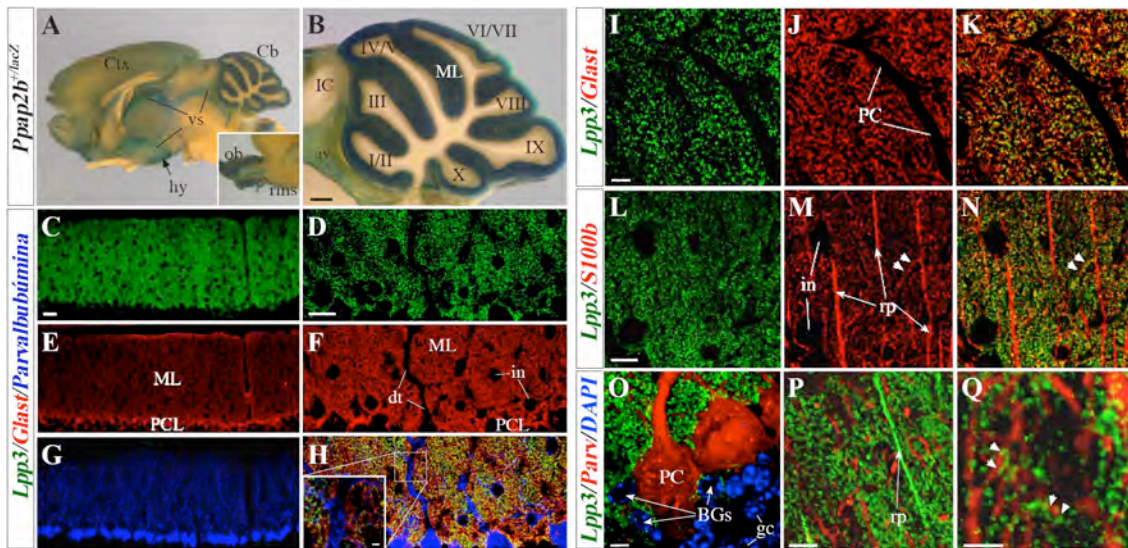


Figura 7. Expresión de LPP3 en el cerebro adulto y en la glía de Bergmann. A-B) Tinción de β -galactosidasa (azul) en el cerebro de un ratón del genotipo *Ppap2b^{+lacZ}*. Imágenes confocales de inmunofluorescencias triples (C-H) o dobles (I-Q) en la ML del cerebelo, utilizando anticuerpos contra las proteínas indicadas. LPP3 no se expresa en células positivas a parvalbúmina (H, O-Q), ni en los radios principales de la BG positivos a S100b (L-N), pero se co-inmunodetecta con Glast en dominios de la membrana de la BG (H-K), y con S100b en los brazos laterales de la BG (amarillo en N y puntas de flecha). Cerca de la superficie pial se aprecian algunos procesos radiales de la BG positivos a LPP3 (P). Nótese la estrecha asociación de los procesos marcados para LPP3 y las dendritas de la PC (Q, puntas de flecha). BGs: somas de la glía de Bergmann, Cb: cerebelo, Ctx: corteza, dt: árbol dendrítico de las PC, gc: células granulares, hy: hipotálamo, IC: colículo inferior, in: interneuronas, iv: cuarto ventrículo, ML: capa molecular, ob: bulbo olfatorio, Parv: parvalbúmina, PC: células de Purkinje, PCL: capa de células de Purkinje, rms: corriente migratoria rostral, rp: procesos radiales, vs: sistema ventricular. Con números romanos se indica la identidad de las folias del cerebelo. Barras de escala: B: 0.5mm; C,E,G: 30 μ m; D, F, H: 20 μ m, recuadro en H: 2 μ m; I:5 μ m, L:10 μ m; O-Q: 5 μ m.

4.2 LPP3 se expresa en la glía radial y la BG inmadura durante el desarrollo del cerebelo

Los precursores de la BG se generan en la zona ventricular del primordio del cerebelo alrededor del día embrionario 13 (E13). Éstos migran hacia la corteza, al contraerse sus procesos radiales adheridos a la superficie pial. En el periodo perinatal, los somas de la BG se van organizando en la PCL en orden rostro-caudal, al tiempo que sus procesos radiales cruzan la capa granular externa (EGL) y sus pies terminales forman la “glia limitans” a nivel de la pía. Así, los procesos de la BG sirven como andamio para la migración radial de las GC, mientras que el desarrollo de sus finos procesos reticulares acompaña al recubrimiento del creciente árbol dendrítico de las PC, durante la segunda semana postnatal (Yamada et al., 2000). Para analizar la expresión de LPP3 durante el desarrollo del cerebelo y de la BG, utilizamos al alelo reportero de *Ppap2b*, así como

ensayos de inmunodetección de LPP3 en cerebelos desde la etapa E16 hasta el día postnatal 10 (P10, Fig. 8). En el día E16 la expresión de LPP3 se encontró solo en dos dominios: la región mas medio-rostral y las regiones ventricular e intermedia (Fig. 8A).

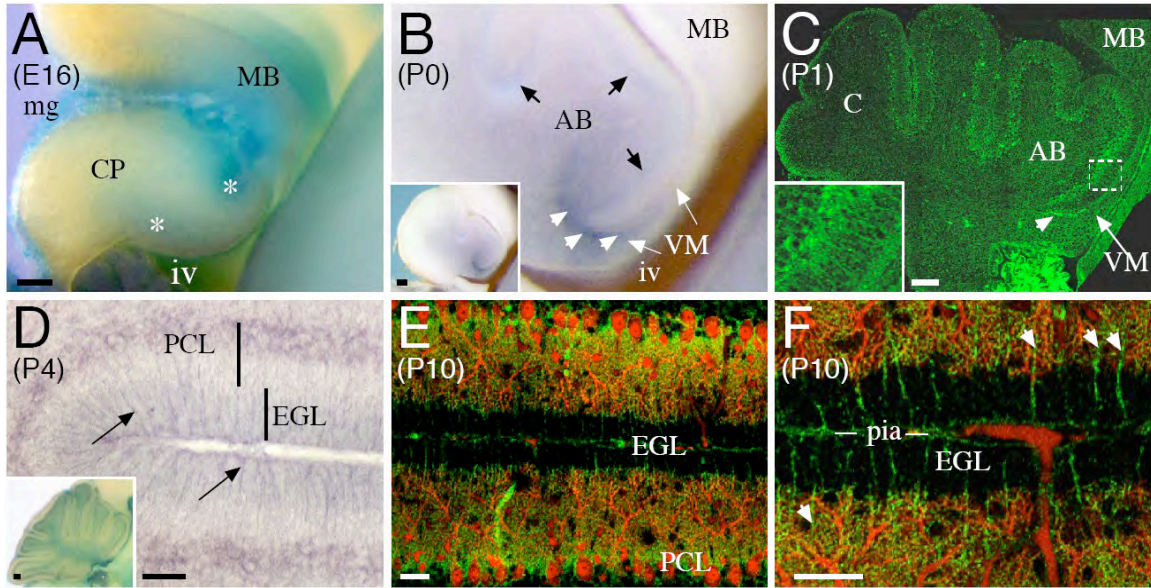


Figura 8. Expresión de LPP3 durante el desarrollo del cerebelo. Cerebelos *Ppap2b^{+lacZ}*, de las edades indicadas, fueron sometidos a la tinción de β -gal (azul, A y recuadro en D) o a la inmunodetección de LPP3 (verde) y parvalbúmina (rojo, E, F). CP, primordio del cerebelo; MB, cerebro medio; mg, meninges; iv, cuarto ventrículo. Los asteriscos en A muestran los dominios de expresión de *Ppap2b*, las puntas de flecha en B y C señalan la expresión de LPP3 en el cerebelo anterior y VM, y las flechas negras señalan su expresión en la PCL en desarrollo. La letra c en el panel C indica el lóbulo central en desarrollo. El recuadro en C muestra los procesos radiales de la BG inmadura inmunoreactivos a LPP3. Las flechas en D y puntas de flecha en F señalan los procesos radiales positivos a LPP3. Barras de escala: A-C y recuadro en D, 100 μ m; D, F, 20 μ m; E, 30 μ m.

Alrededor del periodo perinatal (Fig. 8B-C), se observó un dominio con fuerte expresión de LPP3 en la unión entre la parte más rostral del primordio del cerebelo y el *velum medullaris* (VM, ver mas adelante). Además, las células que expresan LPP3 se hicieron evidentes en la PCL inicialmente de los lóbulos más rostrales y en las fisuras posteriores en formación. La aparición de estas células con procesos radiales que atraviesan la EGL coincide con el alineamiento de la BG en la PCL, sugiriendo que la identidad de estas células corresponde a la BG (Fig. 8C recuadro). Una expresión moderada de LPP3 se observó en la médula anterior del cerebelo postnatal temprano, la cual se extendió a la médula entera para el día P4. En esta última etapa (Fig. 8D), las células que expresan a LPP3 se acomodan a lo largo de toda la PCL y las células LPP3-positivas de la médula desaparecen gradualmente conforme avanza el desarrollo. En el día P10, la expresión de

LPP3 es casi idéntica a la del adulto excepto por la presencia de procesos radiales positivos a LPP3 que cruzan la EGL (Fig. 8E-F). El restringido y dinámico patrón de expresión de LPP3 que describimos en el cerebelo adulto y en desarrollo sugirió potenciales funciones de esta proteína en la fisiología y desarrollo del cerebelo por lo que el siguiente paso en la investigación fue inactivar la función de LPP3 en el SN.

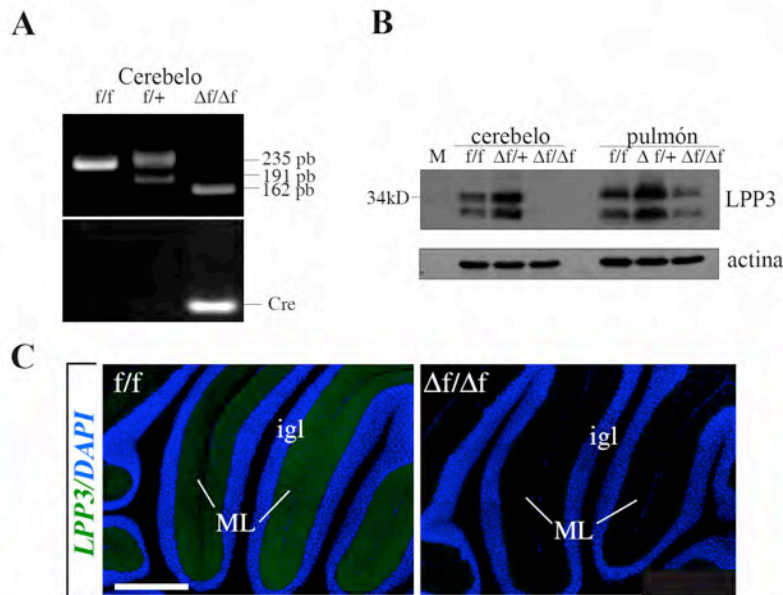


Figura 9. Escisión específica de *Ppap2b* en el sistema nervioso. A) Los fragmentos obtenidos mediante PCR a partir de DNA genómico de ratones de la cruz del alelo *f/f* con transgénicos *NesCre*;*f/f*, presentan los tamaños esperados en el caso del genotipo *f/f* (solo 235pb), *f/+* (235 y 191pb) y *Δf/Δf* [162pb, Fig. 6, (Escalante-Alcalde et al., 2007)]. Nótese que la amplificación del fragmento del transgen *Cre* se presenta solo en los ratones *Δf/Δf*. B) Análisis de Western Blot que detecta a LPP3 solo en extractos de proteína del cerebelo de los ratones *f/f* y *f/+*, y no en *Δf/Δf*. En el pulmón del mismo ratón *Δf/Δf* si se detectó LPP3. C) Por inmunofluorescencia se detecta a LPP3 (verde) en la capa molecular del cerebelo del ratón *f/f* mientras que en el *Δf/Δf* la señal es prácticamente nula. ML; capa molecular, igl, capa granular interna. Barra de escala; 500 μ m.

4.3 Inactivación específica de LPP3/*Ppap2b* en el sistema nervioso

Debido a que la inactivación generalizada de LPP3 en ratón conduce a la muerte en el embrión (E9), establecimos estrategias que nos permitieran obtener datos sobre la función de LPP3 en el SN adulto y en desarrollo. Ratones que portan el alelo condicional *Ppap2b*^{flox} [f, (Escalante-Alcalde et al., 2007)], y el transgénico *Nestina::Cre* (Tronche et al., 1999), se utilizaron para escindir exones que codifican para dominios del sitio catalítico de LPP3 en progenitores neuro-gliales a partir del día E11 (periodo en el que el ratón transgénico comienza a expresar robustamente a la recombinasa Cre). La aplicación de esta estrategia genética, produjo ratones viables y fértiles, lo que indicó que LPP3 no

es esencial para el desarrollo general del SN después del día E11. La alta eficiencia de escisión del locus *Ppap2b* en el cerebelo adulto de los animales con genotipo *Nestina::Cre;Ppap2b^{flox/flox}* (desde aquí referidos como CKO en el texto y *Ppap2b^{NAflox/NAflox}* ó simplemente $\Delta f/\Delta f$ en las figuras), se corroboró por PCR a partir de DNA genómico, ensayos de Western blot e inmunofluorescencias (Fig. 9).

4.4 La ausencia de LPP3 en adulto y durante el desarrollo, incrementa el nivel de S1P y regula negativamente S1P₁ en el cerebelo.

Se ha reportado que la inactividad de LPP3 conduce a un incremento en el nivel de LPs en modelos *in vitro* (Escalante-Alcalde et al., 2003). Para probar si la ausencia de LPP3 tiene repercusiones sobre el nivel de lípidos *in vivo*, por medio de espectrometría de masas evaluamos la concentración de LPs sustratos y no sustratos de LPP3 en el cerebelo de los ratones CKO. Se encontró que los niveles de LPA y PA presentan una tendencia al incremento que sin embargo, no resultó ser significativa. En cambio, los niveles de S1P presentan un aumento significativo en el CKO en comparación con su contraparte control (Fig. 10A). No se observaron cambios en la concentración de la lisofosfatidil-colina (LPC), la cual no es un sustrato de LPP3. Estos resultados indicaron que LPP3 es una fosfatasa de S1P en el cerebelo de ratón y que es requerida para el mantenimiento de los niveles apropiados de este lípido *in vivo*.

La S1P puede ser sintetizada por astrocitos y GC del cerebelo (Anelli et al., 2005), promueve la proliferación de astrocitos de cerebelo en cultivo (Bassi et al., 2006) y produce señales mediadas por Ca^{2+} en astrocitos y GC (Giussani et al., 2007). Sin embargo la función de la S1P ha sido poco estudiada en el cerebelo *in vivo*. Solo se sabe que de todo el cerebro, en el cerebelo se encuentra la mayor actividad de la SphK (Blondeau et al., 2007), y que Sphk1 se distribuye en líneas parasagitales de las PC (Terada et al., 2004), por lo que se infieren importantes funciones de la S1P en esta región. Utilizando genes reporteros, se describió que la expresión del receptor S1P₁ es muy alta en cerebelo (Chae et al., 2004), pero no existe información sobre la expresión y distribución de la proteína endógena. Utilizando un anticuerpo específico contra S1P₁ aquí describimos que en animales silvestres, S1P₁ se encuentra principalmente en la ML, con un patrón similar al descrito para LPP3 y que de hecho co-localiza parcialmente con

Glast (Fig. 10B), lo que indica que este receptor se expresa en la membrana de la BG. Debido al origen de los anticuerpos no probamos la co-inmunodetección con LPP3. Inesperadamente, cuando analizamos la expresión de S1P₁ en los cerebelos CKO, observamos una pronunciada reducción en la cantidad de este receptor en la ML del adulto así como durante el desarrollo postnatal del cerebelo (Fig 10B-C). La disminución del receptor se confirmó por medio de ensayos tipo Western Blot a partir de extractos totales de proteína de cerebelos control y CKO (Fig. 10D). Se ha descrito que una vía de regulación negativa de la expresión de S1P₁ sucede en respuesta a su activación sostenida, internalización y posterior degradación por la vía del proteosoma (Gonzalez-Cabrera et al., 2007), y dado que la cantidad del mRNA de S1P₁ en el cerebelo no parece sufrir cambios, sugiere que la reducción en la expresión de este receptor ocurre por degradación. En conjunto, estos resultados sugieren que en los cerebelos carentes de LPP3 existe una regulación negativa del receptor S1P₁.

Generalmente las vías de degradación de este tipo de receptores se relacionan a la extinción de su señalización intracelular sin embargo, también se ha reportado la activación de vías como la de las MAPK (Daaka et al., 1998). Dada la abrupta reducción en la cantidad de S1P₁, exploramos si en el cerebelo del ratón CKO, podían presentarse cambios generalizados en la activación de algunas moléculas río abajo en la cascada de señalización del S1P₁. Mediante ensayos de WB observamos una disminución en la activación de AKT, mientras que observamos una activación de ERK1/2 en los extractos de cerebelos CKO cuando se compararon con los grupos control. No observamos diferencias consistentes en la activación de PKC (Fig. 10E). Es necesaria más experimentación sobre células de BG aisladas, para poder diseccionar las cascadas de señalización afectadas por la ausencia de LPP3 en este tipo celular. Aunque no es posible aún relacionar las modificaciones observadas en la actividad de las proteínas cinasa analizadas a las alteraciones en la señalización de S1P, nuestros resultados claramente demuestran que LPP3 participa en la regulación del metabolismo de S1P y que por regular negativamente a S1P₁ afecta las vías de señalización que éste regula en el cerebelo *in vivo*.

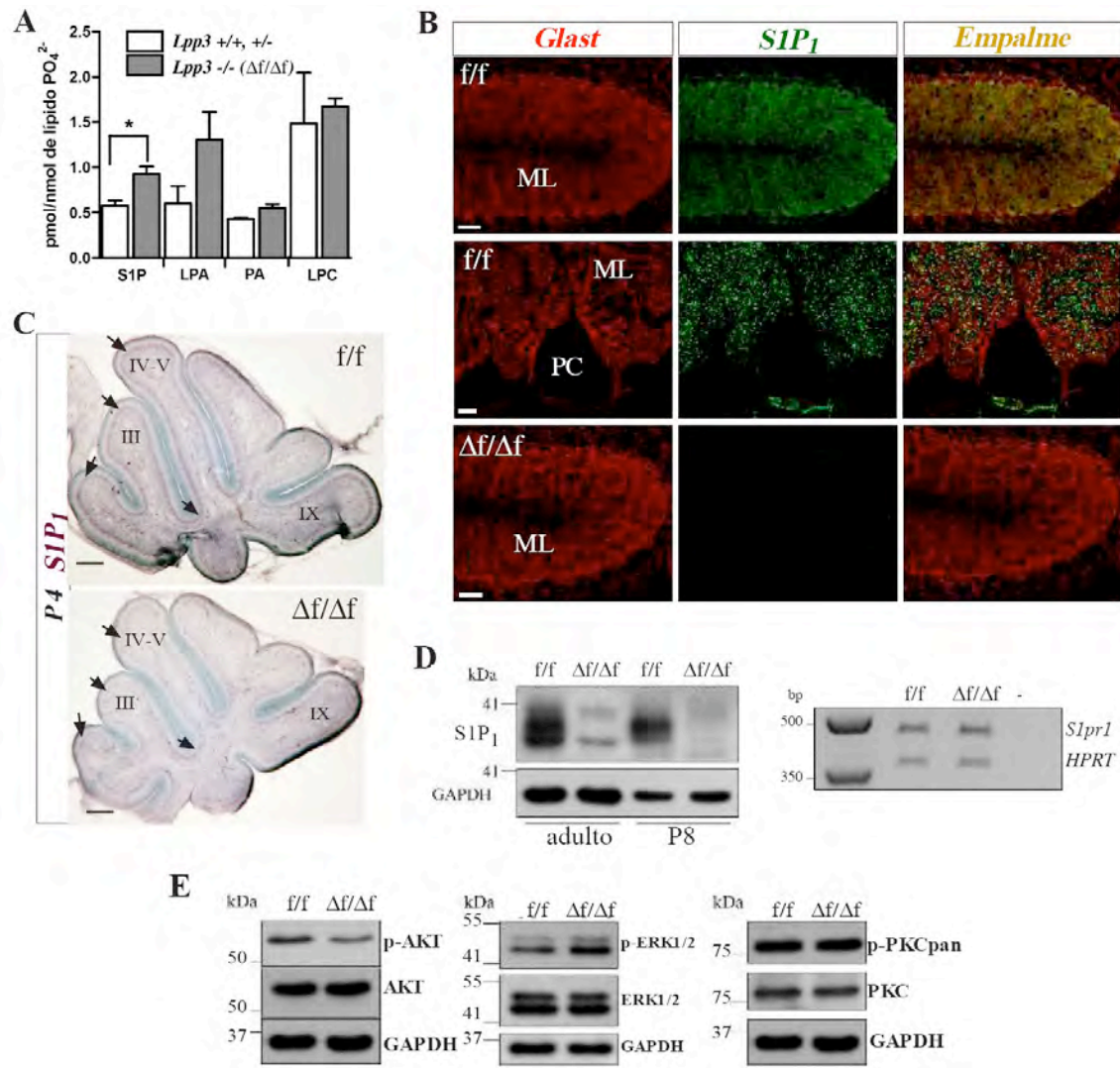


Figura 10. La carencia de LPP3 en cerebelo eleva los niveles S1P, regula negativamente a SIP_1 , y modifica la activación de moléculas blanco de su señalización. A) El análisis de espectrometría de masas indica una elevación significativa en el nivel S1P en el cerebelo de ratones CKO respecto al control, mientras que los niveles LPA, PA y LPC no presentan cambios. B) Cortes sagitales del cerebelo muestran la inmunodetección de SIP_1 y Glast en ratones adultos silvestres (arriba y en medio) y CKO (abajo). C) Por inmunohistoquímica se muestra la distribución de S1P₁ durante el desarrollo del cerebelo (P4) de ratones control y CKO. Nótese la débil señal en los ratones CKO respecto al control (flechas). D) Por Western blot se muestra una disminución de SIP_1 en el cerebelo de ratones CKO comparados con control, en adulto y en P8, mientras que la cantidad de su mRNA (*Sipr1*, derecha) no cambia. E) WB de las proteínas cinasas indicadas que se relacionan a la señalización mediada por S1P₁. Los datos representan la media \pm SEM. *($p < 0.05$). Los números romanos indican la identidad de las folias. Barra de escala; B) arriba y abajo 50 μ m, en medio 5 μ m; C), 200 μ m.

4.5 La inactivación de LPP3 produce defectos en la coordinación motora

El cerebelo es la estructura que regula el aprendizaje motor y la coordinación de los movimientos finos. Debido a que la mayor expresión de LPP3 se encuentra en el cerebelo adulto y en desarrollo, y que su inactivación afecta el nivel de S1P, realizamos pruebas

neurológicas a nuestros animales CKO y controles para evaluar posibles disfunciones motoras ocasionadas por la inactividad de LPP3. En la prueba del Rota-rod, que evalúa defectos severos en la ejecución motora, los ratones CKO de un mes mostraron periodos de mantenimiento significativamente mas cortos que los silvestres (Fig. 11A). En la prueba de la barra fija, la cual evalúa defectos finos de coordinación motora especialmente de las extremidades traseras, la ejecución se vió afectada en el 100% de los ratones CKO pues, aunque pueden permanecer y moverse sobre la barra, arrastran las extremidades sobre la barra y presentan dificultades para alternar sus extremidades durante la marcha (Fig. 11B). Estos comportamientos fueron similares en ratones de 1 año, indicando que la disfunción motora no es progresiva al menos hasta esta etapa. Además, los ratones CKO no presentaron diferencias en pruebas de nado o en huellas de locomoción en un sustrato regular lo que descartó problemas de equilibrio o de tonicidad muscular. Todo lo anterior indica que LPP3 regula aspectos de la coordinación motora que podrían relacionarse a alteraciones en la función del cerebelo.



Figura 11. Los ratones CKO de LPP3 presentan defectos en la coordinación motora. A) Tiempo de mantenimiento de los ratones CKO y controles en la prueba de Rota-rod. Los datos son la media \pm SEM, *($p < 0.05$). **B)** patrón de locomoción de ratones en la barra fija (5 mm de diámetro). Nótese que el ratón CKO no alterna extremidades traseras o delanteras como lo hace el silvestre.

4.6 La deficiencia de LPP3 en el sistema nervioso produce defectos en la foliación del cerebelo y daños en la citoarquitectura de la BG madura e inmadura

Como se aprecia en la figura 10, el análisis histológico de cortes sagitales a nivel del vermis de los ratones CKO reveló que el 100% de ellos presenta: i) hipoplasia de la folia III; ii) fisura precentral menos pronunciada; iii) fisura VI/VII reducida o ausente y; v) folia IX subdesarrollada con ausencia del surco uvular. El 65% de los ratones presentaron reducción de la folia IV-V (culmen). Además en el área mas rostral a nivel del vermis, en

todos los ratones mutantes se observó una acumulación anormal de células en el lado dorsal de la capa molecular, cerca de la unión con el *velum medullaris* (recuadro Fig. 12E). La identidad de las células ectópicas y el origen de este surco semejante al surco lingular se analizan mas adelante.

Debido a que LPP3 se expresa en la BG del adulto en estrecha interacción con el árbol dendrítico de la PC, investigamos si su deficiencia alteraba a las PC, a las interneuronas o a la misma BG en cuanto a su densidad y morfología. Como se aprecia en la figura 12 (B, F, I), la morfología y densidad de las PC no se afectó visiblemente, aunque algunas veces se presentó una ligera desorganización de los somas de la PC (Fig. 12 B, F). El número y distribución de las interneuronas en la ML tampoco se encontró alterada en los cerebelos CKO respecto a sus hermanos control. En contraste, la cantidad, distribución y morfología de la BG presentaron alteraciones considerables en los animales CKO (Fig. 12 C-D, G-I). Mientras que en el cerebelo control los procesos radiales de la BG presentaron la típica distribución en palizada, con sus pies terminales localizados en la superficie pial y sus somas en la PCL, los procesos radiales del CKO son gruesos y desorganizados, en tanto que muchos de ellos no alcanzan la superficie pial. Además sus somas se encontraron menos organizados dentro de la PCL y frecuentemente se encontraron anormalmente localizados en la ML. Los somas de la BG en la PCL del ratón mutante fueron un 41.6% menos abundantes que en su contraparte control y el 11% del total de la BG se encontró en la capa molecular. Estas anomalías se encontraron en todo el cerebelo indistintamente de la folia observada. El análisis por microscopía confocal mostró un aparente incremento en la inmunoreactividad de GFAP por lo que realizamos una evaluación de la cantidad de esta proteína y otros marcadores de la BG (BLBP y Glast) por Western blot. Resultó interesante encontrar que BLBP y GFAP presentaron un incremento de 2 y 1.5 veces, respectivamente, en comparación con los controles, en tanto que Glast no presentó diferencias (Fig. 12J). Aunque el significado biológico de este resultado aún espera por ser estudiado, es notorio que la ausencia de LPP3 en el cerebelo cause un incremento en GFAP, evento que es característico de la gliosis reactiva e indica un daño neurológico.

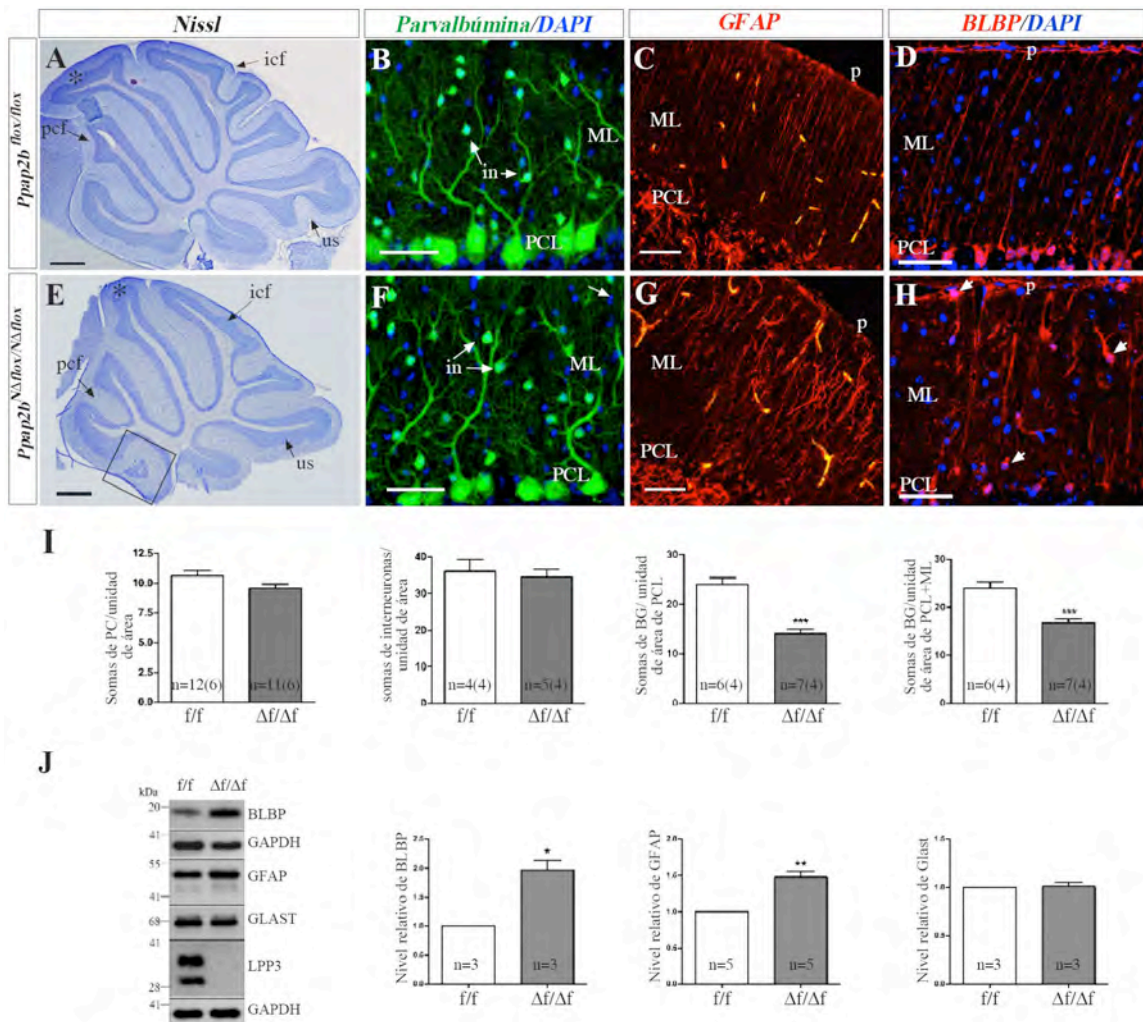


Figura 12. Defectos en foliación y citoarquitectura de la BG en cerebelos carentes de LPP3. Análisis histológicos (A, E) e inmunofluorescencias (B-D, F-H) en cortes sagitales del vermis del cerebelo. Las PC e interneuronas (B, F) se identifican por su inmunoreactividad a parvalbúmina y los procesos radiales y somas de la BG por inmunoreactividad a GFAP y BLBP, respectivamente (C, G; D, H). I) Análisis cuantitativo de los tipos celulares señalados. n=# cortes, (#animales). J) Western blot y análisis densitométrico de la inmunodetección de BLBP, Glast y GFAP. Los asteriscos en A y E indican las folias IV-V; icf, fisura intercrural; pcf, fisura precentral; us, surco uvular; PCL, capa de células de Purkinje; ML, capa molecular; in, interneuronas. El rectángulo en E señala el surco tipo lingular que presentan solo los CKO. Señal no específica en C y G aparece en amarillo. Las puntas de flecha en H indican somas ectópicas de la BG en la ML. Los datos representan la media \pm SEM. t de Student * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001). Barras de escala A, E: 0.5 mm; B-D, F-H, 50 μ m.

La BG es el único tipo celular que presenta importantes anomalías por la ausencia de LPP3 en el cerebro adulto, lo que podría afectar la fisiología general del cerebelo. Adicionalmente la BG cumple con importantes funciones durante el desarrollo postnatal temprano del cerebelo, periodo durante el cual ya expresa a LPP3 (Fig. 8), por lo que su afección temprana en respuesta a la ausencia de esta fosfatasa, podría conducir a defectos en el desarrollo del cerebelo. Así, el siguiente paso en la investigación fue conocer que

tan tempranamente en el desarrollo del cerebelo se ve afectada la BG en los CKO. Se observó un desarreglo de los somas de la BG en la PCL en etapas tan tempranas como P4, mientras que somas ectópicas de la BG dentro de la ML fueron evidentes en P10-15 (Fig. 13 A-D). En esta última etapa, además del desarreglo de los somas de la BG, sus procesos radiales ya eran mas gruesos, tortuosos y frecuentemente sin alcanzar la superficie pial. En ambas etapas se observó una reducción en el número de somas positivos a BLBP en la PCL, lo que sugirió que la disminución en el número de células de Bergmann ocurre desde etapas tempranas del desarrollo postnatal. Estos resultados sugieren fuertemente afecciones del desarrollo del cerebelo relacionados a la actividad de la BG.

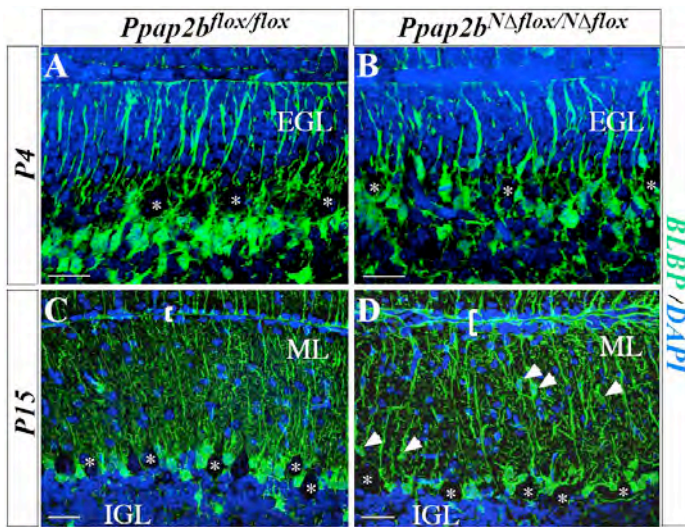


Figura 13. Los cerebelos deficientes de LPP3 presentan defectos en el arreglo de la BG durante el desarrollo. Inmunodetección por fluorescencia de BLBP en cortes sagitales de cerebelos silvestres y CKO en P4 o P15 a nivel del vermis. Los corchetes en C-D indican el grosor de la EGC detectada por los núcleos en azul. Las puntas de flecha indican somas ectópicas de la BG y los asteriscos los somas de las células de Purkinje. EGL; capa granular externa, IGL; capa granular interna, ML: capa molecular. Barra de escala: 30μm.

4.7 El origen del surco tipo língular se asocia a células gliales que expresan LPP3

Como se mencionó con anterioridad, los ratones CKO presentan una acumulación anormal de células en el lado dorsal de la ML, en la zona anterior a nivel del vermis (Fig. 12E y 14A). La composición celular de este cúmulo de células ectópicas resultó ser heterogéneo incluyendo a interneuronas, PC, células granulares en proliferación y postmitóticas además de astrocitos, incluyendo a la BG (Fig. 14B-D). Para indagar sobre el origen de esta anomalía parecida a un surco, analizamos etapas clave del desarrollo de esta región del cerebelo. Durante el desarrollo perinatal (E17), el cerebelo medio se

encuentra delimitado en la parte anterior por la extensión de la EGL que termina cerca del istmo, frontera entre el cerebro medio-posterior (MHB). Durante los siguientes días, una estructura derivada del istmo se desarrolla y forma una placa de células desprovista de neuronas, el *velum medullaris*. Esta estructura une al vermis anterior con el colículo inferior en la etapa perinatal. Basados en esta información, se analizaron cortes de la región del vermis para observar la extensión de la migración rostral de las EGC, la localización de las PC y la estructura del *velum medullaris*. Como se aprecia en la figura 14F-G, en el cerebelo de los CKO en P0, la EGC se extiende rostralmente hasta el *velum medullaris* y presenta una curvatura que genera un espacio en su parte dorsal, lo cual no se observa en los cerebelos silvestres. Así mismo, la morfología de la glía radial inmunoreactiva a BLBP, incluyendo a la BG, se encuentra afectada. Los procesos radiales en el área del *velum* se encuentran desorganizados lo que conduce a una aparente ruptura de la *glia limitans*. Para el día P1, la curvatura de la EGL es aún más pronunciada, doblándose hacia la región más anterior de esta capa. Llama la atención la presencia de un cúmulo de células inmuno-positivas a calbindina, presumiblemente PCs, en el lado dorsal de esta estructura tipo surco (Fig. 14H-I). No se encontraron indicios de una elevación en la tasa de proliferación de las EGC en esta área (Fig. 15). Cabe señalar que las áreas donde estas anomalías ocurren, coinciden con los dominios de expresión de LPP3 en esta etapa (Fig. 8). Estos datos sugieren la participación de esta enzima en algunos aspectos del desarrollo del vermis del cerebelo a través de su expresión no solo en la BG, sino en una población de glía radial en la región más anterior del primordio del cerebelo y la región posterior del *velum medullaris*, las cuales podrían desempeñar funciones en el control de la elongación de esta estructura y en una adecuada formación de la *glia limitans* de esta área.

4.8 La deficiencia de LPP3 en el cerebelo produce defectos de proliferación celular y un retraso en la migración de las células granulares

Las células granulares externas (EGC) utilizan a los procesos de la BG como andamios para alcanzar la capa granular interna (IGL) a partir de P2 en el ratón. Debido a que la BG muestra defectos morfológicos y en abundancia desde estadios tempranos del desarrollo del cerebelo, analizamos la posibilidad de que las EGC sufrieran alteraciones

en su desarrollo o migración, asociadas a este fenotipo. Encontramos que en los cerebelos CKO, entre P10-15, la EGL es más gruesa que en los cerebelos silvestres (Fig. 13C-D, 15 B-D), aunque en los animales adultos no se encontraron signos de una EGL remanente (Fig. 12). Esta observación sugirió un retraso en la migración de las EGC en el CKO. Para probar si este fenotipo es el resultado de un retraso en la salida de las células desde la EGL, analizamos la cantidad y distribución de células positivas a los marcadores PCNA (marcador de células en proliferación) y p27 (indicador de células postmitóticas) en cerebelos del día P15. En las regiones donde existen pocas células inmuno-reactivas a PCNA en las fisuras del cerebelo control, las áreas correspondientes del CKO presentaron una gran cantidad de células positivas a PCNA (Fig. 15 A-B). Además, en otras áreas en donde las EGC control se encontraban aún en proliferación (como las folias VI-VII y X), el grosor de la EGL inmuno-reactiva a PCNA, fue mayor en los CKO. Un patrón semejante se observó en cuanto a la distribución de las células granulares postmitóticas (p27-positivas) en la EGL. Una evidencia que sugiere fuertemente un retraso en la migración de las EGC en el cerebelo CKO, es la reducida cantidad de células post-mitóticas fusiformes (puntas de flecha Fig. 15C-D) encontradas en la ML de éste en comparación con el cerebelo control (Fig. 15 C-D). Esto último fue apoyado por experimentos de marcado con BrdU y posterior seguimiento de las células marcadas (datos no mostrados).

Un retraso en la migración de las células granulares, como el descrito, no podría *per se* ser responsable de los fenotipos de hipoplasia y foliación encontrados en los CKO, en tanto que una disminución en la densidad celular podría tener importantes repercusiones. Esto sugirió alteraciones adicionales en proliferación y/o muerte durante el desarrollo del cerebelo CKO. Para probar esta hipótesis, realizamos un análisis curso-temporal de la proliferación (evaluando la presencia de fosfo-histona H3, Hirata et al., 2004) y de la muerte celular (analizado por detección de muerte celular por ensayo “TUNEL”) en cerebelos de animales CKO entre P0-P15. En efecto, observamos una reducción en la cantidad de células mitóticas y un incremento en las células TUNEL-positivas en los cerebelos CKO dependiendo de la región y etapa del desarrollo (Fig. 15). En P0-1 la cantidad de células en proliferación en la EGL, no resultó alterada mientras que se observó una reducción del 18% en las células mitóticas en la PCL de los CKO. Ya en P4

(cerca del pico de proliferación de la BG en ratón), se observó una reducción significativa en la cantidad células mitóticas de la EGL (33%, principalmente en el lóbulo anterior) y en la PCL (28%, principalmente en las folias IV-VIII). Entre P0-P4, las únicas células que proliferan en la PCL corresponden a la BG, lo que indica que este tipo celular es el afectado por la ausencia de LPP3 en la PCL del cerebelo CKO. En P7-8, no se encontraron diferencias en la proliferación de células de la PCL (etapa en la que la BG ha cesado de proliferar), pero se observó una reducción del 17% en la proliferación de la EGL, principalmente en las folias III y X. Finalmente, un incremento considerable en las células TUNEL positivas se detectó en la EGL (2.6 veces respecto al control) y en la ML del cerebelo CKO en P15. Lo anterior coincide con el retraso en la migración granular observado en esta etapa y sugiere que las GC diferenciadas ectópicamente y que no alcanzan la IGL, mueren.

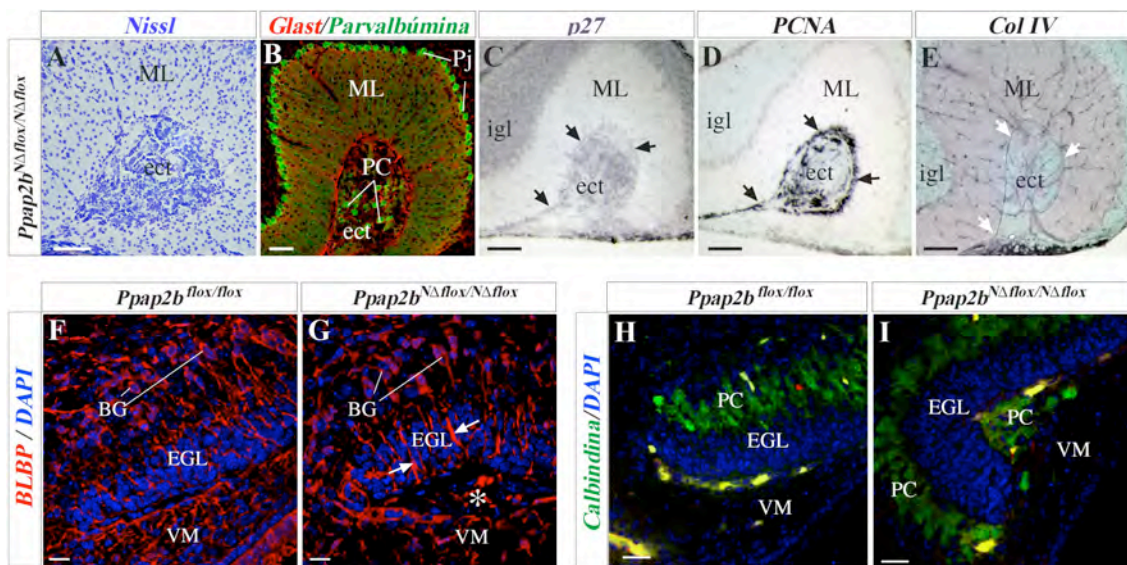


Figura 14. Identidad y origen de las células ectópicas en el surco tipo lingular del ratón mutante para LPP3. Cortes sagitales de la región más anterior a nivel del vermis del cerebelo adulto (A, B) en P15 (C-E), en P0 (F-G) y P1 (H-I). Células ectópicas (ect), positivas a los marcadores parvalbúmina, Glast, p27 y PCNA identificadas como PC/interneuronas, BG, neuronas postmitóticas y en proliferación respectivamente. El patrón de detección de PCNA y p27 en la EGL residual (flechas negras) sugiere que las células ectópicas positivas a esos marcadores son GC en proliferación y postmitóticas. La integridad de la lámina basal, en la superficie pial se corroboró por la detección de colágena IV (E, flechas blancas). F-G) En P0, la detección de BLBP evidencia el engrosamiento de los procesos radiales de la BG (flechas), la formación defectuosa de la glia limitans (*) en la parte posterior del *velum medullaris* en desarrollo, además de una curvatura anormal de la EGL en el CKO. H-I) En P1, la EGL muestra una curvatura mas pronunciada y una invasión de células positivas a calbindina, presuntamente PC. EGL, capa granular externa; i gl, capa granular interna; PC, células de Purkinje; VM, *velum medullaris*. Señal no específica en H, I aparece en amarillo. Barras de escala; A-E: 100µm, F-I: 20µm.

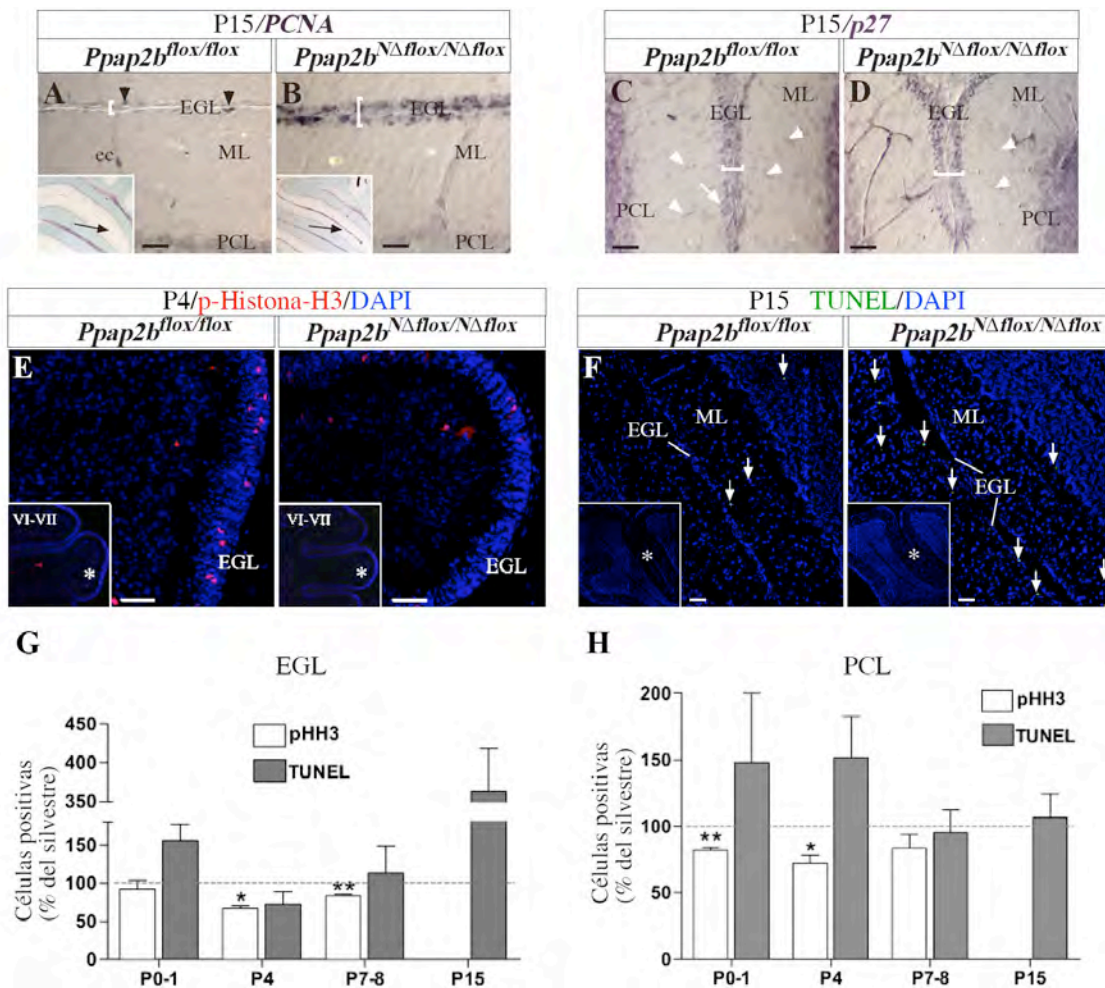


Figura 15. Los ratones CKO presentan retraso en la migración granular y en la tasa de proliferación y muerte durante el desarrollo del cerebelo. Inmunodetección por actividad de peroxidasa (A-D) o por fluorescencia (E), de los marcadores de proliferación (PCNA, fosfo-histona H3) y de neuronas postmitóticas (p27) en cortes sagitales de cerebelos silvestres y CKO a nivel del vermis en P4 y P15. A-B) Imágenes del fondo de la fisura primaria en el área indicada por flechas (recuadro). C-D) Imágenes de la fisura intercrural. E) Imágenes de la folia IV-V (asteriscos en los recuadros). F) En la fisura secundaria (asteriscos en los recuadros) se señalan con flechas a las células positivas al ensayo de muerte celular (TUNEL). G-H) Análisis cuantitativo de células positivas a pHH3 y a TUNEL durante diferentes estadios del desarrollo (P0-P15) en la EGL (G) y la PCL (H). Las cantidades están expresadas respecto a la cantidad encontrada en los controles (100%, línea punteada). n= 3 (animales/genotipo/edad) excepto para P15 (n=2). Los valores representan la media \pm SEM. *(P<0.05), **(P<0.01), prueba t Student. En A-D; los corchetes indican el grosor de la EGC, las puntas de flecha negra, células positivas a PCNA; puntas de flecha blanca, GC positivas a p27 en migración. ec: células endoteliales, EGL: capa granular externa, ML: capa molecular, PCL: capa de células de Purkinje, Barra de escala, A-D = 30 μ m, E-F = 50 μ m.

4.9 El tratamiento *in vitro* e *in vivo* con un antagonista funcional de S1P₁, fenocopia parcialmente alteraciones del desarrollo del cerebelo.

De los mensajeros que codifican para los receptores de LPA y S1P expresados en el cerebelo adulto, S1P₁ es el más abundante y de hecho se encuentra en la PCL de todo el cerebelo (*Edg1/S1pr1*, Fig. 16), lo que sugiere una importante contribución de este receptor en la señalización de LPs en el cerebelo. Además, en el presente trabajo describimos que S1P₁ es expresado primordialmente en dominios de la membrana de la BG y que la inactivación de LPP3 incrementa la concentración de S1P y regula negativamente a S1P₁ (Fig. 10). Esos datos sugieren que una activación sostenida del S1P₁ provoca la internalización y degradación de su receptor en los animales CKO. Para determinar si fenómenos asociados a la señalización de S1P/S1P₁ contribuyen a los fenotipos encontrados en la BG, se realizaron ensayos farmacológicos con un modulador de los receptores de S1P, el FTY720. El FTY720 es fosforilado por la SphK para formar el compuesto activo FTY720-P el cual activa con gran eficiencia a S1P₁, y provoca su internalización y posterior degradación, por lo que es considerado como un antagonista funcional de S1P₁ (Brinkmann, 2009; Nixon, 2009). Por su naturaleza lipofílica el FTY720, puede cruzar la barrera hematoencefálica (Foster et al., 2007) y se ha sugerido que puede tener como blanco de acción a los astrocitos (Miron et al., 2008). Aprovechando las propiedades y forma de acción de este fármaco, cultivos organotípicos de rebanadas de cerebelo de ratones silvestres de P7, fueron tratados por 48 horas con FTY720 (100 nM) para después evaluar la morfología de la BG a través de inmunofluorescencias contra BLBP. Como se muestra en la figura 17, el tratamiento con FTY720 produjo alteraciones en la morfología de la BG, lo que incluyó el engrosamiento de los procesos radiales y una reducción en la complejidad de sus procesos laterales. Aunque la morfología de la BG en respuesta al FTY720 no presentó cambios tan importantes como los observados en los cultivos organotípicos del cerebelo del CKO (Fig. 17B), se hizo evidente la implicación de la señalización de S1P₁ sobre la morfología de la BG.

La morfología de la BG madura se obtiene después de un proceso de remodelación durante el desarrollo del cerebelo, principalmente en la etapa postnatal. Esta transformación ha sido comparada con un proceso de metamorfosis (Das, 1976) en el que las interacciones con diferentes tipos neuronales influyen principalmente en la morfología

de sus procesos (Lippman et al., 2008). Para obtener un efecto crónico del FTY720, que además asemejara mejor las condiciones de la ausencia de LPP3 (la acumulación de S1P debido a su pobre degradación), ratones de P3-P14 fueron tratados diariamente con una dosis terapéutica de FTY720 (encefalomielitis; Foster et al., 2009), para posteriormente evaluar la morfología de la BG, la expresión de S1P₁ y la proliferación de la células granulares externas. En los animales tratados con FTY720 (n=4), los procesos de la BG resultaron ser más gruesos que en los animales control. Además, se observó un arreglo anormal de sus somas especialmente en ciertas regiones. Por ejemplo en la folia X, la cual es una de las folias más tardías en desarrollarse, los somas de la BG no presentaron un alineamiento homogéneo dentro de la PCL, llegando a presentar somas ectópicos en la ML. Aunque en otras folias los somas ectópicos fueron menos frecuentes, en los animales control no se presentaron somas en la misma frecuencia que en los tratados con FTY720 (n=3, Fig. 17E-F). Aunque de una manera modesta, en comparación con los efectos observados en el CKO, el FTY720 fenocopia algunos de los cambios morfológicos que sufre la BG carente de LPP3, la cual además cursa con una regulación negativa del receptor S1P₁. Para evaluar si al igual que en el CKO, el tratamiento con FTY720 produjo una reducción en la expresión de S1P₁, se realizó la inmunodetección de este receptor en cortes de los cerebelos tratados y no tratados. El análisis de microscopía confocal, mostró un decremento en la expresión de S1P₁ en los animales tratados con FTY720, especialmente en las regiones que mostraron las mayores alteraciones en la morfología de la BG (Fig. 17 E-H). Este dato se corroboró por ensayos de Western blot (datos no mostrados). Finalmente, la EGL de la fisura intercrural con células positivas a PCNA, presentó un incremento (27%, Fig. 17I-J) respecto al control tal y como sucede en los CKO (Fig. 15A-B). Todos estos resultados sugieren fuertemente que alteraciones en el metabolismo y señalización de S1P, resultantes de la falta de actividad de LPP3 en la BG, contribuye a las anormalidades encontradas durante el desarrollo del CKO.

A

Gene	Expression level	Structure
Ppap2a/Lpp1	-	
Ppap2b/Lpp3	++, +/-	PCL, DCN
Ppap2c/Lpp2	-	
Sgpp1	-	
Sgpp2	+, +/-	PCL, DCN
Sgpl	+/-	PCL
Edg1/S1p1	++	PCL
Edg2/Lpa1	+/-	PCL WM
Edg3/S1p3	+/- weak	PCL, DCN, GL
Edg4/Lpa2	+/-	PCL, DCN, GL
Edg5/S1p2	+/-	PCL, DCN
Edg6/S1p4	-	
Edg7/Lpa3	+/- weak	PCL, DCN
Edg8/S1P5	+/-	PCL, DCN, GL, WM
Sphk1	+, stripes	PCL, ML, (Terada et al., 2004)
Sphk2	+, +/-	PCL, GL, DCN
Pld1	-	
Pld2	+/-	PCL, DCN
Pld3	+/-	PCL, DCN
Pld4	-	
Pld5	+/- weak	GL
Enpp2/Atx	+/-	GL, WM
Dagka	+/- weak	PCL, DCN
Dagkb	+/-	PCL, DCN
Dagkg	+	PCL
Dagke	+/- weak	PCL, DCN
Dagkq	+/- weak	PCL, DCN, GL
Cerk	++, +/-	PCL, DCN

B

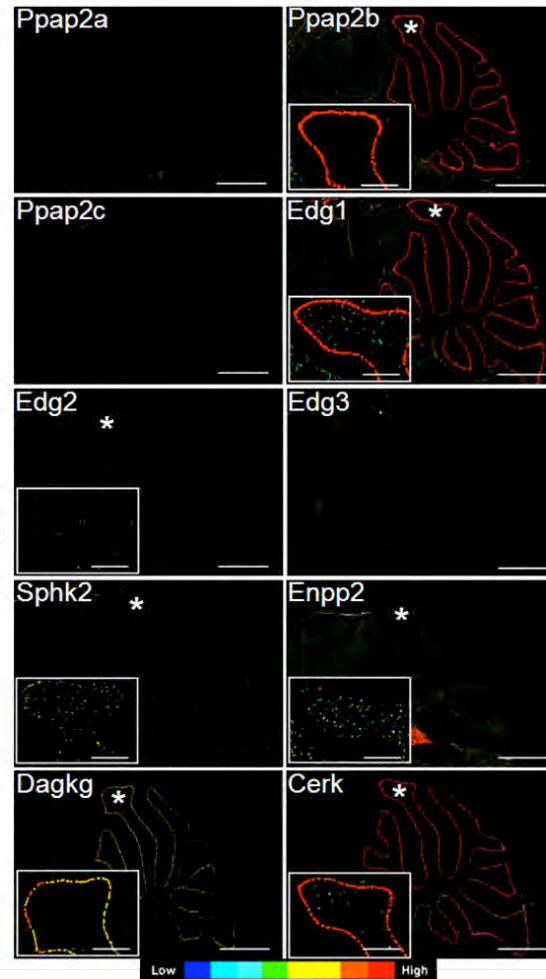


Figura 16. Nivel relativo de expresión de genes relacionados al metabolismo/señalización de lípidos sustrato de LPP3 en el cerebelo de ratón. A) El nivel de expresión (++: muy abundante, + : abundante, +/- : regular y -: escaso o nulo) y distribución de los genes listados, se obtuvo de las hibridaciones *in situ* disponibles en la base de datos de imágenes del Allen Brain Atlas. PCL, capa de células de Purkinje; DCN, núcleos profundos del cerebelo; GL, capa granular; WM, materia blanca. **B)** imágenes representativas de algunos genes seleccionados de (A), mostrando el nivel de expresión por código de colores (abajo). Los recuadros muestran las áreas marcadas con un asterisco. Allen Mouse Brain Atlas [Internet]. Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science. ©2009. Disponible en: <http://mouse.brain-map.org>

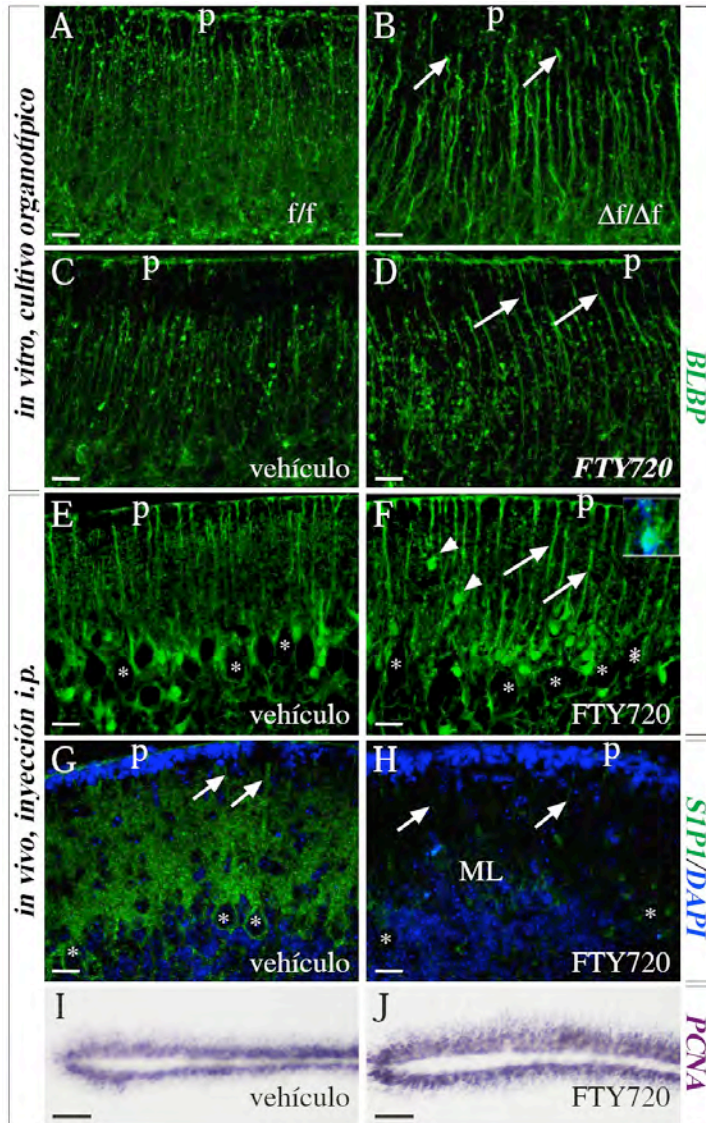


Figura 17. El tratamiento con FTY720 mimetiza parcialmente las alteraciones del cerebelo CKO. Inmunodetección de BLBP en cultivos organotípicos de cerebelo silvestre y CKO (A-B), silvestre tratado con vehículo (C) o con FTY720 100 nM (D). Nótese que la morfología de la BG es similar a la encontrada en el tejido no cultivado de ratones CKO (Fig. 12C-H), incluyendo pies terminales que no alcanzan la superficie pial (B, flechas), engrosamiento de los procesos radiales y menor elaboración de procesos secundarios (D, flechas). Dichas características no se presentan en el cultivo de ratón silvestre o tratado solo con vehículo. Inmunodetección de BLBP (E-F), SIP₁ (G-H) y PCNA (I-J), en cortes de cerebelo de animales tratados con vehículo (E, G, I) o con FTY720 (F, H, J). Nótese los procesos engrosados de la BG (F, flechas) y los somas ectópicos de la BG en la ML (F, puntas de flecha). Recuadro; soma ectópico de la BG con núcleo. G-H) el tratamiento con FTY720 causa una clara disminución en la señal de SIP₁. Flechas: procesos radiales positivos a SIP₁ en la ML. I-J) Grosor de la EGL immuno-reactiva a PCNA en el surco intercrural, de animales control y tratados con FTY720. Los asteriscos indican somas de las células de Purkinje; ML, capa molecular; p, superficie pial; Barra de escala: A-H, 20 μ m; I-J, 40 μ m.

5 DISCUSIÓN

5.1 LPP3 es un marcador específico de la BG en cerebelo, con posibles funciones en la interacción glía neurona.

Aunque recientemente se ha descrito que una proteína relacionada a las LPPs, la PRG1/LPPR4, desempeña importantes funciones en la regulación de la excitabilidad del hipocampo (Trimbuch et al., 2009), antes del presente trabajo no existía información sobre la función de una LPP auténtica durante el desarrollo o la función del SN.

Los trabajos generados durante la última década han sugerido funciones específicas de la LPP3 durante el desarrollo embrionario del ratón y en la fisiología del SN (Escalante-Alcalde et al., 2009; Suzuki et al., 1999), sin embargo, la descripción específica que realizamos de la presencia de la proteína LPP3 en dominios membranales de la BG, un tipo especializado de astrocito del cerebelo, permitió hacer un mejor acercamiento a las funciones que ésta realiza en dicho sistema. Concordante con nuestros datos de la expresión glial-específica de LPP3 (al menos en cerebelo), en estudios del perfil transcripcional del cerebro de humanos se ha clasificado al gen que codifica a la LPP3 dentro del grupo que incluye a los marcadores clásicos de astrocitos, que a su vez se empalma con el de marcadores neurogénicos (Oldham et al., 2008). La interacción que la BG mantiene con las neuronas del cerebelo es muy estrecha durante el desarrollo así como en el adulto y ha sido considerada como una de las interacciones glía-neurona más importantes. Esto, aunado a la similitud en la distribución de LPP3 y del transportador Glast en la membrana plasmática de la BG, sugiere la participación de la LPP3 en aspectos relacionados a la comunicación neuro-glial. Tal participación de LPP3 puede realizarse a través de la defosforilación de los lípidos bioactivos que son blancos de su actividad y que se encuentran presentes en el medio extracelular, como el LPA y la S1P. Debido a que esos lípidos promueven una variedad de efectos en neuronas y astrocitos, fue necesaria una estrategia para inactivar de manera condicional la función de LPP3 en el linaje neuroglial.

5.2 S1P es un sustrato de LPP3 *in vivo* y la inactivación de LPP3 puede afectar la señalización mediada por S1P₁

De los LPs sustrato de LPP3 evaluados en los ratones CKO, solo el nivel de S1P presentó una elevación significativa en su concentración (aunque LPA y PA presentaron tendencias al incremento), con lo que se comprobó que este lípido es regulado por LPP3 en el cerebelo de ratón *in vivo*. Además, demostramos que la ausencia de LPP3 en el SN produce una regulación negativa de la expresión de S1P₁ en el cerebelo, lo que indica que la señalización mediada por este receptor, debe estar modificada en los CKO. Aunque hacen falta experimentos en células disociadas para establecer un vínculo sólido que una a la señalización de S1P con la activación de ERK o inactivación de AKT observada en el cerebelo total, es interesante que la inactivación de LPP3, expresada solo por la BG, pueda generar cambios detectables a nivel de tejido en estas moléculas de señalización. En este aspecto es importante señalar que la BG es muy abundante en el cerebelo y también hacer notar que el análisis del transcriptoma de la BG mediante el programa “Ingenuity Pathway Analysis”, que evalúa vías de señalización enriquecidas en un tipo celular, mostró que precisamente la vía de S1P se encuentra muy enriquecida en la BG (Koirala y Corfas, 2010).

5.3 Los defectos morfológicos en el cerebelo del ratón CKO son atribuibles a los daños en células gliales.

En este trabajo caracterizamos alteraciones en la morfología del cerebelo, provocadas de la ausencia de LPP3 en el linaje neuroglial; 1) Presencia anormal de un surco tipo lín-gula con neuronas ectópicas en el dominio mas rostral del vermis; 2) hipoplasia de folias y reducción o desaparición de fisuras/surcos y 3) morfología, distribución y densidad anormal de la BG. El origen de estas anomalías se encuentra durante el desarrollo del cerebelo y además puede ser atribuido a los cambios en la morfología y/o densidad de células gliales que expresan LPP3 como se discute enseguida.

Para el caso del surco tipo lín-gular con células ectópicas, el desarrollo anormal del *velum medullaris* puede ser la causa de este fenotipo. Se ha sugerido que esta estructura se forma por la proliferación de las células de la zona ventricular seguida de la retracción del extremo anterior del vermis, produciendo así la de-laminación del *velum* del cerebelo anterior, además de su expansión (Louvi et al., 2003). Basados en el patrón de expresión de LPP3 y en el análisis fenotípico de los CKO, proponemos que en el cerebelo perinatal,

las células que expresan LPP3 en el *velum* y en la región donde se une con el lóbulo anterobasal del vermis (Figs. 8 y 13), cumplen con una función fundamental controlando la elongación del *velum* y la adecuada formación de la *glia limitans* en esta área. En ausencia de LPP3, una contracción o tensión anormal de las células del área del *velum* podría doblar el extremo anterior del vermis y jalar células, contribuyendo así a la ectopia celular encontrada en esta zona. Alternativamente, las células podrían presentar una migración anterior mayor a la normal, como consecuencia de la pérdida de una señal restrictiva en la MHB impuesta por la LPP3, o incluso el fenotipo podría ser resultado de una fusión defectuosa de la línea media, aunque estas posibilidades tendrían que ser analizadas experimentalmente.

Describimos que la ausencia de LPP3 en la BG reduce su proliferación durante el desarrollo postnatal temprano del cerebelo, lo que a su vez puede explicar la reducción en su densidad en el adulto. Se ha descrito que la S1P liberada por astrocitos de cerebelo en respuesta a Fgf2 induce su proliferación (Bassi et al., 2006). Es posible que en ausencia de LPP3 el Fgf2 producido por las PC durante el desarrollo resulte en la acumulación de S1P, causando así la desensibilización y degradación de los receptores a S1P que median la proliferación de la BG. En apoyo a esta hipótesis encontramos una temprana reducción en la expresión de S1P₁ (desde P4) en el cerebelo CKO, lo cual coincide con la etapa de mayor proliferación de la BG y con la etapa donde se observaron mayores alteraciones en la proliferación de estas células.

Por otro lado, determinar como la deficiencia de LPP3 afecta la proliferación de las EGC de manera temporal y regional, no es sencillo. Se sabe que la cinética de proliferación de las EGC está controlada por el factor Shh, el cual se produce en las PC y es modulada por algunos otros factores (Vaillant y Monard, 2009). Nuestros resultados demuestran que LPP3 no se expresa en las PC o EGC, por lo que las alteraciones observadas en la proliferación de las EGC del CKO deben ser un efecto indirecto de la ausencia de LPP3 en la BG. Una posibilidad es que la reducción en la densidad de las BG afecte a alguno de los componentes que regulan positivamente la vía de señalización de Shh en las EGC. Esta idea está apoyada por la reducción regional de la proliferación de la BG durante el desarrollo del CKO, el cual coincide con áreas que muestran una disminución en la proliferación de las EGC, como por ejemplo en P4. Una estrecha

correlación entre los patrones espacio-temporales de proliferación en estos tipos celulares también ha sido sugerida para la rata (Shiga et al., 1983).

Una gran cantidad de literatura apoya la idea de que modificaciones en la citoarquitectura de la BG produce alteraciones en la migración de las células granulares debido a la defectuosa formación de su sustrato de andamiaje (Rakic y Sidman, 1973; Eiraku et al., 2005; Qu y Smith, 2005;; Weller et al., 2006; Lin et al., 2009). En los cerebelos de nuestros ratones CKO, la migración de las EGC se retrasa sin afectar su diferenciación, como lo evidencia la detección normal de p27 en la EGL proximal. Sin embargo, nuestros ensayos de TUNEL en P15 sugieren que las GC que diferencian ectópicamente en la EGL y que no logran alcanzar la IGL mueren. Por lo tanto, la hipoplasia encontrada en los cerebelos deficientes de LPP3 debe ser originada principalmente por dos mecanismos, la reducción en la proliferación de las EGC y el incremento, en etapas más tardías del desarrollo, de la muerte de las mismas como consecuencia de alteraciones en su migración.

Posterior a la migración de los somas de la BG desde la zona ventricular, éstos se arreglan de forma similar a un epitelio en la PCL. Este arreglo resultó alterado en los cerebelos de nuestros ratones CKO. Dicho fenotipo, además de cambios en su citoarquitectura y retraso en la migración de las EGC, han sido asociados a una perturbación en la activación de la vía de señalización de Notch (Eiraku et al., 2005; Weller et al., 2006; Komine et al., 2007). Se requerirá en un futuro analizar en detalle si la ausencia de LPP3 afecta a las interacciones PC-BG a través alteraciones en la señalización de esta vía. Sin embargo, un dato que sugiere cierto grado de interacción entre las vías de Notch y LPP3 es el cambio en la expresión de BLBP, un blanco transcripcional de Notch (Anthony et al., 2005), en los cerebelos CKO.

5.4 LPP3 es una proteína que regula la foliación del cerebelo

Resulta interesante que la inactivación de LPP3 en el SN conduce a un patrón de foliación del cerebelo afectado siempre de la misma manera, lo que indica la necesidad de LPP3 para el desarrollo específico de folias. Es decir, aunque la desaparición de la fisura intercrural se presentó con una penetrancia del 84%, encontramos hipoplasias regionales específicas totalmente consistentes, como la de la folia IV-V, la desaparición

de la úvula de la folia IX, además de la reducción de las fisuras y la presencia anormal de un surco tipo lingular con neuronas ectópicas. Considerando estas alteraciones y su origen durante el desarrollo del cerebelo, resulta interesante que un locus aún sin identificar (cerebellum foliation pattern-1 o *cfp1*; Neumann et al., 1990 Garretson y Neumann, 1993) en el cromosoma 4 del ratón, en el cual se ubica el gen *Ppap2b*, afecta la frecuencia de aparición del surco declival en el lóbulo VI-VII, de la fisura lingular en el lóbulo I/II y la de la fisura intraculmen del lóbulo IV/V en varias cepas de ratones. Dado que varios de estos lóbulos son afectados por la deficiencia de LPP3 es probable que *Ppap2b* corresponda a este locus involucrado en el patrón de foliación del cerebelo.

5.5 Posible origen del fenotipo motor encontrado en el ratón CKO.

Habiendo descartado posibles daños en la tonicidad muscular y en el equilibrio de los ratones CKO, aún queda por esclarecer si el fenotipo motor observado se debe a las alteraciones morfológicas del cerebelo establecidas durante el desarrollo o a cambios en las propiedades electrofisiológicas del mismo o de otra región del cerebro. La información existente en este campo nos condujo a ahondar inicialmente en la primera hipótesis y describir el origen morfológico anormal del cerebelo de los CKO. Estudios clásicos de somatotopía (Manni y Petrosini, 2004), muestran que el lóbulo anterior del cerebelo es la región que controla los movimientos finos de las extremidades posteriores. En el CKO, la morfología y densidad anormal de la BG, al igual que la regulación negativa de S1P₁, se distribuye a lo largo y ancho del cerebelo, por lo que es más probable que los defectos regionales de nuestro CKO, como la reducción de fisuras y folias del lóbulo anterior, contribuyan a los defectos en la coordinación motora.

Apoyar la segunda posibilidad conlleva a una hipótesis más elaborada aunque no por ello imposible de probar. Se ha reportado que diversos cambios en la densidad o morfología neuronal pueden alterar la función del cerebelo, como es el caso de diversos tipos de ataxias espinocerebelosas (Vig et al., 1998; Yang et al., 2000). Otros estudios han mostrado que la BG puede producir problemas en el patrón de locomoción de manera indirecta, a través de la afeción a las PC (Custer et al., 2006) o a las GC (Cui et al., 2001). También, se han descrito problemas de coordinación motora relacionados a cambios en células gliales, específicamente al repertorio de proteínas que expresan, a su

distribución o incluso a sus propiedades electrofisiológicas. Por ejemplo, un proceso de astrogliosis evidenciado por el aumento en GFAP, además de cambios en la densidad y distribución del transportador de glutamato Glast, preceden a un estado de ataxia espinocerebelosa tipo 1 en un modelo de ratón transgénico condicional (Giovannoni et al., 2007). También se ha descrito que cambios en la morfología y distribución de la BG, específicamente de sus procesos, afectan la actividad sináptica de la PC (Iino et al., 2001). De la misma manera la actividad del transportador Glast expresado por la BG altera la actividad de la PC (Bordey y Sontheimer, 2003). De lo anterior se desprende la idea de la participación de la BG defectuosa en el fenotipo motor de nuestros ratones CKO.

Con base en lo anterior, una de las principales perspectivas del presente trabajo es establecer si existen cambios en las propiedades electrofisiológicas de las PC en nuestros ratones CKO que contribuyan al fenotipo motor observado. Uno de los mecanismos por el que esto podría suceder se relaciona a la recaptura de neurotransmisores liberados en las sinapsis. Dada la disminución en el número de la BG parecería lógico encontrar una reducción en la densidad del transportador de glutamato Glast. Sin embargo, nosotros no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de este transportador durante el análisis de la proteína total del cerebelo adulto, sugiriendo que en los CKO hay un mecanismo de compensación de la expresión de este transportador. Otra posibilidad es que existan cambios en la distribución de Glast respecto a las sinapsis por lo que para analizarlo sería necesaria una descripción ultra-estructural de la relación BG-PC en los ratones CKO. Alternativamente, podrían existir alteraciones en la actividad de los transportadores de glutamato lo cual afectaría la fisiología de las PC. La descripción de las propiedades electrofisiológicas de las PC y de la actividad de recaptura de neurotransmisores realizada por la BG en los ratones CKO, revelarán si LPP3 se encuentra directa o indirectamente implicada en la regulación de la neurotransmisión en el cerebelo, como se ha descrito en otros modelos regulados por LPA y la S1P (Keller et al., 1996; Sim-Selley et al., 2009). A este respecto, se sabe que la expresión de Glast en la membrana plasmática y su actividad es susceptible de regulación por PCK, la cual es una cinasa regulable por diversas señales como el DAG, segundo mensajero regulado por LPP3 (Sciorra y Morris, 1999). De cualquier manera, nuestro ratón deficiente en la

expresión de LPP3 constituye un excelente modelo para el análisis de la función de LPP3 en la BG, así como en la fisiología general del cerebelo.

5.6 La manipulación de la expresión de S1P₁ conduce a alteraciones de la BG similares a los del CKO.

Desde la búsqueda bibliográfica e *in silico*, de las moléculas relacionadas a la actividad de LPP3 en el cerebelo, se hizo evidente que la vía de la S1P podría estar afectada por la inactivación de LPP3 en el SN (Fig. 16). En esta región se encuentra particularmente enriquecido el transcrito de S1P₁, aunque no existían propuestas de su función (Liu y Hla, 1997; Chae et al., 2004;). Sólo se había descrito que la señalización mediada por S1P regula la adhesión y forma celular en células gliales (Mullershausen et al., 2007; Tas y Koschel, 1998), y la proliferación de astrocitos cultivados del cerebelo (Bassi et al., 2006). Como LPP3 y S1P₁ son muy abundantes en la BG del cerebelo [presente trabajo, (Nishimura et al., 2010)], y la ausencia de LPP3 incrementa la disponibilidad de S1P además de regular negativamente a S1P₁, se hizo evidente la posibilidad de que las anormalidades encontradas en la BG fueran originadas por el metabolismo/señalización de S1P. Si bien la aplicación del modulador de S1P₁, el FTY720, ya sea *in vivo* o *in vitro* no condujo a cambios en la foliación del cerebelo, los daños a nivel celular encontrados en la BG resultaron ser parecidos a los encontrados en el CKO. En estos modelos también fue posible probar que el tratamiento con FTY720 condujo a la regulación negativa de S1P₁ en la BG, como sucede en el cerebelo CKO. La ausencia de más fenotipos puede relacionarse con la relativamente baja dosis empleada (dosis terapéutica en fase III de investigación clínica), además del corto periodo de tratamiento, en términos del desarrollo del cerebelo. En experimentos de administración de FTY720 a hembras gestantes, no logramos que éstas llegaran a término por lo que se deberán usar otras estrategias experimentales que darían mayor certeza del mecanismo como son: 1) el rescate del fenotipo normal del cerebelo CKO a través de la expresión en la BG, de una versión mutante del receptor S1P₁ la cual no puede ser internalizada (Oo et al., 2007) o 2) la fenocopia de las anormalidades del CKO a través de la escisión condicional de S1P₁ en la BG (el alelo nulo de S1P₁ es letal en la etapa fetal).

Aún queda por esclarecer el mecanismo molecular exacto por el que la modificación de la vía S1P/S1P₁ puede mediar las anomalías encontradas en la BG. Se sabe que la motilidad de los procesos de la BG es dependiente de la polimerización de actina. El principal regulador de la polimerización de actina río abajo de S1P₁ es Rac1, la cual es activada por acción de la P13K. Evidencia de la reducción en la señalización mediada por S1P₁ en el CKO, que pudiera afectar la actividad de Rac1 en la BG, es la reducción global en la actividad de AKT, otro blanco de la actividad de P13K. Estudios mostrando cambios en la actividad de moléculas río debajo de S1P₁ *in situ* o *in vitro* ayudarán a establecer claramente el cómo la deficiencia de LPP3 afecta a la BG.

Finalmente, la estrecha conexión funcional entre LPP3 y la regulación de la expresión de S1P₁, es un hallazgo de gran relevancia ya que la regulación negativa de este receptor es el mecanismo por el que el inmunomodulador FTY720 trabaja y por el que tiene gran potencial para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Brinkmann, 2009; Nixon, 2009). El FTY720 es un análogo estructural de la S1P que es fosforilado y entonces funciona como un agonista de S1P₁, lo que produce su internalización y degradación. A este mecanismo es al que se le ha atribuido su efecto inmunomodulador ya que en ausencia de señalización del S1P₁, los linfocitos T no pueden salir de los órganos linfoides. Notablemente, la inactivación condicional de LPP3 en tejido linfoide y vascular también tiene efectos negativos sobre el egreso de los linfocitos T de órganos linfoides demostrando que esta enzima también juega un papel importante en la regulación de la señalización de S1P₁ en este sistema (Breat et al., en preparación). En este sentido, el efecto de la mutación de LPP3 y el mecanismo de acción de FTY720 convergen en la regulación negativa de la expresión del receptor S1P₁, por lo que la regulación de la actividad de LPP3 emerge como un posible blanco terapéutico de enfermedades autoinmunes en las que se emplea el FTY720 aunque por otro lado, la presente investigación también nos alerta sobre potenciales efectos secundarios del uso de drogas que mitiguen la señalización del S1P₁, específicamente sobre en desarrollo del cerebelo.

6 CONCLUSIONES

- LPP3 es una fosfatasa que se expresa abundantemente en dominios membranales de la BG del cerebelo adulto y en la glía radial/BG inmadura durante el desarrollo.
- LPP3 es una fosfatasa que tiene como sustrato a la S1P en el cerebelo *in vivo*.
- La inactivación de LPP3 en el linaje neuroglial *in vivo*, conduce a una regulación negativa de la expresión del receptor S1P₁ en el cerebelo, lo que puede ser el resultado de un proceso crónico de activación, internalización y degradación de dicho receptor.
- La ausencia de LPP3 durante el desarrollo del cerebelo, afecta la morfología, distribución y número de glía radial/BG, lo que a su vez afecta el desarrollo del cerebelo.
- El modulador FTY720 es capaz de fenocopiar algunos de los defectos que produce la ausencia de LPP3 sobre la BG.
- La inactivación de LPP3 en el linaje neuroglial produce defectos en la coordinación motora fina.

En resumen, la expresión de LPP3 por células gliales del cerebelo es necesaria para un adecuado metabolismo y señalización de S1P, lo que además es importante para el correcto desarrollo y funcionamiento de esta región del cerebro.

7 REFERENCIAS

- Alberts Bruce, J. A., Lewis Julian, Martin Ra , Keith Roberts, y Peter Walter.** (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York.
- Alcock, J., Scotting, P. y Sottile, V.** (2007). Bergmann glia as putative stem cells of the mature cerebellum. *Med Hypotheses* **69**, 341-345.
- Aleman, R., Kleuser, B., Ruwisch, L., Danneberg, K., Lass, H., Hashemi, R., Spiegel, S., Jakobs, K. H. y Meyer zu Heringdorf, D.** (2001). Depolarisation induces rapid and transient formation of intracellular sphingosine-1-phosphate. *FEBS Lett* **509**, 239-44.
- Ancellin, N., Colmont, C., Su, J., Li, Q., Mittereder, N., Chae, S. S., Stefansson, S., Liao, G. and Hla, T.** (2002). Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J Biol Chem* **277**, 6667-75.
- Anelli, V., Bassi, R., Tettamanti, G., Viani, P. and Riboni, L.** (2005). Extracellular release of newly synthesized sphingosine-1-phosphate by cerebellar granule cells and astrocytes. *J Neurochem* **92**, 1204-15.
- Anliker, B. and Chun, J.** (2004a). Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 457-65.
- Anliker, B. and Chun, J.** (2004b). Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **279**, 20555-8.
- Anthony, T. E., Mason, H. A., Gridley, T., Fishell, G. and Heintz, N.** (2005). Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes Dev* **19**, 1028-33.
- Bajjalieh, S. M., Martin, T. F. and Floor, E.** (1989). Synaptic vesicle ceramide kinase. A calcium-stimulated lipid kinase that co-purifies with brain synaptic vesicles. *J Biol Chem* **264**, 14354-60.
- Barila, D., Plateroti, M., Nobili, F., Muda, A. O., Xie, Y., Morimoto, T. and Perozzi, G.** (1996). The Dri 42 gene, whose expression is up-regulated during epithelial differentiation, encodes a novel endoplasmic reticulum resident transmembrane protein. *J Biol Chem* **271**, 29928-36.
- Bassi, R., Anelli, V., Giussani, P., Tettamanti, G., Viani, P. and Riboni, L.** (2006). Sphingosine-1-phosphate is released by cerebellar astrocytes in response to bFGF and induces astrocyte proliferation through Gi-protein-coupled receptors. *Glia* **53**, 621-30.
- Bellamy, T. C. and Ogden, D.** (2005). Short-term plasticity of Bergmann glial cell extrasynaptic currents during parallel fiber stimulation in rat cerebellum. *Glia* **52**, 325-35.
- Blondeau, N., Lai, Y., Tyndall, S., Popolo, M., Topalkara, K., Pru, J. K., Zhang, L., Kim, H., Liao, J. K., Ding, K. et al.** (2007). Distribution of sphingosine kinase activity and mRNA in rodent brain. *J Neurochem* **103**, 509-17.
- Boath, A., Graf, C., Lidome, E., Ullrich, T., Nussbaumer, P. and Bornancin, F.** (2008). Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin. *J Biol Chem* **283**, 8517-26.

Bordey, A. and Sontheimer, H. (2003). Modulation of glutamatergic transmission by bergmann glial cells in rat cerebellum in situ. *J Neurophysiol* **89**, 979-88.

Breart, B., Ramos-Pérez, W. D., Mendoza, A., Huang, Y., Adams, R.H., Escalante-Alcalde, D. y Schwab, S.R. Lipid phosphate phosphatase 3 maintains low thymic shingosine-1-phosphatase and enables efficient thymic egress. (en preparación).

Brindley, D. N. (2004). Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem* **92**, 900-12.

Brindley DN, A. B. (2009). Lipid Mediators and Modulators of Neural Function: Lysophosphatidate and Lysolipids. New York USA.

Brindley, D. N. and Waggoner, D. W. (1998). Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J Biol Chem* **273**, 24281-4.

Brinkmann, V. (2009). FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *Br J Pharmacol* **158**, 1173-82.

Burnett, C. and Howard, K. (2003). Fly and mammalian lipid phosphate phosphatase isoforms differ in activity both in vitro and in vivo. *EMBO Rep* **4**, 793-9.

Burnett, C., Makridou, P., Hewlett, L. and Howard, K. (2004). Lipid phosphate phosphatases dimerise, but this interaction is not required for in vivo activity. *BMC Biochem* **5**, 2.

Cervera, P., Tirard, M., Barron, S., Allard, J., Trottier, S., Lacombe, J., Daumas-Duport, C. and Sokoloff, P. (2002). Immunohistological localization of the myelinating cell-specific receptor LP(A1). *Glia* **38**, 126-36.

Contos, J. J., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D. and Chun, J. (2000). Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13384-9.

Cui, W., Allen, N. D., Skynner, M., Gusterson, B. and Clark, A. J. (2001). Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia* **34**, 272-82.

Custer, S. K., Garden, G. A., Gill, N., Rueb, U., Libby, R. T., Schultz, C., Guyenet, S. J., Deller, T., Westrum, L. E., Sopher, B. L. et al. (2006). Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat Neurosci* **9**, 1302-11.

Chae, S. S., Proia, R. L. and Hla, T. (2004). Constitutive expression of the S1P1 receptor in adult tissues. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **73**, 141-50.

Chalfant, C. E. and Spiegel, S. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci* **118**, 4605-12.

Chik, C. L., Li, B., Negishi, T., Karpinski, E. and Ho, A. K. (1999). Ceramide inhibits L-type calcium channel currents in rat pinealocytes. *Endocrinology* **140**, 5682-90.

Choi, J. W., Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C. W., Mutoh, T., Lin, M. E., Teo, S. T., Park, K. E., Mosley, A. N. et al. (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**, 157-86.

Chun, J., Goetzl, E. J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K. R., Moolenaar, W., Pyne, S. and Tigyi, G. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* **54**, 265-9.

Daaka, Y., Luttrell, L. M., Ahn, S., Della Rocca, G. J., Ferguson, S. S., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**, 685-8.

Das, A. K. and Hajra, A. K. (1989). Quantification, characterization and fatty acid composition of lysophosphatidic acid in different rat tissues. *Lipids* **24**, 329-33.

Das, G. D. (1976). Differentiation of Bergmann glia cells in the cerebellum: a golgi study. *Brain Res* **110**, 199-213.

Delgado-Garcia, J. M. (2001). [Structure and function of the cerebellum]. *Rev Neurol* **33**, 635-42.

Dubin, A. E., Bahnson, T., Weiner, J. A., Fukushima, N. and Chun, J. (1999). Lysophosphatidic acid stimulates neurotransmitter-like conductance changes that precede GABA and L-glutamate in early, presumptive cortical neuroblasts. *J Neurosci* **19**, 1371-81.

Edsall, L. C., Cuvillier, O., Twitty, S., Spiegel, S. and Milstien, S. (2001). Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. *J Neurochem* **76**, 1573-84.

Edsall, L. C. and Spiegel, S. (1999). Enzymatic measurement of sphingosine 1-phosphate. *Anal Biochem* **272**, 80-6.

Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I. and Moolenaar, W. H. (1993). The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* **291** (Pt 3), 677-80.

Eiraku, M., Tohgo, A., Ono, K., Kaneko, M., Fujishima, K., Hirano, T. and Kengaku, M. (2005). DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci* **8**, 873-80.

Elvers, M., Stegner, D., Hagedorn, I., Kleinschnitz, C., Braun, A., Kuijpers, M. E., Boesl, M., Chen, Q., Heemskerk, J. W., Stoll, G. et al. (2010). Impaired alpha(IIb)beta(3) integrin activation and shear-dependent thrombus formation in mice lacking phospholipase D1. *Sci Signal* **3**, ra1. [DOI: 10.1126/scisignal.2000551].

Escalante-Alcalde, D., Hernandez, L., Le Stunff, H., Maeda, R., Lee, H. S., Jr Gang, C., Sciorra, V. A., Daar, I., Spiegel, S., Morris, A. J. et al. (2003). The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development* **130**, 4623-37.

Escalante-Alcalde, D., Morales, S. L. and Stewart, C. L. (2009). Generation of a reporter-null allele of Ppap2b/LPP3 and its expression during embryogenesis. *Int J Dev Biol* **53**, 139-47.

Escalante-Alcalde, D., Sanchez-Sanchez, R. and Stewart, C. L. (2007). Generation of a conditional Ppap2b/LPP3 null allele. *Genesis* **45**, 465-9.

Foster, C. A., Howard, L. M., Schweitzer, A., Persohn, E., Hiestand, P. C., Balatoni, B., Reuschel, R., Beerli, C., Schwartz, M. and Billich, A. (2007). Brain penetration of the oral immunomodulatory drug FTY720 and its phosphorylation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: consequences for mode of action in multiple sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* **323**, 469-75.

Foster, C. A., Mechtcheriakova, D., Storch, M. K., Balatoni, B., Howard, L. M., Bornancin, F., Wlachos, A., Sobanov, J., Kinnunen, A. and Baumruker, T. (2009). FTY720 rescue therapy in the dark agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis: expression of central nervous system genes and reversal of blood-brain-barrier damage. *Brain Pathol* **19**, 254-66.

Foster, D. A. and Xu, L. (2003). Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol Cancer Res* **1**, 789-800.

Fukushima, N., Weiner, J. A. and Chun, J. (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Dev Biol* **228**, 6-18.

Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D., Contos, J. J., Rehen, S. K., Kingsbury, M. A., Kim, K. Y. and Chun, J. (2002). Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. *Mol Cell Neurosci* **20**, 271-82.

Gangoiti, P., Granado, M. H., Arana, L., Ouro, A. and Gomez-Munoz, A. (2010). Activation of protein kinase C-alpha is essential for stimulation of cell proliferation by ceramide 1-phosphate. *FEBS Lett* **584**, 517-24.

Garretson, J. D. and Neumann, P. E. (1993). Further evidence that a mouse chromosome 4 locus influences cerebellar folial pattern. *Brain Res* **630**, 221-5.

Giovannoni, R., Maggio, N., Rosaria Bianco, M., Cavaliere, C., Cirillo, G., Lavitrano, M. and Papa, M. (2007). Reactive astrogliosis and glial glutamate transporter clustering are early changes in a spinocerebellar ataxia type 1 transgenic mouse model. *Neuron Glia Biol* **3**, 335-51.

Giussani, P., Ferraretto, A., Gravaghi, C., Bassi, R., Tettamanti, G., Riboni, L. and Viani, P. (2007). Sphingosine-1-phosphate and calcium signaling in cerebellar astrocytes and differentiated granule cells. *Neurochem Res* **32**, 27-37.

Gomez-Munoz, A., Duffy, P. A., Martin, A., O'Brien, L., Byun, H. S., Bittman, R. and Brindley, D. N. (1995). Short-chain ceramide-1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides. *Mol Pharmacol* **47**, 833-9.

Gonzalez-Cabrera, P. J., Hla, T. and Rosen, H. (2007). Mapping pathways downstream of sphingosine 1-phosphate subtype 1 by differential chemical perturbation and proteomics. *J Biol Chem* **282**, 7254-64.

Grodd, W., Hulsmann, E., Lotze, M., Wildgruber, D. and Erb, M. (2001). Sensorimotor mapping of the human cerebellum: fMRI evidence of somatotopic organization. *Hum Brain Mapp* **13**, 55-73.

Hinkovska-Galcheva, V., Boxer, L. A., Kindzelskii, A., Hiraoka, M., Abe, A., Goparju, S., Spiegel, S., Petty, H. R. and Shayman, J. A. (2005). Ceramide 1-phosphate, a mediator of phagocytosis. *J Biol Chem* **280**, 26612-21.

Hirata A, Inada K, Tsukamoto T, Sakai H, Mizoshita T, Yanai T, Masegi T, Goto H, Inagaki M, Tatematsu M. (2004). Characterization of a monoclonal antibody, HTA28, recognizing a histone H3 phosphorylation site as a useful marker of M-phase cells. *J Histochem Cytochem*, **52**, 1503-1509.

Holtsberg, F. W., Steiner, M. R., Furukawa, K., Keller, J. N., Mattson, M. P. and Steiner, S. M. (1997). Lysophosphatidic acid induces a sustained elevation of neuronal intracellular calcium. *J Neurochem* **69**, 68-75.

- Humtsoe, J. O., Feng, S., Thakker, G. D., Yang, J., Hong, J. and Wary, K. K.** (2003). Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP. *Embo J* **22**, 1539-54.
- Iino, M., Goto, K., Kakegawa, W., Okado, H., Sudo, M., Ishiuchi, S., Miwa, A., Takayasu, Y., Saito, I., Tsuzuki, K. et al.** (2001). Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science* **292**, 926-9.
- Ikeda, M., Kihara, A. and Igarashi, Y.** (2004). Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* **325**, 338-43.
- Imai, A., Furui, T., Tamaya, T. and Mills, G. B.** (2000). A gonadotropin-releasing hormone-responsive phosphatase hydrolyses lysophosphatidic acid within the plasma membrane of ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3370-5.
- Ishii, I., Ye, X., Friedman, B., Kawamura, S., Contos, J. J., Kingsbury, M. A., Yang, A. H., Zhang, G., Brown, J. H. and Chun, J.** (2002). Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem* **277**, 25152-9.
- Jalink, K., van Corven, E. J. and Moolenaar, W. H.** (1990). Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca²⁺-mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *J Biol Chem* **265**, 12232-9.
- Jessup, W.** (2008). Lipid metabolism: sources and stability of plasma sphingosine-1-phosphate. *Curr Opin Lipidol* **19**, 543-4.
- Jia, Y. J., Kai, M., Wada, I., Sakane, F. and Kano, H.** (2003). Differential localization of lipid phosphate phosphatases 1 and 3 to cell surface subdomains in polarized MDCK cells. *FEBS Lett* **552**, 240-6.
- Kai, M., Wada, I., Imai, S., Sakane, F. and Kano, H.** (1997). Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem* **272**, 24572-8.
- Kajimoto, T., Okada, T., Yu, H., Goparaju, S. K., Jahangeer, S. and Nakamura, S.** (2007). Involvement of sphingosine-1-phosphate in glutamate secretion in hippocampal neurons. *Mol Cell Biol* **27**, 3429-40.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Jessell, T. M.** (2000). Principles of Neural Science. New York.
- Keller, J. N., Steiner, M. R., Mattson, M. P. and Steiner, S. M.** (1996). Lysophosphatidic acid decreases glutamate and glucose uptake by astrocytes. *J Neurochem* **67**, 2300-5.
- Kim, R. H., Takabe, K., Milstien, S. and Spiegel, S.** (2009). Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 692-6.
- Kingsbury, M. A., Rehen, S. K., Contos, J. J., Higgins, C. M. and Chun, J.** (2003). Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nat Neurosci* **6**, 1292-9.
- Kobayashi, N., Nishi, T., Hirata, T., Kihara, A., Sano, T., Igarashi, Y. and Yamaguchi, A.** (2006). Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J Lipid Res* **47**, 614-21.

Koirala, S. and Corfas, G. (2010) Identification of novel glial genes by single-cell transcriptional profiling of Bergmann glial cells from mouse cerebellum. *PLoS One* **5**, e9198.

Komine, O., Nagaoka, M., Watase, K., Gutmann, D. H., Tanigaki, K., Honjo, T., Radtke, F., Saito, T., Chiba, S. and Tanaka, K. (2007). The monolayer formation of Bergmann glial cells is regulated by Notch/RBP-J signaling. *Dev Biol* **311**, 238-50.

Kooijman, E. E. and Burger, K. N. (2009). Biophysics and function of phosphatidic acid: a molecular perspective. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 881-8.

Lee, H. Y., Murata, J., Clair, T., Polymeropoulos, M. H., Torres, R., Manrow, R. E., Liotta, L. A. and Stracke, M. L. (1996). Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 714-9.

Lin, Y., Chen, L., Lin, C., Luo, Y., Tsai, R. Y. and Wang, F. (2009). Neuron-derived FGF9 is essential for scaffold formation of Bergmann radial fibers and migration of granule neurons in the cerebellum. *Dev Biol* **329**, 44-54.

Lippman, J. J., Lordkipanidze, T., Buell, M. E., Yoon, S. O. and Dunaevsky, A. (2008). Morphogenesis and regulation of Bergmann glial processes during Purkinje cell dendritic spine ensheathment and synaptogenesis. *Glia* **56**, 1463-77.

Liu, C. H. and Hla, T. (1997). The mouse gene for the inducible G-protein-coupled receptor *edg-1*. *Genomics* **43**, 15-24.

Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C. X., Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Nava, V. E., Chae, S. S., Lee, M. J. et al. (2000). *Edg-1*, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* **106**, 951-61.

Lopez-Juarez, A. (2008). [Bergmann glia receptors and transporters: possible roles in cerebellum physiology]. *Rev Neurol* **47**, 527-35.

Louvi, A., Alexandre, P., Metin, C., Wurst, W. and Wassef, M. (2003). The isthmic neuroepithelium is essential for cerebellar midline fusion. *Development* **130**, 5319-30.

Maceyka, M., Payne, S. G., Milstien, S. and Spiegel, S. (2002). Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1585**, 193-201.

MacLennan, A. J., Carney, P. R., Zhu, W. J., Chaves, A. H., Garcia, J., Grimes, J. R., Anderson, K. J., Roper, S. N. and Lee, N. (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur J Neurosci* **14**, 203-9.

Manni, E. and Petrosini, L. (2004). A century of cerebellar somatotopy: a debated representation. *Nat Rev Neurosci* **5**, 241-9.

Matas-Rico, E., Garcia-Diaz, B., Llebregz-Zayas, P., Lopez-Barroso, D., Santin, L., Pedraza, C., Smith-Fernandez, A., Fernandez-Llebregz, P., Tellez, T., Redondo, M. et al. (2008). Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci* **39**, 342-55.

McGiffert, C., Contos, J. J., Friedman, B. and Chun, J. (2002). Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for *s1p(1)* in neurogenesis and *s1p(1-3)* in angiogenesis. *FEBS Lett* **531**, 103-8.

Mills, G. B. and Moolenaar, W. H. (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 582-91.

Miron, V. E., Schubart, A. and Antel, J. P. (2008). Central nervous system-directed effects of FTY720 (fingolimod). *J Neurol Sci* **274**, 13-7.

Mitra, P., Oskeritzian, C. A., Payne, S. G., Beaven, M. A., Milstien, S. and Spiegel, S. (2006). Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16394-9.

Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G. F., Spiegel, S. and Proia, R. L. (2005). Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol* **25**, 11113-21.

Mullershausen, F., Craveiro, L. M., Shin, Y., Cortes-Cros, M., Bassilana, F., Osinde, M., Wishart, W. L., Guerini, D., Thallmair, M., Schwab, M. E. et al. (2007). Phosphorylated FTY720 promotes astrocyte migration through sphingosine-1-phosphate receptors. *J Neurochem* **102**, 1151-61.

Murata, N., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Yanagita, M., Kuwabara, A., Ui, M. and Okajima, F. (2000). Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J* **352 Pt 3**, 809-15.

Murayama, T. and Ui, M. (1987). Phosphatidic acid may stimulate membrane receptors mediating adenylate cyclase inhibition and phospholipid breakdown in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* **262**, 5522-9.

Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. (2003). Manipulating the mouse embryo. New York US.

Nakamura, K., Ohkawa, R., Okubo, S., Yokota, H., Ikeda, H., Yatomi, Y., Igarashi, K., Ide, K., Kishimoto, T., Masuda, A. et al. (2009). Autotaxin enzyme immunoassay in human cerebrospinal fluid samples. *Clin Chim Acta* **405**, 160-2.

Nanjundan, M. and Possmayer, F. (2001). Molecular cloning and expression of pulmonary lipid phosphate phosphohydrolases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L1484-93.

Neumann, P. E., Mueller, G. G. and Sidman, R. L. (1990). Identification and mapping of a mouse gene influencing cerebellar folial pattern. *Brain Res* **524**, 85-9.

Nimmerjahn, A., Mukamel, E. A. and Schnitzer, M. J. (2009). Motor behavior activates Bergmann glial networks. *Neuron* **62**, 400-12.

Nishimura, H., Akiyama, T., Irei, I., Hamazaki, S. and Sadahira, Y. (2010) Cellular localization of sphingosine-1-phosphate receptor 1 expression in the human central nervous system. *J Histochem Cytochem* **58**, 847-56.

Nixon, G. F. (2009). Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *Br J Pharmacol* **158**, 982-93.

Ohuchi, H., Hamada, A., Matsuda, H., Takagi, A., Tanaka, M., Aoki, J., Arai, H. and Noji, S. (2008). Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Dev Dyn* **237**, 3280-94.

Ohuchi, H., Hayashibara, Y., Matsuda, H., Onoi, M., Mitsumori, M., Tanaka, M., Aoki, J., Arai, H. and Noji, S. (2007). Diversified expression patterns of autotaxin, a gene for phospholipid-generating enzyme during mouse and chicken development. *Dev Dyn* **236**, 1134-43.

- Okudaira, S., Yukiura, H. and Aoki, J.** (2010) Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* **92**, 698-706.
- Oldham, M. C., Konopka, G., Iwamoto, K., Langfelder, P., Kato, T., Horvath, S. and Geschwind, D. H.** (2008). Functional organization of the transcriptome in human brain. *Nat Neurosci* **11**, 1271-82.
- Olenchock, B. A., Guo, R., Carpenter, J. H., Jordan, M., Topham, M. K., Koretzky, G. A. and Zhong, X. P.** (2006). Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy. *Nat Immunol* **7**, 1174-81.
- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S. and Spiegel, S.** (1999). Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* **147**, 545-58.
- Olivera, A. and Spiegel, S.** (1993). Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* **365**, 557-60.
- Oo, M. L., Thangada, S., Wu, M. T., Liu, C. H., Macdonald, T. L., Lynch, K. R., Lin, C. Y. and Hla, T.** (2007). Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem* **282**, 9082-9.
- Pagano, R. E. and Longmuir, K. J.** (1985). Phosphorylation, transbilayer movement, and facilitated intracellular transport of diacylglycerol are involved in the uptake of a fluorescent analog of phosphatidic acid by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* **260**, 1909-16.
- Pages, C., Simon, M. F., Valet, P. and Saulnier-Blache, J. S.** (2001). Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **64**, 1-10.
- Postma, F. R., Jalink, K., Hengeveld, T. and Moolenaar, W. H.** (1996). Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor. *Embo J* **15**, 2388-92.
- Pyne, S., Kong, K. C. and Darroch, P. I.** (2004). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 491-501.
- Qu, Q. and Smith, F. I.** (2005). Neuronal migration defects in cerebellum of the Largemyd mouse are associated with disruptions in Bergmann glia organization and delayed migration of granule neurons. *Cerebellum* **4**, 261-70.
- Rakic, P. and Sidman, R. L.** (1973). Weaver mutant mouse cerebellum: defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 240-4.
- Rao, T. S., Lariosa-Willingham, K. D., Lin, F. F., Palfreyman, E. L., Yu, N., Chun, J. and Webb, M.** (2003). Pharmacological characterization of lysophospholipid receptor signal transduction pathways in rat cerebrocortical astrocytes. *Brain Res* **990**, 182-94.
- Riboni, L., Bassi, R., Anelli, V. and Viani, P.** (2002). Metabolic formation of ceramide-1-phosphate in cerebellar granule cells: evidence for the phosphorylation of ceramide by different metabolic pathways. *Neurochem Res* **27**, 711-6.

Rizzo, M. A., Shome, K., Watkins, S. C. and Romero, G. (2000). The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem* **275**, 23911-8.

Rodriguez de Turco, E. B., Tang, W., Topham, M. K., Sakane, F., Marcheselli, V. L., Chen, C., Taketomi, A., Prescott, S. M. and Bazan, N. G. (2001). Diacylglycerol kinase epsilon regulates seizure susceptibility and long-term potentiation through arachidonoyl- inositol lipid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4740-5.

Sánchez-Sánchez, R., Morales-Lázaro, S.L., Baizabal J.M., Sunkara, M., Morris, A.J. y Escalante-Alcalde, D. (2009). Lack of lipid phosphate phosphatase-3 in embryonic stem cells affects their differentiation to neural lineage and neuron neuritogenesis. (en preparación).

Sato, K., Malchinkhuu, E., Horiuchi, Y., Mogi, C., Tomura, H., Tosaka, M., Yoshimoto, Y., Kuwabara, A. and Okajima, F. (2007). Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J Neurochem*.

Sato, K., Malchinkhuu, E., Muraki, T., Ishikawa, K., Hayashi, K., Tosaka, M., Mochiduki, A., Inoue, K., Tomura, H., Mogi, C. et al. (2005). Identification of autotaxin as a neurite retraction-inducing factor of PC12 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources. *J Neurochem* **92**, 904-14.

Savaskan, N. E., Rocha, L., Kotter, M. R., Baer, A., Lubec, G., van Meeteren, L. A., Kishi, Y., Aoki, J., Moolenaar, W. H., Nitsch, R. et al. (2007). Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci* **64**, 230-43.

Sciorra, V. A. and Morris, A. J. (1999). Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **10**, 3863-76.

Seung Lee, W., Hong, M. P., Hoon Kim, T., Kyoo Shin, Y., Soo Lee, C., Park, M. and Song, J. H. (2005). Effects of lysophosphatidic acid on sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* **1035**, 100-4.

Shano, S., Moriyama, R., Chun, J. and Fukushima, N. (2008). Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1. *Neurochem Int* **52**, 216-20.

Shiga, T., Ichikawa, M. and Hirata, Y. (1983). Spatial and temporal pattern of postnatal proliferation of Bergmann glial cells in rat cerebellum: an autoradiographic study. *Anat Embryol (Berl)* **167**, 203-11.

Sigal, Y. J., McDermott, M. I. and Morris, A. J. (2005). Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J* **387**, 281-93.

Sillitoe, R. V. and Joyner, A. L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 549-77.

Sim-Selley, L. J., Goforth, P. B., Mba, M. U., Macdonald, T. L., Lynch, K. R., Milstien, S., Spiegel, S., Satin, L. S., Welch, S. P. and Selley, D. E. (2009). Sphingosine-1-phosphate receptors mediate neuromodulatory functions in the CNS. *J Neurochem* **110**, 1191-202.

Simon, M. F., Rey, A., Castan-Laurel, I., Gres, S., Sibrac, D., Valet, P. and Saulnier-Blache, J. S. (2002). Expression of ectolipid phosphate phosphohydrolases in 3T3F442A preadipocytes and adipocytes. Involvement in the control of lysophosphatidic acid production. *J Biol Chem* **277**, 23131-6.

Sorensen, S. D., Nicole, O., Peavy, R. D., Montoya, L. M., Lee, C. J., Murphy, T. J., Traynelis, S. F. and Hepler, J. R. (2003). Common signaling pathways link activation of murine PAR-1, LPA, and S1P receptors to proliferation of astrocytes. *Mol Pharmacol* **64**, 1199-209.

Spiegel, S. and Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 397-407.

Spohr, T. C., Choi, J. W., Gardell, S. E., Herr, D., Rehen, S. K., Gomes, F. C. and Chun, J. (2008). LPA receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *J Biol Chem*.

Su, W., Yeku, O., Olepu, S., Genna, A., Park, J. S., Ren, H., Du, G., Gelb, M. H., Morris, A. J. and Frohman, M. A. (2009). 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), a phospholipase D pharmacological inhibitor that alters cell spreading and inhibits chemotaxis. *Mol Pharmacol* **75**, 437-46.

Sudarov, A. and Joyner, A. L. (2007). Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Dev* **2**, 26.

Suzuki, R., Sakagami, H., Owada, Y., Handa, Y. and Kondo, H. (1999). Localization of mRNA for Dri 42, subtype 2b of phosphatidic acid phosphatase, in the rat brain during development. *Brain Res Mol Brain Res* **66**, 195-9.

Tanaka, M., Okudaira, S., Kishi, Y., Ohkawa, R., Iseki, S., Ota, M., Noji, S., Yatomi, Y., Aoki, J. and Arai, H. (2006). Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **281**, 25822-30.

Tanyi, J. L., Morris, A. J., Wolf, J. K., Fang, X., Hasegawa, Y., Lapushin, R., Auersperg, N., Sigal, Y. J., Newman, R. A., Felix, E. A. et al. (2003). The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Res* **63**, 1073-82.

Tas, P. W. and Koschel, K. (1998). Sphingosine-1-phosphate induces a Ca²⁺ signal in primary rat astrocytes and a Ca²⁺ signal and shape changes in C6 rat glioma cells. *J Neurosci Res* **52**, 427-34.

Terada, N., Banno, Y., Ohno, N., Fujii, Y., Murate, T., Sarna, J. R., Hawkes, R., Zea, Z., Baba, T. and Ohno, S. (2004). Compartmentation of the mouse cerebellar cortex by sphingosine kinase. *J Comp Neurol* **469**, 119-27.

Thompson, F. J. and Clark, M. A. (1994). Purification of a lysophosphatidic acid-hydrolysing lysophospholipase from rat brain. *Biochem J* **300** (Pt 2), 457-61.

Thumser, A. E., Voysey, J. E. and Wilton, D. C. (1994). The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin. *Biochem J* **301** (Pt 3), 801-6.

Tigyi, G., Fischer, D. J., Sebok, A., Yang, C., Dyer, D. L. and Miledi, R. (1996). Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca²⁺ signaling and Rho. *J Neurochem* **66**, 537-48.

- Tigyí, G., Hong, L., Yakubu, M., Parfenova, H., Shibata, M. and Leffler, C. W.** (1995). Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets. *Am J Physiol* **268**, H2048-55.
- Tómsig, J. L., Snyder, A. H., Berdyshev, E. V., Skobeleva, A., Mataya, C., Natarajan, V., Brindley, D. N. and Lynch, K. R.** (2009). Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *Biochem J*.
- Trimbuch, T., Beed, P., Vogt, J., Schuchmann, S., Maier, N., Kintscher, M., Breustedt, J., Schuelke, M., Streu, N., Kieselmann, O. et al.** (2009). Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell* **138**, 1222-35.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P. C., Bock, R., Klein, R. and Schutz, G.** (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* **23**, 99-103.
- Tuson, M., Marfany, G. and Gonzalez-Duarte, R.** (2004). Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *Am J Hum Genet* **74**, 128-38.
- Ulrix, W., Swinnen, J. V., Heyns, W. and Verhoeven, G.** (1998). Identification of the phosphatidic acid phosphatase type 2a isozyme as an androgen-regulated gene in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *J Biol Chem* **273**, 4660-5.
- Vaillant, C. and Monard, D.** (2009). SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum* **8**, 291-301.
- Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L. C., Schmidt, R. R. and Spiegel, S.** (1999). Sphingosine 1-phosphate-induced cell rounding and neurite retraction are mediated by the G protein-coupled receptor H218. *J Biol Chem* **274**, 4626-32.
- van Meeteren, L. A., Ruurs, P., Stortelers, C., Bouwman, P., van Rooijen, M. A., Pradere, J. P., Pettit, T. R., Wakelam, M. J., Saulnier-Blache, J. S., Mummery, C. L. et al.** (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* **26**, 5015-22.
- Van Veldhoven, P. P., Foglesong, R. J. and Bell, R. M.** (1989). A facile enzymatic synthesis of sphingosine-1-phosphate and dihydrosphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res* **30**, 611-6.
- Vig, P. J., Subramony, S. H., Burright, E. N., Fratkin, J. D., McDaniel, D. O., Desai, D. and Qin, Z.** (1998). Reduced immunoreactivity to calcium-binding proteins in Purkinje cells precedes onset of ataxia in spinocerebellar ataxia-1 transgenic mice. *Neurology* **50**, 106-13.
- Waggoner, D. W., Martin, A., Dewald, J., Gomez-Munoz, A. and Brindley, D. N.** (1995). Purification and characterization of novel plasma membrane phosphatidate phosphohydrolase from rat liver. *J Biol Chem* **270**, 19422-9.
- Waggoner, D. W., Xu, J., Singh, I., Jasinska, R., Zhang, Q. X. and Brindley, D. N.** (1999). Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction. *Biochim Biophys Acta* **1439**, 299-316.
- Wang, X., Devaiah, S. P., Zhang, W. and Welti, R.** (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res* **45**, 250-78.

- Weller, M., Krautler, N., Mantei, N., Suter, U. and Taylor, V.** (2006). Jagged1 ablation results in cerebellar granule cell migration defects and depletion of Bergmann glia. *Dev Neurosci* **28**, 70-80.
- Yamada, K., Fukaya, M., Shibata, T., Kurihara, H., Tanaka, K., Inoue, Y. and Watanabe, M.** (2000). Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells. *J Comp Neurol* **418**, 106-20.
- Yang, Q., Hashizume, Y., Yoshida, M., Wang, Y., Goto, Y., Mitsuma, N., Ishikawa, K. and Mizusawa, H.** (2000). Morphological Purkinje cell changes in spinocerebellar ataxia type 6. *Acta Neuropathol* **100**, 371-6.
- Young, K. W., Challiss, R. A., Nahorski, S. R. and MacKrell, J. J.** (1999). Lysophosphatidic acid-mediated Ca²⁺ mobilization in human SH-SY5Y neuroblastoma cells is independent of phosphoinositide signalling, but dependent on sphingosine kinase activation. *Biochem J* **343 Pt 1**, 45-52.
- Yue, J., Yokoyama, K., Balazs, L., Baker, D. L., Smalley, D., Pilquill, C., Brindley, D. N. and Tigyi, G.** (2004). Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level. *Cell Signal* **16**, 385-99.
- Zhang, N., Sundberg, J. P. and Gridley, T.** (2000a). Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile. *Genesis* **27**, 137-40.
- Zhang, N., Zhang, J., Purcell, K. J., Cheng, Y. and Howard, K.** (1997). The Drosophila protein Wunen repels migrating germ cells. *Nature* **385**, 64-7.
- Zhang, Q. X., Pilquill, C. S., Dewald, J., Berthiaume, L. G. and Brindley, D. N.** (2000b). Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action. *Biochem J* **345 Pt 2**, 181-4.
- Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J. C., Liu, Y., Peng, Q. et al.** (2006). Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1864-84.

8 APÉNDICES

Expression of LPP3 in Bergmann Glia is Required for Proper Cerebellar Sphingosine-1-Phosphate Metabolism/Signaling and Development

ALEJANDRO LÓPEZ-JUÁREZ,¹ SARA MORALES-LÁZARO,¹ ROBERTO SÁNCHEZ-SÁNCHEZ,¹ MANJULA SUNKARA,² HILDA LOMELÍ,³ IVÁN VELASCO,¹ ANDREW J. MORRIS,² AND DIANA ESCALANTE-ALCALDE^{1*}

¹Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

²College of Medicine, University of Kentucky, Lexington, Kentucky

³Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

KEY WORDS

cerebellum; lipid phosphate phosphatase; S1P; S1P₁; astrocytes

ABSTRACT

Bioactive lipids serve as intracellular and extracellular mediators in cell signaling in normal and pathological conditions. Here we describe that an important regulator of some of these lipids, the lipid phosphate phosphatase-3 (LPP3), is abundantly expressed in specific plasma membrane domains of Bergmann glia (BG), a specialized type of astrocyte with key roles in cerebellum development and physiology. Mice selectively lacking expression of *LPP3/Ppap2b* in the nervous system are viable and fertile but exhibit defects in postnatal cerebellum development and modifications in the cytoarchitecture and arrangement of BG with a mild non-progressive motor coordination defect. Lipid and gene profiling studies in combination with pharmacological treatments suggest that most of these effects are associated with alterations in sphingosine-1-phosphate (S1P) metabolism and signaling. Altogether our data indicate that LPP3 participates in several aspects of neuron-glia communication required for proper cerebellum development. ©2010 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Lysophospholipids (LPs) such as lysophosphatic acid (LPA) and S1P play important roles in central nervous system (CNS) development, physiology, and disease. The biosynthetic machinery and receptors responsible for LPs production and signaling are broadly distributed in the embryonic and adult brain with strong expression in neurogenic areas. *In vitro* studies have shown that LPA and S1P alter several cellular responses in neurons and glia (Brindley and Bräuer, 2009; Milstien et al., 2007). Both have potent neurite retracting activity in postmitotic neurons and neuronal cell lines, through the activation of Rho signaling (Fukushima et al., 2002; Postma et al., 1996; Sato et al., 1997) and serve as regulators of neuroblast morphology and migration (Fukushima et al., 2000; Kimura et al., 2007). Additionally, LPA and S1P modulate intracellular Ca²⁺ in neurons and glia (Giussani et al., 2007; Hultsberg et al., 1997), promote astrocytic proliferation (Bassi et al., 2006; Shano et al.,

2008) and modulate neuronal excitability (Sim-Selley et al., 2009; Trimbuch et al., 2009).

In *ex vivo* experiments, activation of LPA receptors induces folding and widening of the embryonic cerebral cortex, due to decreased cell death and increased terminal mitosis (Kingsbury et al., 2003). In contrast, a sub-line of *Lpar1* knockout mice shows abnormal cortical development and increased cell death (Estivill-Torres et al., 2008). Mice lacking receptor S1P₁ show increased cell death and reduced proliferation in the forebrain and die past mid-gestation due to defective vascular maturation (Mizugishi et al., 2005). The targeted inactivation of *S1pr2* yielded viable animals with no apparent anatomical or physiological defects, although they show sporadic seizures and increased excitability of neocortical pyramidal neurons (MacLennan et al., 2001). These observations show that LPA- and S1P-receptor mediated signaling play fundamental roles in CNS development and in modulating neuron excitability. In addition, abnormal S1P and LPA signaling participate in the etiology of several neuropathological conditions (Dennis et al., 2005; Nixon, 2009).

Determining the specific *in vivo* function of these LPs has been precluded in part due to the elevated number of existing receptors and the apparent redundancy between them. However, studies of the enzymes that synthesize or metabolize these lipids strongly supports their role in development, normal physiology, and disease. That is the case of autotaxin (Dennis et al., 2005; van Meeteren et al., 2006), sphingosine kinases (Mizugishi et al., 2005), sphingosine-1-phosphate lyase (Fyrst and Saba, 2008), lipid phosphate phosphatases (LPPs) (Escalante-Alcalde et al., 2003), and LPP-related proteins (Trimbuch et al., 2009).

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: CONACyT; Grant numbers: 39995, 53777; Grant sponsor: PAPIIT; Grant number: IX208604, IN216009; Grant sponsor: NIH; Grant numbers: R01GM50388, 1P20RR021954.

*Correspondence to: Diana Escalante-Alcalde, Instituto de Fisiología Celular-UNAM, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria, México D. F. 04510, Coyoacán, Mexico. E-mail: descalante@ifc.unam.mx

Received 1 June 2010; Accepted 22 November 2010

DOI 10.1002/glia.21126

Published online 00 Month 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

LPPs are a family of integral membrane enzymes with a wide spectrum lipid phosphate phosphohydrolase activity. Mammalian LPPs hydrolyze phosphatidic acid and ceramide-1-P besides LPA and S1P, originating diacylglycerol, ceramide, monoacylglycerol, and sphingosine, respectively (Brindley et al., 2009). For this reason LPPs are considered regulators of the biological responses mediated by these lipids. Among the three LPPs described in mice, LPP3/*Ppap2b* is the only one which is essential for embryo development (Escalante-Alcalde et al., 2003), suggesting particular and nonredundant functions for this enzyme.

The role of LPPs in the development and function of the CNS has not been explored. In this article we show that neural deficiency of LPP3 produces a mild motor coordination defect and abnormalities in cerebellar foliation, the latter related to alterations in the morphology, distribution, and density of BG cells during cerebellum development. Remarkably, lack of LPP3 also leads to increased S1P concentration and down-regulation of S1P₁ receptor in the cerebellum indicating that this enzyme is a key modulator of S1P signaling in this region. Pharmacological treatment with a S1P₁ functional antagonist partially mimics the alterations found in BG strongly suggesting that the observed cerebellar alterations are associated to abnormal S1P/S1P₁ metabolism and signaling.

MATERIALS AND METHODS

Mouse Strains and Generation of Neural-Specific LPP3-Knockout Mice

For gene expression analysis, the *Ppap2b*^{tm2Stu} allele (*Ppap2b*^{lacZ}), expressing β -galactosidase (β -gal) as a reporter was used (Escalante-Alcalde et al., 2009). For neural inactivation of LPP3, homozygous or heterozygous conditional *Ppap2b*^{tm3Stu} (*Ppap2b*^{lox}) females were crossed with *Tg(Nes-cre)1Kln*; *Ppap2b*^{tm3Stu/+} or *Ppap2b*^{tm3Stu tm3Stu} males and their progeny were genotyped by PCR from genomic DNA of neural and non-neural tissues as previously described (Escalante-Alcalde et al., 2007).

Motor Coordination Tests

Gross motor coordination defects were assessed on a Rotarod using two fixed rotation speeds in 1-month-old animals. After two training sessions, animals were placed on the Rotarod for 240 s, or until they fell off (latency to fall). Regardless of completion or fall, each animal was allowed to rest for 2 min between each trial. Each testing session consisted of 10 trials. Animals were tested at 20 and 30 rpm on consecutive days and data expressed as the mean \pm s.e.m. To assay for fine motor coordination defects, animals of 1 month of age were subjected to the beam-walking test. Performance was determined by measuring the time (up to 240 s) that mice were able to stay on round beams of two different diameters (5 and 7 mm). Another parameter evaluated was their behavior while walking on the beam. These tests were repeated in 1-year-old animals.

Immunohistochemistry, Immunofluorescence, TUNEL, and Confocal Microscopy

Perfused brains were fixed ON in 4% paraformaldehyde and 30 μ m sagittal slices were obtained in a vibratome (Leica Microsystems). Floating sections were permeabilized and blocked with 1% Blocking Reagent (Roche) in PBS-Tween 0.3% for 2 h. Antibodies (Abs) were diluted in blocking solution and incubated ON at 4°C: Rabbit anti-LPP3 (1:200), rabbit anti-Calbindin (1:100, Millipore), mouse anti-Parvalbumin (1:1,000, Sigma), rabbit anti-BLBP (1:200), rabbit anti-GFAP (1:1,000), rabbit anti-phospho-H3 (1:100, Cell Signaling). For some Abs, sections were mounted on slides and treated with Antigen Unmasking Solution (Vector) followed by immunoperoxidase/nickel (Vectastain kit, Vector) or immunofluorescence: mouse anti-PCNA (1:100, Vector); guinea pig anti-Glast (1:1,000); rabbit anti-p27 (1:100, Santa Cruz); mouse anti-S100B (1:100, Millipore); rabbit anti-EDG1 (1:100). Appropriate secondary Abs coupled to Alexa-488, Alexa-594 (Invitrogen), Texas Red or Cy5 (Jackson) were used for double and triple immunofluorescence. For TUNEL, sections were mounted and treated following provider's instructions (Boehringer, Germany). Sections were examined under a FV1000 confocal microscope (Olympus). Dual- or triple-color images were acquired using sequential acquisition to avoid cross-excitation. For co-localization experiments or high-resolution data, images were acquired with confocal aperture between 80 and 100 nm.

Cell Counting

Confocal images acquired with equivalent conditions and in corresponding cerebellar regions were analyzed in sagittal sections at the mid vermis. Purkinje (PC) and BG cell somas found in the area corresponding to 300 μ m of Purkinje cell layer (PCL) (defined as area unit) were counted. Identification of PC and BG was by parvalbumin or calbindin and BLBP immunoreactivity, respectively. For interneurons and ectopic BG cell somas in the molecular layer (ML), parvalbumin-, and BLBP-positive cell somas were counted in the area of ML between 300 μ m of PCL and the pia (defined as area unit). Phospho-Histone-H3 and TUNEL positive cells found in the external granule layer (EGL), PCL, and ML (if present) were counted per lobe or folia taking as boundaries the deepest part of the sulcus between folias. The total number of positive cells/layer/cerebellum was counted. Number of positive cells in conditional neural specific knockouts, were expressed as the percentage of control littermates (100%).

Quantification of Glycero- and Sphingo-Phospholipids by High-Pressure Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Lipids from perfused cerebellar tissue (around 20 mg wet weight) were extracted using acidified organic

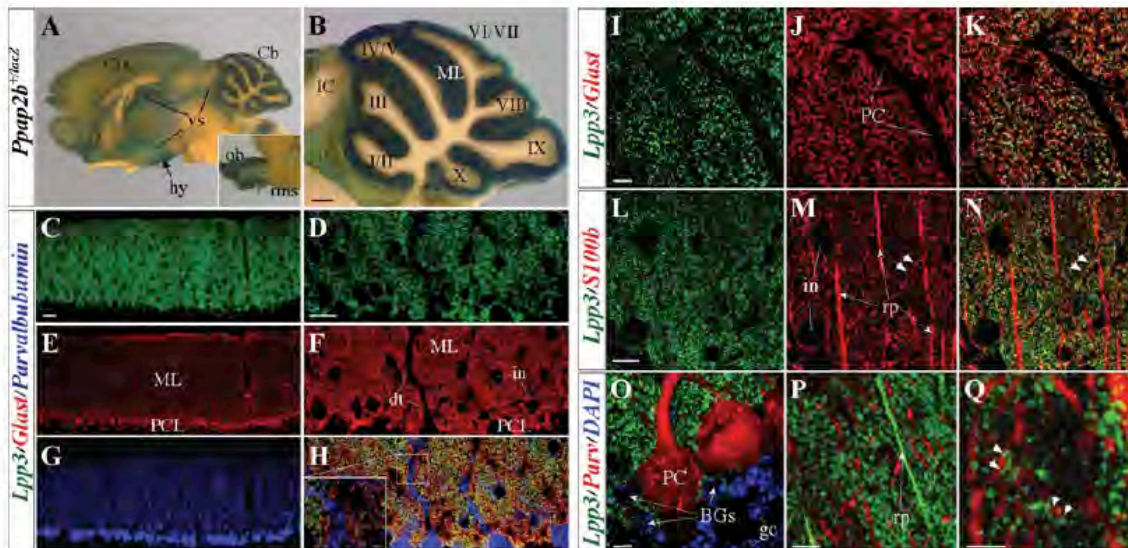


Fig. 1. Expression of LPP3 in the adult brain and Bergmann glia. (A,B) β -galactosidase staining (blue) of a *Ppap2b*^{lacZ} reporter mouse brain. Confocal images of triple (C–H) or double (I–Q) immunofluorescence in the molecular layer of WT cerebellum, using Abs against the indicated proteins. LPP3 is not expressed in parvalbumin-positive PC (H, O–Q) and S100B-positive radial processes of BG (L–N), but co-localize with Glast-expressing plasma membrane domains (H–K) and S100B-positive lateral branches of BG cells (yellow in N and arrowheads). Few LPP3-positive radial processes were observed near the pial surface (P).

Note the close apposition of LPP3-expressing processes to PC dendrites (Q, arrowheads). BGs, Bergmann glia somas; Cb, cerebellum; Ctx, cortex; dt, dendritic tree; gc, granule cells; hy, hypothalamus; IC, inferior colliculus; in, interneurons; iv, fourth ventricle; ML, molecular layer; ob, olfactory bulb; Parv, Parvalbumin; PC, Purkinje cell; PCL, Purkinje cell layer; rms, rostral migratory stream; rp, radial processes; vs, ventricular system; Capitalized roman numbers identify the folias of the cerebellum at the level of the vermis; Scale bars: B, 0.5 mm; C, E, G, 30 μ m; F, H; 20 μ m; H inset, 2 μ m.; I, 5 μ m; L, 10 μ m; O–Q, 5 μ m.

solvents with 50 pmol C17 LPA added as a recovery standard. Samples were evaporated to dryness, and redissolved in 4:1 MeOH; CHCl₃ for determination of phospholipid phosphorous and analysis by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry using selective reaction monitoring mode assays and methods that have been described in detail elsewhere to measure PA, LPA, and S1P (Albers et al., 2010; Mathews et al., 2010; Miriyala et al., 2010; Su et al., 2009). Data were corrected for recovery of the C17 LPA internal standard and lipid species were quantitated by reference to calibration curves generated using synthetic standards (Avanti Polar Lipids) that were independently quantitated by lipid phosphorous determination. The data shown are means of triplicate measurements made with independent samples.

Pharmacological Treatment with FTY720 *In Vitro* and *In Vivo*

For cerebellar organotypic slice cultures, anesthetized wildtype (ICR strain) or genetically modified mice at P7 were perfused with artificial cerebral spinal fluid, the cerebellum aseptically removed and cut into 300 μ m sagittal sections. Slices were then transferred to Millicell CM culture inserts (Millipore) in 35-mm culture dishes containing 1 mL of medium (DMEM-F12 50%, horse serum 25%, HBSS 25%, glutamine 1 mM, KCl 25 mM,

glucose 6 mg mL⁻¹, and antibiotics) and maintained for 48 h at 37° and 5% CO₂. Treatments (vehicle or FTY720 100 nM, Caiman Chemical) were added at the start of the culture. Slices were fixed ON with methanol-DMSO (4:1) and stained in whole mount against BLBP by immunofluorescence. Each experimental group was visualized using the same optical parameters under the confocal microscope. For *in vivo* treatments, FTY720 (0.3 μ g g⁻¹ of body weight) or vehicle was administered by intraperitoneal injection (i.p.) to mice from P3 to P14 and immunofluorescence or immunohistochemistry was performed as described earlier.

RESULTS

LPP3 is Highly Abundant in Specific Plasma Membrane Domains of Bergmann Glia Cells

LPP3 expression was initially analyzed in whole brain using a previously described *Ppap2b*-reporter allele (Escalante-Alcalde et al., 2009). In adult mice, β -gal was most strongly detected in the cerebellar cortex, followed by the olfactory bulb, the rostral migratory stream, and the ventricular system. A less conspicuous expression was found in the hypothalamus (Fig. 1A). Within the cerebellum, β -gal was restricted to the ML and PCL (Fig. 1B), being the somata of the BG the region with strongest reporter activity. Mature BG cells are unipolar

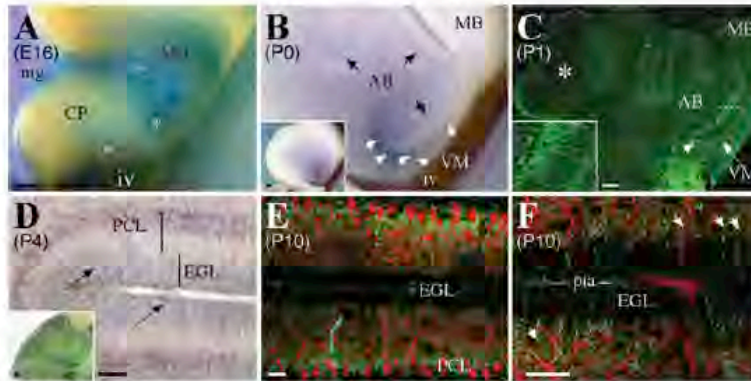


Fig. 2. Developmental expression of LPP3 in the cerebellum. Cerebella, at the stages indicated, were stained for β -gal (blue in A and inset in D), for LPP3 by immunohistochemistry (purple; B, D) and immunofluorescence (green, C,E,F) and for Parvalbumin (red, E,F). Asterisks in A show *Ppap2b^{lacZ}* expression domains. White arrowheads in B and C show expression in anterior cerebellum and VM, and black

arrows show expression in the developing PCL. Asterisk in C indicates the developing central lobe. Arrows in D and arrowheads in F indicate LPP3-positive radial processes. AB, antero-basal lobe; CP, cerebellum primordium; EGL, external granule layer; iv, fourth ventricle; MB, mid-brain; mg, meninges; VM, velum medullaris; Scale bars: A-C and inset in D, 100 μ m; D, F, 20 μ m; E, 30 μ m.

astrocytes located around the somas of PC (around 8 BG/per PC). Each BG cell gives rise to several intermediate filament-rich radial processes that traverse the ML and end at the pial surface. Each radial process is decorated with small secondary processes and a complex system of small lateral appendages rich in neurotransmitter transporters (i.e., Glast), which are in close interaction with synapses (Grosche et al., 2002; Yamada and Watanabe, 2002) participating in removal of neurotransmitters released during synaptic activity (Bordey and Sontheimer, 2003; Huang and Bordey, 2004). During postnatal cerebellum development BG cells participate in the radial migration of external granule cells (EGC) as they use BG radial processes as guidelines to reach the internal granule layer (IGL) (Rakic, 1971) and assist the morphogenesis of the PC dendritic tree (Yamada et al., 2000). Furthermore, it has been recently described that adult BG cells exhibit stem-cell like properties (Alcock and Sottile, 2009).

The expression pattern revealed with our *Ppap2b* reporter allele resembles the mRNA expression pattern of the rat homolog (Suzuki et al., 1999) however no studies describing LPP3 protein distribution in BG cells exist. To examine the subcellular localization of LPP3 in adult BG cells we performed double or triple immunofluorescence using Abs against LPP3 and for markers of BG (Glast, S100B) and PC/interneurons (Parvalbumin) (Fig. 1C–Q). LPP3 was expressed in the entire ML, with a similar pattern to that of Glast (Fig. 1C–F,I–K), which is expressed in the plasma membrane-domains of BG that ensheath the dendritic tree of PC (Yamada et al., 2000). Confocal analysis showed that LPP3 co-localized with Glast but was absent in PC and interneurons (Fig. 1G,H,O). Furthermore, LPP3 expression in BG cells also co-localized with S100B-positive lateral branches but was absent on radial processes (Fig. 1L–N), except for some near the pial surface (Fig. 1P). These results show that LPP3 in BG cells is restricted to the

plasma membrane domains that ensheath the PC dendritic trees and synapses, and suggest that it participates in some aspects of the neuron-glia communication in the adult cerebellar cortex.

BG precursors are generated in the ventricular zone (VZ) of the cerebellar primordium around embryonic day 13 (E13) (Miyake et al., 1995) and migrate toward the cortex due to shortening of their radial processes adhered to the pial surface through their end feet (Yuasa, 1996). Around the perinatal stage, the Glast-positive somas of BG organize into the PCL in a rostral-caudal fashion, while their radial processes cross the EGL and their end feet form the glia limitans at the pial surface (Yamada et al., 2000). BG shafts provide scaffolding during external granule cell radial migration, while the development of their fine lateral reticular processes accompanies the ensheathment of the developing dendritic tree of PC during the second postnatal week (Yamada et al., 2000).

To analyze LPP3 expression during BG and cerebellum development, we used a reporter allele, immunohistochemistry and immunofluorescence in cerebella from E16 to postnatal day 10 (P10) individuals (see Fig. 2). At E16, expression of LPP3 was restricted to two domains, at the most mid-rostral region and at the ventricular and intermediate zones (Fig. 2A asterisks); this expression pattern is in agreement with the ventricular origin of BG precursors. Around the perinatal period, a strong LPP3 expression domain was observed in the junction between the rostral-most part of the cerebellum primordium and the developing velum medullaris (Fig. 2B,C). Furthermore, LPP3-positive cells in the PCL became initially evident in the rostral lobules and forming posterior fissures. Appearance of LPP3-positive cells with radial processes that traverse the EGL correlated with the degree of alignment of BG into the PCL at this stage (Yamada et al., 2000), supporting its identity as BG. In addition, a weak LPP3-expressing domain was observed

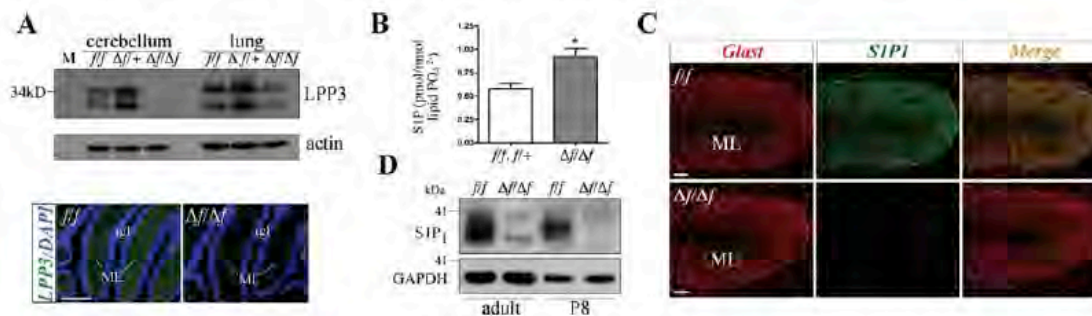


Fig. 3. Neural deficiency of LPP3 produces alterations in S1P metabolism and down-regulation of S1P₁. (A) Western blot and immunofluorescence analyses of LPP3 in total protein extracts of cerebellum from *f/f*, $\Delta f/\Delta f$ or $\Delta f/\Delta f$ mice. (B) Mass spectrometric analysis of total S1P species extracted from control and CKO cerebella. Mean \pm SD

($n = 3$), t test ($P < 0.05$). (C) S1P₁/Glast double immunofluorescence in sagittal sections at the level of the vermis, from P16 control and CKO cerebellum. (D) Western blot analysis of S1P₁ at the stages indicated. igl, internal granule layer; ML, molecular layer. Scale bar: 50 μ m.

in the anterior medulla of early postnatal cerebella (Fig. 2B inset), which extended to the entire medulla by P4 (Fig. 2D inset). At P4, LPP3-expressing BG cells arranged along the entire PCL (Fig. 2D) while the positive cells found in the medulla disappeared as development progressed, in agreement with disappearance of immature BG from this area. By P10, LPP3 expression was essentially identical to the adult stage except for the presence of LPP3-positive radial processes that still cross the remaining EGL (Fig. 2E,F). The developmental expression pattern of LPP3 described indicate that this enzyme is weakly expressed in BG precursors (E16), becomes highly expressed in immature and mature BG cells (perinatal stage onwards), and reflects the dynamic transformation that this cell type undergoes during postnatal development.

Lack of LPP3 Alters S1P Metabolism and S1P₁ Expression in the Cerebellum

Because of the early embryonic lethality of *Ppap2b* null mutants we used a genetic approach to conditionally inactivate *Ppap2b* in neural precursors. The *Ppap2b*^{tm3Stw} conditional allele (*f*) (Escalante-Alcalde et al., 2007) and a *Nestin::Cre* transgenic (Tronche et al., 1999) were used to inactivate the gene in neuron-glial progenitors from around E11 onwards (stage at which the transgenic broadly expresses Cre in nervous system). *Nestin::Cre*-mediated neural inactivation of *Ppap2b* resulted in viable and fertile mice, indicating that neuron-glial expression of LPP3 after E11 is not essential, however mice were $\sim 20\%$ smaller than controls. The highly efficient recombination of *Ppap2b* locus in the cerebellum of adult *Nestin::Cre; Ppap2b*^{tm3Stw/tm3Stw} animals (from here onwards referred as CKO in the text and *Ppap2b*^{NAflax/NAflax} or simply $\Delta f/\Delta f$ in the figures) was corroborated by PCR of genomic DNA (data not shown), western blot, and immunofluorescence (Fig. 3A). Out of the three LPPs found in mice, LPP3 is the only abundantly expressed in the adult cerebellum (Supp.

Info. Fig. S1), thus inactivation of *Ppap2b* should render changes in concentrations of their lipidic substrates and/or products. We performed lipid profiling by LC-MS/MS in CKO as in control cerebella and found that the level of S1P was consistently elevated in cerebellar tissue samples from CKO mice in comparison to controls, while LPA and PA or LPC (the latter not an LPP substrate) showed no statistical differences (Fig. 3B and Supp. Info. S2A). Aside from our previous observations showing that LPA, PA, and DAG levels are modified in null LPP3 mouse embryo fibroblasts *in vitro* (Escalante-Alcalde et al., 2003), the physiological role of LPP3 in lipid phosphate metabolism *in vivo* was largely unexplored. Our results indicate that LPP3 is a functional S1P phosphatase in the mouse cerebellum and is required for maintaining the appropriate levels of this lipid in that structure.

The presence and role of S1P in the cerebellum has been slightly studied: Sphingosine kinase (SPHK) activity in the CNS is highest in the cerebellum (Blondeau et al., 2007), SPHK1 expression has been found compartmentalized in some PC parasagittal stripes (Terada et al., 2004) and S1P can also be synthesized by cerebellar astrocytes and granule cells (Anelli et al., 2005). Furthermore, S1P promotes the proliferation of cerebellar astrocytes (Bassi et al., 2006) and produces Ca²⁺ signaling in cerebellar astrocytes and differentiated granule cells (Giussani et al., 2007). Between the mRNAs coding for S1P receptors expressed in the adult mouse cerebellum, the most abundant in the PCL and in the entire cerebellum is for the receptor 1 (S1P₁/S1pr1, Supp. Info. Fig. S1). In addition, transcripts coding for proteins involved in S1P signaling (S1P₁ and SPHK2) have been found highly enriched in mouse BG cells at P30 (Koirala and Corfas, 2010) suggesting that BG cells are a major contributor to S1P signaling in the cerebellum. To date no information exists regarding the abundance and distribution of S1P₁ in the mouse cerebellum, thus we performed S1P₁ immunofluorescence and immunohistochemistry. In control cerebella S1P₁ was primordially detected in the ML with a pattern

similar to that of LPP3 and *Glast* implicating that its expression is mainly in BG; however due to the origin of the antibodies we were only able to show co-localization between S1P₁ and *Glast* (Fig. 3C and Supp. Info. S2C). This result indirectly shows that S1P₁ and LPP3 are at least located in the same plasma membrane domains of BG cells. Surprisingly, when we analyzed the expression of S1P₁ in CKO cerebella, a pronounced decrease in the amount of S1P₁ in the ML was observed in the adult as well as in the developing postnatal cerebellum (Figs. 3C,S2D–G). To rule out a possible artifact of the antibody staining we performed western blot, which confirmed our immunostaining results (Fig. 3D) and pointed to a down-regulation of the receptor in the mutant cerebellum. The amount of *S1pr1* mRNA was unaltered in the CKO, which suggested that the decrease in the amount of receptor is due to degradation (Supp. Info. Fig. S2B). Given the dramatic decrease in the amount of S1P₁, we explored whether the CKO adult cerebellum, showed global changes in the activation of some S1P₁ downstream signaling molecules. While AKT activation was diminished in CKO cerebellum extracts vs. controls, activation of ERK1/2 was increased. In contrast, we were unable to detect consistent differences in the activation of PKC (Supp. Info. Fig. S2H). Altogether these data suggest that a sustained activation of S1P₁, due to the increase in extracellular S1P availability, is responsible for the internalization and degradation of this receptor in CKO animals, even during early postnatal cerebellum development. Experiments in isolated BG cells will be required to further dissect the signaling consequences of the absence of LPP3 in this system; however our results clearly demonstrate the requirement of LPP3 expressed in BG for the regulation of S1P metabolism/signaling in the cerebellum *in vivo*.

Neural Inactivation of Ppap2b Produces Mild Defects in Motor Coordination

The cerebellum is the structure that regulates learning and coordination of skilled movements. Thus we subjected control and CKO animals to neurological tests to reveal motor dysfunctions. On the Rotarod, which measures coarse motor performance, 1-month-old CKO mice showed significant smaller latency periods to fall at 20 and 30 rpm (Fig. 4A). On the fixed bar test, which reveals fine motor coordination defects particularly of the hindlimbs, performance of CKO mice was considerably affected in 100% of individuals. Although they were able to stay and move along the beam, they showed grasping and pulling movements with the forepaws and dragged the hindlimbs on the beam (Fig. 4B). No signs of worsening were found in 1-year-old mice, indicating that the motor dysfunction was not progressive at least up to this age. These results suggested possible alterations in the cerebellum physiology.

GLIA

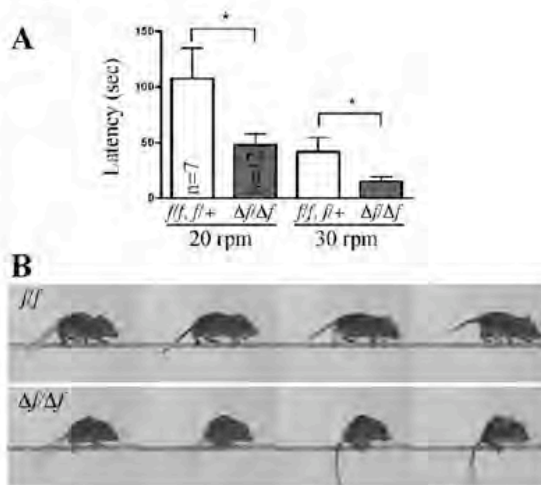


Fig. 4. Motor coordination defects in animals lacking neural expression of LPP3. (A) Latency to fall in seconds (sec) on the Rotarod test in control (*f/f*, *f/f*⁺) and CKO (*Δf/Δf*) animals. Mean \pm SEM, *t* test ^{*}*P* < 0.05). (B) Locomotion pattern of mice on the fixed bar (5 mm diameter).

LPP3 Deficiency in the Cerebellum Produces Foliation Defects and Alters BG Arrangement and Cytoarchitecture

One source of altered cerebellar function corresponds to malformations with developmental origin (Chizhikov and Millen, 2003). Since BG plays fundamental roles in cerebellum development we analyzed the structure of control and CKO adult cerebella and found alterations in the foliation pattern of mutants (Fig 5 and Supp. Info. S3). Macroscopic analysis showed a pronounced hypotrophy of folias IV-V (Supp. Info. Fig. S3) and IX (data not shown). Histological analysis of sagittal sections at the mid vermis from CKO cerebella revealed: (i) hypoplasia of folia III; (ii) a less pronounced precentral fissure; (iii) reduced folia IV-V (culmen); (iv) reduced or absent intercrural fissure in folia VI/VII, and (v) underdeveloped folia IX (uvula) with absent uvular sulcus (Fig. 5A,E). Also, in the most rostral area of the vermis, near the junction to the velum medullaris, a lingular-like sulcus with an abnormal accumulation of cells in the dorsal side of the molecular layer was observed (Fig. 5E).

To further study whether LPP3 deficiency affected the cytoarchitecture of BG or other cerebellar cell type in the adult stage, we analyzed PC, interneuron and BG arrangement, density and morphology at this stage. Morphology and density of PC in CKO were not evidently affected (Fig. 5B,F,I), however a mild disorganization of PC somas was sometimes observed in earlier stages (Fig. 6C,D). The number and distribution of interneurons along the ML were neither affected (Fig. 5B,F,I). In contrast, BG numbers, arrangement and morphology were evidently altered in CKO adult animals (Fig. 5C,D,G–I). While in control cerebella the radial processes of BG had the typical palisade distribution, with their end feet at the pial surface and their somas located at the PCL, in the

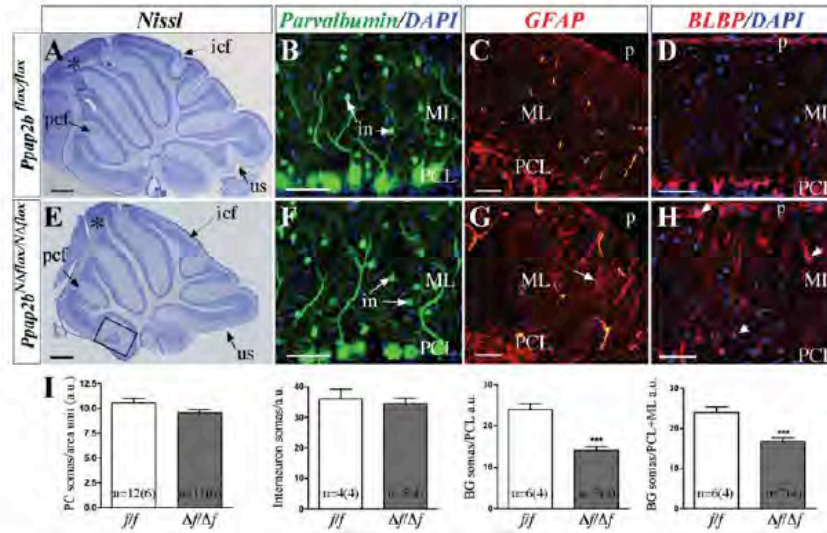


Fig. 5. Foliation and BG cytoarchitectonic defects in the LPP3 deficient cerebellum. Histological (A, E) and immunofluorescence (B–D, F–H) analyses in sagittal sections at the mid vermis. Parvalbumin was used to identify Purkinje cells and interneurons (B, F) while GFAP and BLBP were used to identify radial processes or somas and radial processes in BG respectively (C, G; D, H). (I) Quantitative analysis of different cell types densities in the Purkinje cell and molecular layers. Mean

\pm sem, n = #slices (#animals), t test ***($P < 0.001$). Asterisk in A and E indicates the folia IV-V. Rectangle in E shows abnormal lingular-like sulcus. Non-specific fluorescence signal in C, G appears in yellow. Arrow in G shows abnormal BG morphology. Arrowheads in H indicate ectopic BG. icf, intercrural fissure; in, interneuron; ML, molecular layer; p, pia; pcf, precentral fissure; PCL, Purkinje cell layer; us, uvular sulcus. Scale bars: A, E, 0.5 mm; B–D, F–H, 50 μ m.

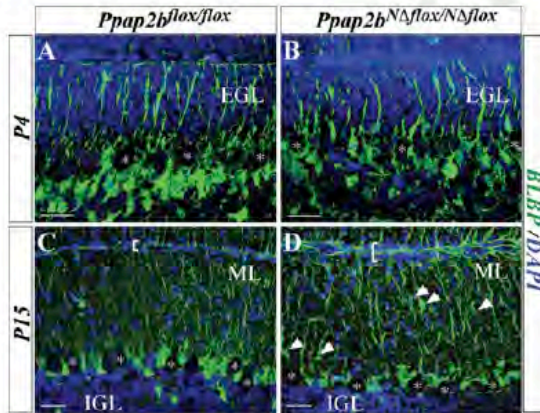


Fig. 6. The LPP3-deficient cerebellum shows early alterations in BG cytoarchitecture and arrangement. Sagittal sections from control (A,C) and CKO (B,D) cerebellum at the level of the vermis, processed for immunofluorescence against BLBP (green) at P4 or P15. Note that in P4 mutant sections, BG somas are not as homogeneously arranged below Purkinje cells and appear less abundant; at P15, BG somas are abnormally found in the ML (arrowheads in D). Square brackets in C and D indicate the thickness of EGL. IGL, internal granule layer; *, Purkinje cells. Scale bar: 30 μ m.

CKO the radial processes looked thicker and disorganized, and many of them did not reach the pial surface. Furthermore, their somas looked less organized within the PCL and were frequently misplaced in the ML. BG was 41.6% less abundant in the CKO PCL than in controls and 11% of total BG cells were located in the ML of CKO animals. These abnormalities were found along the ML regardless

of the folia observed. Confocal analysis revealed an apparent increase in the intensity of GFAP so we performed western blot of cerebellum protein extracts using antibodies against GFAP and two other BG markers, BLBP and Glast. Remarkably, while Glast showed no difference, BLBP and GFAP were increased 2- and 1.5-fold, respectively, in CKO extracts versus controls (Supp. Info. Fig. S4). The exact meaning of this result remains to be established; however it is worth noting that upregulation of GFAP is considered a landmark of reactive gliosis, which is normally associated with neural damage.

To address how early BG is affected in the CKO, we analyzed its positioning and morphology during postnatal cerebellum development. We found an abnormal arrangement of BG somas in the developing PCL as early as P4 (Fig. 6A,B), while ectopic BG somas in the ML were evident at P10-15 (Fig. 6C,D). At the latter stages, besides the disarrangement of BG somas, their radial processes were already thicker, tortuous, and many of them did not reach the pial surface. Furthermore the complexity of their fine lateral processes was apparently reduced. In addition, a decrease in the density of BLBP-positive somas in the PCL was apparent in these early stages (Fig. 6A–D), suggesting a decrease in BG numbers even during early postnatal stages.

Rostral-Most Defects are Associated to Alterations in LPP3-Expressing Glial Cells

As mentioned earlier, an abnormal accumulation of cells was observed in the dorsal side of the molecular

layer in the most rostral area of the vermis (Fig. 5E). The composition of this cumulus of cells was heterogeneous and formed by interneurons, PC, proliferating and postmitotic granular cells, astrocytes and BG cells (Supp. Info. Fig. S5A–E). In E17.5 mouse embryos, the medial cerebellum is delimited at the rostral end by the extension of the EGL, which ends almost at the isthmus in the mid-hindbrain boundary (MHB). During the next few days, an isthmus-derived structure develops and forms a wide sheet of cells devoid of neurons, the velum medullaris (VM). This structure links the anterior vermis to the inferior culliculus. To gain further insight into the origin of this rostral abnormality we analyzed mid-rostral cerebellum development in P0–P1 individuals. Sections at the mid vermis region were analyzed to observe the extension of EGC rostral migration, the location of PC and the structure of the VM. As shown in Supporting Information Fig. S5(F,G), in P0 CKO cerebellum the EGL extended rostrally up to the VM and was mildly curved. Moreover, the morphology of BLBP-positive radial glia, including BG cells, was altered: in the cerebellar area, radial processes that crossed the EGL were enlarged while in the velum area showed signs of disorganization, leading to an apparent disruption of the glia limitans. At P1 (Supp. Info. Fig. S5H,I) the curvature of the EGL was more pronounced even folding the most anterior end of this layer. Remarkably, a cumulus of calbindin-positive cells, presumably PC, was already observed in the dorsal side of this sulcus-like structure. Two possible cellular mechanisms could account for the formation of this abnormal structure, a localized increase in the proliferation rate of EGC or defective elongation of the velum medullaris. We found no evidence of increased proliferation rate of EGC in this area (Fig. 7C) suggesting that the sulcus-like structure arises due to defective elongation of the VM. Altogether these data suggest that in the perinatal cerebella, LPP3-expressing cells (presumably radial glia) in the velum and in the junction between the velum and the anterobasal lobe of the vermis (white arrowheads in Fig. 2B,C) play a fundamental role in controlling the elongation of the velum and proper formation of the glia limitans in this area.

Deficiency of LPP3 in BG Produces Proliferation Defects and EGC Delayed Migration

As noted, adult CKO cerebellum showed hypoplasia and reduction or disappearance of fissures and sulci. These phenotypes are frequently associated to defects in migration, proliferation, and/or survival of granule cells (Chzhikov and Millen, 2003). In the mouse, EGC use the radial processes of BG cells as scaffolds to reach the IGL from around the perinatal stage onwards being the peak of migration between P8 and P10 (Yacubova and Komuro, 2002). Since LPP3-deficient BG cells showed morphological defects from early stages of cerebellum development, it was possible that EGC had secondary developmental abnormalities associated to this phenotype (Rakic and Sidman, 1973). We found that in CKO cerebella, between

P10–P15, the EGL was thicker than in control littermates (Figs. 6C,D, 7A–D); however in adult animals no sign of remaining EGC was detected (Fig. 5A,E). This observation suggested a delayed migration of EGC in the CKO. To test this possibility, we analyzed the amount and distribution of PCNA- and p27-positive cells (proliferating and postmitotic premigratory EGC, respectively) in P15 cerebella. In regions where a few PCNA-positive cells were observed in fissures of control cerebella, the corresponding areas in CKO showed a large amount of PCNA positive cells (Fig. 7A,B). Furthermore, in areas where proliferating EGC were still found in controls (i.e., folias VI–VII and X), the thickness of the EGL positive to PCNA was larger in CKO (not shown). Similar observations were found in regard to the thickness of EGL with postmitotic cells (p27-positive) in the CKO animals vs. controls (Fig. 7C,D). Indication of delayed migration of EGC was strongly suggested by the reduction of p27-positive fusiform cells found in the molecular layer of CKO cerebella compared with control animals (arrowheads in Fig. 7C,D).

Delayed granule cell migration on its own might not account for the hypoplastic/foliation phenotypes found in mutants suggesting additional alterations in proliferation and/or cell death rates during CKO cerebellum development. To test this hypothesis, we performed a time-course analysis of proliferation (phospho-Histone-H3) and cell death (TUNEL) in CKO vs. control cerebella between P0–P15. Remarkably, a decrease in mitotic cells and an increase in TUNEL-positive cells were observed in CKO cerebella in a temporal and regional fashion (Fig. 7E–H). At P0–1, proliferating cells in the EGL were not altered while in the PCL a decrease in mitotic cells (18%) was observed in CKO. By P4 (estimated to be near the proliferation peak of BG cells in the mouse, Shiga et al., 1983) a significant decrease (33%) in the number of mitotic cells was observed in the EGL (principally in folias of the anterior lobe) and in the PCL (28%; principally in folias IV–VIII). Between P0–P4, most of the cells that proliferate in the PCL are BG, implying that this cell type is the one affected by the absence LPP3 in this layer. At P7–8, no differences in proliferation were found in the PCL (BG already cease proliferation at the stages), but a 17% reduction in proliferating cells in the EGL was observed principally in folias III and X. Finally, a considerable increase (2.6 fold) in TUNEL-positive cells was detected in the EGL and ML of CKO cerebella at P15. This correlated with the delayed EGC migration observed at this stage, suggesting that the ectopically differentiated GCs that do not reach the internal granule layer die. Thus foliation defects seem originated by a combination of reduced proliferation, increased cell death and delayed migration of EGC, all secondary to BG defects.

In Vitro and *In Vivo* Treatments with a S1P₁ Functional Antagonist, Partially Phenocopies Developmental Cerebellum Alterations

We finally explored if S1P/S1P₁-signaling alterations could contribute to the developmental defects observed.

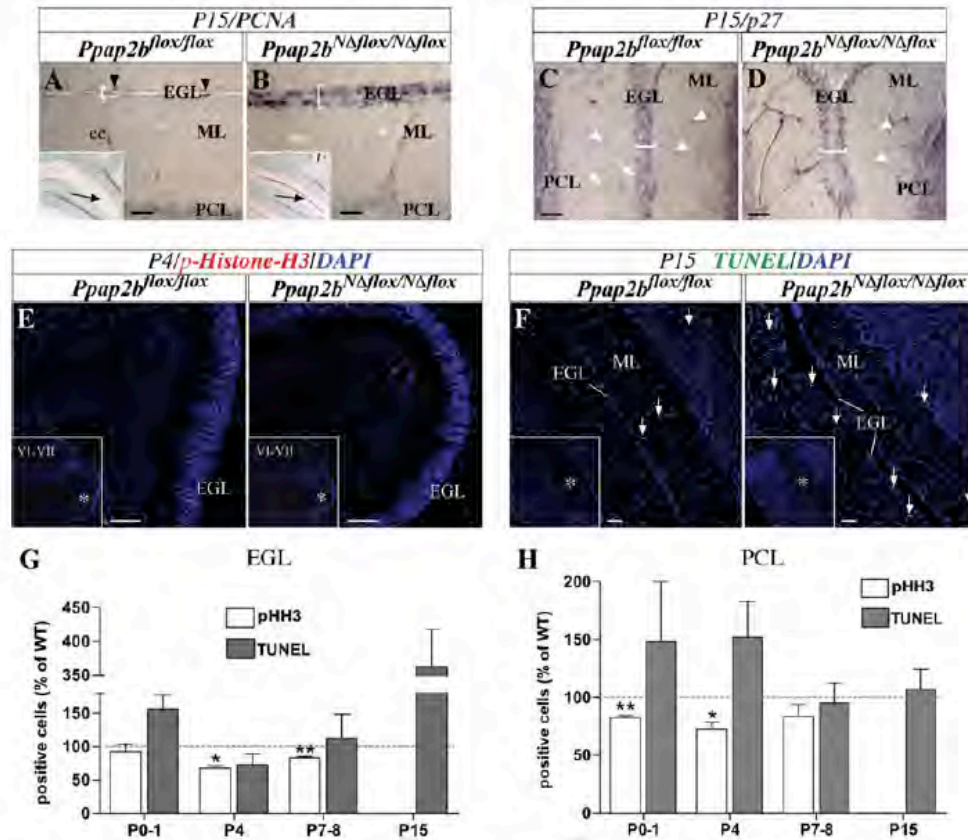


Fig. 7. Developing LPP3-deficient cerebella show alterations in EGC migration, proliferation and cell death. Sagittal sections at the level of the vermis from *Ppap2b*^{flox/flox} and *Ppap2b*^{NΔflox/NΔflox} cerebella of the indicated stages processed for immunoperoxidase against PCNA (A,B) or p27 (C,D), p-Histone-H3 immunofluorescence (E) or TUNEL (F). Images taken at the bottom of the primary fissure (A,B) in the area indicated by the arrow (insets) or at the intercrural fissure (C,D). Square brackets indicate the thickness of the labeled EGL. Arrowheads in (A) show PCNA-positive cells and in (C,D) migrating GC. (E) Representative image of p-Histone-H3 staining in cerebella at P4, the area

showed corresponds to folia IV-V (asterisks in insets); note the decrease in proliferation in CKO. (F) At P15, TUNEL assay showed a considerable rise in cell death in the EGL and ML of CKO, the area showed corresponds to the secondary fissure area (asterisks in insets). (G,H) Analysis of p-Histone-H3 (pHH3) and TUNEL-positive cells in the EGL (G) and PCL (H) at the stages indicated. At least three animals/genotype/stage were evaluated, except for P15 TUNEL ($n = 2$). Values are mean \pm SEM, t test *($P < 0.05$) and **($P < 0.01$). ec, endothelial cell. Scale bar: A–D, 30 μ m; E, F, 50 μ m.

FTY720 is a S1P receptor modulator, which is phosphorylated by sphingosine kinases *in vivo* to form the active compound FTY720-P. The latter causes internalization and degradation of S1P₁ expressed at the plasma membrane, thereby working as a S1P₁ functional antagonist (Brinkmann 2009; Nixon 2009). Because of its lipophilic nature FTY720 crosses the blood–brain barrier (Foster et al., 2007) and recent evidence suggests that it can act in CNS cells including astrocytes (Miron et al., 2008). Taking advantage of the properties and mechanism of action of this drug on S1P₁, we performed slice organotypic cultures of P7 wildtype cerebella incubated for 48 h in the presence or absence of 100 nM FTY720 and then BG morphology was analyzed by immunofluorescence against BLBP. As shown in Fig. 8, FTY720 treatment produced alterations in BG morphology,

including thickening of radial processes and a mild reduction in the complexity of the fine lateral processes, although the morphological changes were not as severe as those found in cultured LPP3 deficient cerebella (Fig. 8A–D). To obtain a chronic effect of the drug through cerebellum development we then treated pups between P3–P14 with FTY720 at a dose used to treat a mouse model of multiple sclerosis (Foster et al., 2009), (0.3 μ g g^{-1} of body weight, daily i.p. injection) and then assessed BG morphology and arrangement, S1P₁ expression and EGC proliferation. In FTY720 treated-animals ($n = 4$), BG radial processes were thicker than in controls along the entire ML while BG soma arrangement was just regionally perturbed (Fig. 8E,F). In folia X, which is one late-developing folia, BG somas were not homogeneously aligned within the PCL. In addition

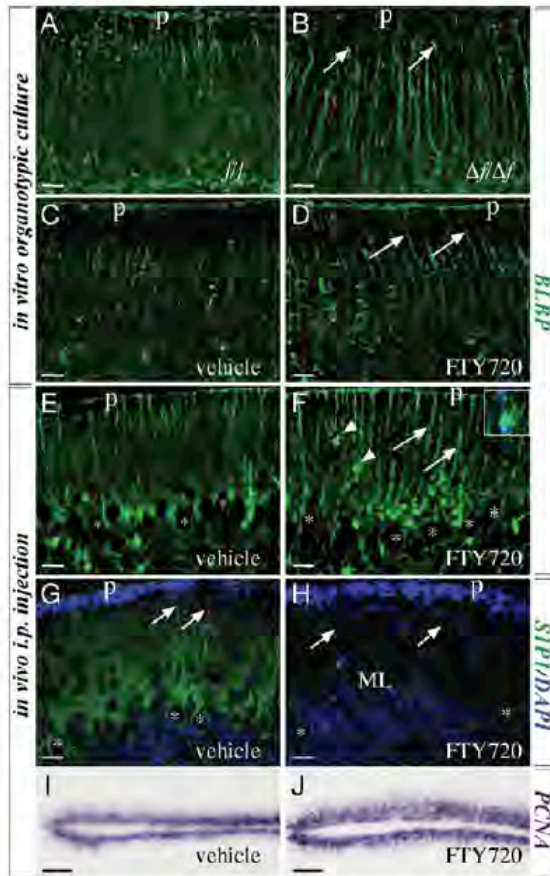


Fig. 8. Treatment with FTY720 partially mimics the BG alterations seen in the neural LPP3 CKO cerebellum. BLBP detected in P7 cerebellum organotypic slice cultures from *+/+* (A) and Δ/Δ (B) cerebellum; note that morphology of BG is very similar to that found in non-cultured tissue, including end-feet that do not reach the pial surface (arrows), thickening of radial processes and reduction of lateral processes complexity. Organotypic culture from wildtype cerebellum sections treated with vehicle (C) or FTY720 (D); note thickening of BLBP-positive BG processes (arrows) in those treated with the drug. A slight decrease in lateral processes complexity is detected. Detection of BLBP (E,F), S1P₁ (G,H) or PCNA (I,J) in P14 cerebellum sections from wildtype animals treated 11 days with vehicle (E,G,I) or FTY720 (F,H,J). (E,F) In FTY720-treated animals, thickening of BG processes (arrows in F), irregular arrangement of BG somas within the PCL and ectopic somas in the ML (arrowheads and inset in F) were found. (G, H) FTY720 treatment causes a strong, although not complete, down-regulation of S1P₁, since some staining was still observed in the ML and in some BG shafts (compare the staining labeled by arrows in G and H). (I, J) The thickness of PCNA-positive (dark purple) intercrural EGL in FTY720 treated animals was larger than in controls. Arrows in G indicate S1P₁-positive BG radial processes. Asterisks in E-H indicate Purkinje cell somas; p; pial surface. Scale bar: A-H, 20 μ m; I-J, 40 μ m.

some ectopic somas were found within the ML of this folia and with less frequency in other folias. BG ectopia was never observed with the same frequency in animals treated with vehicle ($n = 3$) (Fig. 8E,F). The low expressiveness of phenotypes observed could be due to the relatively low dose of drug used and/or the short and late

window of time (in terms of cerebellum development) in which the treatment was applied. We indirectly analyzed the effectiveness of FTY720 treatment through the detection of S1P₁ expression in control and treated cerebellum sections by confocal microscopy under the same optical parameters. S1P₁ expression was reduced by FTY720 treatment although not to the extent found in CKO cerebella (cf. Figs. 3C,D and 9G,H). Furthermore, the regions where a more prominent decrease in S1P₁ expression was observed correlated with folia showing more pronounced alterations. Finally, the thickness of EGL positive to PCNA in the intercrural fissure of treated animals was increased (27%) as occurred in the CKO (Fig. 8I,J), although in a more moderate fashion. Altogether these results strongly suggest that alteration in S1P metabolism/signaling, due to the lack of LPP3 activity in BG cells, contribute to the developmental abnormalities found.

DISCUSSION

Although it has been recently reported an important role for an LPP-related protein, PRG1/LPPR4, in hippocampal excitability (Trimbuch et al., 2009) no information regarding the participation of bona fide LPPs in the function and development of the CNS exists. Abundant *Ppap2b* transcription has been found in neurogenic areas of the rat brain (Suzuki et al., 1999), however the exact identity of the cells that express LPP3 in these regions remains unidentified. Transcriptional profiling studies in human brain showed that *Ppap2b* is within the top 10 genes with highest membership to a group enriched in markers of astrocytes, which in turn have a significant overlap to a group rich in neurogenic markers (Oldham et al., 2008), suggesting that LPP3 is abundantly expressed in a population of astrocytes involved in neurogenic processes. Supporting this notion we found that in developing and adult cerebellum, LPP3 is restricted to BG astrocytes and its precursors, with a highly strong expression found in immature and mature BG (from P0 onwards), which have been found to possess stem cell-like properties (Alcock and Sottile, 2009).

The subcellular distribution of LPP3 in BG was highly specific showing a close resemblance to the distribution of the neurotransmitter transporter Glast, which is involved in fast glutamate removal during synaptic events (Takayasu et al., 2009). This suggested the participation of LPP3 in some aspects of neuroglia communication through the dephosphorylation of extracellular bioactive lipids such as S1P and LPA. Since these lipids lead to a variety of effects in neurons and astrocytes we designed strategies to conditionally inactivate LPP3 gene function in neuroglial lineages.

We demonstrated that lack of LPP3 protein/activity in BG produces an increase in the concentration of S1P and the down-regulation of S1P₁ in adult and developing cerebellum, indicating that LPP3 in BG contributes to the regulation of S1P metabolism and signaling in this

structure *in vivo*. These data, in addition to the expression of S1P synthesizing enzymes in the cerebellum, as well as the described effects of S1P in some cerebellar cell types, suggested that the tight regulation of S1P metabolism/signaling might be relevant for some aspects of cerebellum development and/or physiology.

In this work we characterized the cerebellar alterations produced by the lack of LPP3 expression in the nervous system: (1) appearance of an abnormal lingular-like sulcus with ectopic neurons, in the most rostral domain of the vermis; (2) hypoplasia of folias and reduction or disappearance of fissurae/sulci; and (3) abnormal morphology and arrangement of BG cells. Most of these abnormalities have a developmental origin and could be attributed to changes in cell morphology and/or density of LPP3-positive radial glia as will be discussed immediately after.

In the case of the sulcus with ectopic cells, abnormal development of the velum medullaris can afford for this phenotype. It has been suggested that this structure arises from active proliferation of cells in the VZ and the posterior retraction of the anterior end of the vermis causing the velum to delaminate from the anterior cerebellum and expand (Louvi et al., 2003). On the basis of the expression pattern of LPP3 and the phenotypic analysis of CKO, we propose that in the perinatal cerebella, LPP3-expressing cells in the velum and in the junction between the velum and the anterobasal lobe of the vermis (see Fig. 2) play a fundamental role in controlling the elongation of the velum and proper formation of the glia limitans in this area. In the absence of LPP3, abnormal "contraction/tension" of cells in the velum area folds the anterior end of the vermis and drags some cells, accounting for ectopic neurons found in this area. Alternatively, cells might move farther as a consequence of the loss of a restrictive signal at the MHB imposed by LPP3 or the phenotype might be the consequence of a mild midline fusion defect, but these possibilities have to be tested.

LPP3 deficiency modifies cerebellum foliation in part through alterations in EGC proliferation in a regional and temporal fashion. It is established that proliferation kinetics of EGC is controlled by SHH produced from PC and modulated by several factors (Vaillant and Monard, 2009). Our evidence shows that LPP3 is not obviously expressed in PC or EGC, thus the alteration on EGC proliferation in the CKO should be an indirect consequence of the absence of LPP3 in BG cells. One possibility is that the decrease in BG cell-density affects one of the components that positively regulate SHH signaling in the EGC. This notion is supported by the regional decrease in BG proliferation observed during CKO cerebellum development, which correlates with areas showing a broader decrease in EGC proliferation (i.e., at P4). A close correlation in the spatial-temporal patterns of proliferative activity between these cell types has been also suggested for the rat (Shiga et al., 1983). The possibility that foliation defects are a consequence of the general reduction in size of CKO animals is unlikely, as the change in size does not seem to be a critical factor in

determining the pattern of cerebellar foliation (Millen et al., 1994).

LPP3-deficiency in BG cells reduces their proliferation partly accounting for the decrease in BG density in later stages. Since S1P released by cerebellar astrocytes induces its proliferation (Bassi et al., 2006), it is possible that the accumulation of extracellular S1P caused by the absence of LPP3, induces the desensitization/degradation of S1P receptors that mediate BG proliferation. In support of this notion is the early down-modulation of S1P₁ found in the CKO cerebellum from P4, which correlates with the stage in which more effects on BG proliferation were found (Figs. 7 and Supp. Info. S2).

A great body of evidence supports that alterations in the cytoarchitectonic features of BG cells may produce alterations in EGC migration due to abnormal scaffold formation (Eiraku et al., 2005; Lin et al., 2009; Qu and Smith, 2005; Rakic and Sidman, 1973; Weller et al., 2006). In our LPP3 CKO cerebella, EGC migration is delayed without affecting their differentiation since expression of p27 in the inner EGL is normal. However, cell death of differentiated GC trapped in the EGL and ML was suggested by the increase in TUNEL positive cells found in these areas in CKO cerebella at P15. Thus, foliation defects found in LPP3 deficient cerebella arise from a combination of events, namely, reduction in the amount of EGC due to reduced proliferation, a delay in EGC migration and a late increase in GC death.

Posterior to the migration of BG somas from the ventricular zone through the cerebellar medulla, they arrange in an epithelium-like lining in the PCL. Lack of LPP3 also produces alterations in the arrangement of BG into this layer. This phenotype, aside from changes in the BG cytoarchitecture and delayed EGC migration, has been associated to disrupted activation of the Notch signaling, a pathway involved in intercellular interaction (Eiraku et al., 2005; Komine et al., 2007; Weller et al., 2006). Whether the absence of LPP3 is affecting the interactions between PC and BG through the alteration of the Notch signaling or other mechanism regulating intercellular interaction is an intriguing idea that remains to be analyzed.

As previously highlighted, the broad phenotypic alterations found in the LPP3 CKO cerebellum seemed mainly associated to alterations in the cytoarchitectonic features of BG. S1P-mediated signaling regulates cell adhesion and/or cell shape in glial cells (Mullershausen et al., 2007; Tas and Koschel, 1998) and cerebellar astrocytic proliferation *in vitro* (Bassi et al., 2006). Since LPP3 and S1P₁ are extremely abundant in BG (this work and Nishimura et al., 2010), and that lack of LPP3 increases the availability of S1P and down-regulates S1P₁ in BG, it was possible that most of the abnormalities found in this cell type originated from altered S1P/S1P₁ metabolism/signaling. The similar changes in cell morphology and alterations in soma arrangement found in BG, in addition to the significant reduction in the expression of S1P₁ in our *in vitro* and *in vivo* pharmacological treatments with the S1Preceptor modulator FTY720, strongly supports this hypothesis. The pheno-

typic rescue with the conditional expression in BG of a mutant version of SIP₁ that cannot be internalized in our *Nes-Cre:Ppap2b^{flxed}* background, or the phenocopy of the phenotypes with the conditional ablation of SIP₁ in this particular cell type will ultimately clarify this issue.

Lack of LPP3 in the nervous system also produces a mild motor coordination defect. Establishing whether structural or electrophysiological abnormalities in the cerebellum are responsible for this motor dysfunction will require further investigation. However, it is suggestive that the anterior lobule of the cerebellum, the region that primordially controls the movement of posterior appendages (Manni and Petrosini, 2004), is the most altered in our mice. Alternatively, modifications in lysophospholipid signaling due to the absence of LPP3 could originate electrophysiological alterations that compromise information processing of the cerebellum. For instance, altered SIP-mediated signaling might affect glutamatergic neurotransmission (Sim-Selley et al., 2009). Our neural specific LPP3 knockout constitutes a suitable model to analyze the role of LPP3 and lysophospholipids in BG cell function and cerebellar physiology in general.

Finally, the tight functional connection between LPP3 and the regulation of SIP₁ expression at the plasma membrane is highly significant since the down-regulation of this receptor is the mechanism by which the immunomodulator FTY720 works in the treatment of some autoimmune diseases (Brinkmann, 2009; Nixon, 2009). In this sense, it will be interesting to explore if regulating the expression or activity of LPP3 could also contribute to the treatment of this kind of diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. Massieu, Chagoya, Salceda, and Tapia for reagents and equipment; Drs. Rosenbaum and Sánchez for critical reading of the manuscript; the Microscopy Unit and Animal facility for technical support. A.L.-J and R.S.-S. received a fellowship from CONACyT. This work constitutes a partial fulfillment of A.L.-J to obtain the Ph.D. degree in Biomedical Sciences-PDCB/UNAM.

REFERENCES

- Albers H, Dong A, van Meesteren LA, Egan D, Sunkara M, van Tilburg E, Schuurman K, van Tellingen O, Morris AJ, Smyth SS, et al. 2010. Boronic acid-based inhibitors of the LPA-generating phospholipase, autotaxin, reveal rapid turnover of LPA in the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* (in press).
- Alcock J, Sottile V. 2009. Dynamic distribution and stem cell characteristics of Sox1-expressing cells in the cerebellar cortex. *Cell Res* 19: 1324–1333.
- Anelli V, Bassi R, Tettamanti G, Viani P, Riboni L. 2005. Extracellular release of newly synthesized sphingosine-1-phosphate by cerebellar granule cells and astrocytes. *J Neurochem* 92:1204–1215.
- Bassi R, Anelli V, Giussani P, Tettamanti G, Viani P, Riboni L. 2006. Sphingosine-1-phosphate is released by cerebellar astrocytes in response to bFGF and induces astrocyte proliferation through Gi-protein-coupled receptors. *Glia* 53:621–630.
- Blondeau N, Lai Y, Tyndall S, Popolo M, Topalkara K, Pru JK, Zhang L, Kim H, Liao JK, Ding K, et al. 2007. Distribution of sphingosine kinase activity and mRNA in rodent brain. *J Neurochem* 103:509–517.
- Bordey A, Sontheimer H. 2003. Modulation of glutamatergic transmission by Bergmann glial cells in rat cerebellum in situ. *J Neurophysiol* 89:979–988.
- Brindley DN, Bräuer A. 2009. Lipid mediators and modulators of neural function: Lysophosphatidate and lysolipids. New York: Springer Sciences. pp 289–310.
- Brindley DN, Pilquil C, Sariahmetoglu M, Reue K. 2009. Phosphatidate degradation: Phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1791:956–961.
- Brinkmann V. 2009. FTY720 (fingolimod) in multiple sclerosis: Therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *Br J Pharmacol* 158:1173–1182.
- Chizhikov V, Millen KJ. 2003. Development and malformations of the cerebellum in mice. *Mol Genet Metab* 80:54–65.
- Dennis J, Nogaroli L, Fuss B. 2005. Phosphodiesterase-1alpha/autotaxin (PD-1alpha/ATX): A multifunctional protein involved in central nervous system development and disease. *J Neurosci Res* 82:737–742.
- Eiraku M, Tohgo A, Ono K, Kaneko M, Fujishima K, Hirano T, Kengaku M. 2005. DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci* 8:873–880.
- Escalante-Alcalde D, Hernandez L, Le Stunff H, Maeda R, Lee HS Jr, Gang C, Sciorra VA, Daar I, Spiegel S, Morris AJ, et al. 2003. The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development* 130:4623–4637.
- Escalante-Alcalde D, Morales SL, Stewart CL. 2009. Generation of a reporter-null allele of *Ppap2b/Lpp3* and its expression during embryogenesis. *Int J Dev Biol* 53:139–147.
- Escalante-Alcalde D, Sanchez-Sanchez R, Stewart CL. 2007. Generation of a conditional *Ppap2b/Lpp3* null allele. *Genesis* 45:465–469.
- Estivill-Torres G, Liebrez-Zayas P, Matas-Rico E, Santin L, Pedraza C, De Diego I, Del Arco I, Fernandez-Liebrez P, Chun J, De Fonseca FR. 2008. Absence of LPA1 signaling results in defective cortical development. *Cereb Cortex* 18:938–950.
- Foster CA, Howard LM, Schweitzer A, Persohn E, Hiestand PC, Balatoni B, Reuschel R, Beerli C, Schwartz K, Billich A. 2007. Brain penetration of the oral immunomodulatory drug FTY720 and its phosphorylation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: Consequences for mode of action in multiple sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* 323:469–475.
- Foster CA, Mechtcheriakova D, Storch MK, Balatoni B, Howard LM, Bornancin F, Wlachs A, Sobanov J, Kinnunen A, Baumrucker T. 2009. FTY720 rescue therapy in the dark agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis: Expression of central nervous system genes and reversal of blood-brain-barrier damage. *Brain Pathol* 19:254–266.
- Fukushima N, Weiner JA, Chun J. 2000. Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Dev Biol* 228:6–18.
- Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Contos JJ, Rehen SK, Kingsbury MA, Kim KY, Chun J. 2002. Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. *Mol Cell Neurosci* 20:271–282.
- Fyrst H, Saba JD. 2008. Sphingosine-1-phosphate lyase in development and disease: Sphingolipid metabolism takes flight. *Biochim Biophys Acta* 1781:448–458.
- Giussani P, Ferrareto A, Gravaghi C, Bassi R, Tettamanti G, Riboni L, Viani P. 2007. Sphingosine-1-phosphate and calcium signaling in cerebellar astrocytes and differentiated granule cells. *Neurochem Res* 32:27–37.
- Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A. 2002. Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res* 68:138–149.
- Holtsberg FW, Steiner MR, Furukawa K, Keller JN, Mattson MP, Steiner SM. 1997. Lysophosphatidic acid induces a sustained elevation of neuronal intracellular calcium. *J Neurochem* 69:68–75.
- Huang H, Bordey A. 2004. Glial glutamate transporters limit spillover activation of presynaptic NMDA receptors and influence synaptic inhibition of Purkinje neurons. *J Neurosci* 24:5659–5669.
- Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y. 2007. Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells* 25: 115–124.
- Kingsbury MA, Rehen SK, Contos JJ, Higgins CM, Chun J. 2003. Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nat Neurosci* 6:1292–1299.
- Koirala S, Corfas G. 2010. Identification of novel glial genes by single-cell transcriptional profiling of Bergmann glial cells from mouse cerebellum. *PLoS One* 5:e9198.

- Komine O, Nagaoka M, Watase K, Gutmann DH, Tanigaki K, Honjo T, Radtke F, Saibo T, Chiba S, Tanaka K. 2007. The monolayer formation of Bergmann glial cells is regulated by Notch/RBP-J signaling. *Dev Biol* 311:238–250.
- Lin Y, Chen L, Lin C, Luo Y, Tsai RY, Wang F. 2009. Neuron-derived FGF9 is essential for scaffold formation of Bergmann radial fibers and migration of granule neurons in the cerebellum. *Dev Biol* 329:44–54.
- Louvi A, Alexandre P, Metin C, Wurst W, Wassef M. 2003. The isthmus neuroepithelium is essential for cerebellar midline fusion. *Development* 130:5319–5330.
- MacLennan AJ, Carney PR, Zhu WJ, Chaves AH, Garcia J, Grimes JR, Anderson KJ, Roper SN, Lee N. 2001. An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur J Neurosci* 14:203–209.
- Manni E, Petrosini L. 2004. A century of cerebellar somatotopy: A debated representation. *Nat Rev Neurosci* 5:241–249.
- Mathews TP, Kennedy AJ, Kharel Y, Kennedy PC, Nicora O, Sunkara M, Morris AJ, Wamhoff BR, Lynch KR, Macdonald TL. 2010. Discovery, biological evaluation, and structure-activity relationship of amide based sphingosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 53:2766–2778.
- Millen KJ, Wurst W, Herrup K, Joyner AL. 1994. Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development* 120:695–706.
- Milstien S, Gude D, Spiegel S. 2007. Sphingosine 1-phosphate in neural signalling and function. *Acta Paediatr Suppl* 96:40–43.
- Miriyala S, Subramanian T, Panchacharam M, Ren H, McDermott MI, Sunkara M, Dremnan T, Smyth SS, Spielmann HP, Morris AJ. 2010. Functional characterization of the atypical integral membrane lipid phosphatase PDP1/PPAPDC2 identifies a pathway for interconversion of isoprenols and isoprenoid phosphates in mammalian cells. *J Biol Chem* 285:13918–13929.
- Miron VE, Schubart A, Antel JP. 2008. Central nervous system-directed effects of FTY720 (fingolimod). *J Neurol Sci* 274:13–17.
- Miyake T, Fujiwara T, Fukunaga T, Takemura K, Kitamura T. 1995. Glial cell lineage in vivo in the mouse cerebellum. *Dev Growth Differ* 7:273–285.
- Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. 2005. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol* 25:11113–11121.
- Mullershausen F, Craveiro LM, Shin Y, Cortes-Cros M, Bassilana F, Osinde M, Wishart WL, Guerini D, Thallmair M, Schwab ME, et al. 2007. Phosphorylated FTY720 promotes astrocyte migration through sphingosine-1-phosphate receptors. *J Neurochem* 102:1151–1161.
- Nishimura H, Akiyama T, Irei I, Hamazaki S, Sadahira Y. 2010. Cellular localization of sphingosine-1-phosphate receptor 1 expression in the human central nervous system. *J Histochem Cytochem* 58:847–856.
- Nixon GF. 2009. Sphingolipids in inflammation: Pathological implications and potential therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 158:982–993.
- Oldham MC, Konopka K, Iwamoto K, Langfelder P, Kato T, Horvath S, Geschwind DH. 2008. Functional organization of the transcriptome in human brain. *Nat Neurosci* 11:1271–1282.
- Postma FR, Jalink K, Hengeveld T, Moolenaar WH. 1996. Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: Action through a specific cell surface receptor. *EMBO J* 15:2388–2392.
- Qu Q, Smith FI. 2005. Neuronal migration defects in cerebellum of the *Largemyd* mouse are associated with disruptions in Bergmann glia organization and delayed migration of granule neurons. *Cerebellum* 4:261–270.
- Rakic P. 1971. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macaca Rhesus*. *J Comp Neurol* 141:283–312.
- Rakic P, Sidman RL. 1973. Weaver mutant mouse cerebellum: Defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:240–244.
- Sato K, Tomura H, Igarashi Y, Ui M, Okajima F. 1997. Exogenous sphingosine 1-phosphate induces neurite retraction possibly through a cell surface receptor in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 240:329–334.
- Shano S, Moriyama R, Chun J, Fukushima N. 2008. Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1. *Neurochem Int* 52:216–220.
- Shiga T, Ichikawa M, Hirata Y. 1983. Spatial and temporal pattern of postnatal proliferation of Bergmann glial cells in rat cerebellum: An autoradiographic study. *Anat Embryol (Berl)* 167:203–211.
- Sim-Selley LJ, Goforth PB, Mba MU, Macdonald TL, Lynch KR, Milstien S, Spiegel S, Satin LS, Welch SP, Selley DE. 2009. Sphingosine-1-phosphate receptors mediate neuromodulatory functions in the CNS. *J Neurochem* 110:1191–1202.
- Su W, Yeku O, Olepu S, Genna A, Park JS, Ren H, Du G, Gelb MH, Morris AJ, Frohman MA. 2009. 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorocholeamide (FIP1), a phospholipase D pharmacological inhibitor that alters cell spreading and inhibits chemotaxis. *Mol Pharmacol* 75:437–446.
- Suzuki R, Sakagami H, Owada Y, Handa Y, Kondo H. 1999. Localization of mRNA for Dri 42, subtype 2b of phosphatidic acid phosphatase, in the rat brain during development. *Brain Res Mol Brain Res* 66:195–199.
- Takayasu Y, Iino M, Takatsuru Y, Tanaka K, Ozawa S. 2009. Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell synapses. *Acta Physiol (Oxf)* 197:1–12.
- Tas PW, Koschel K. 1998. Sphingosine-1-phosphate induces a Ca²⁺ signal in primary rat astrocytes and a Ca²⁺ signal and shape changes in C6 rat glioma cells. *J Neurosci Res* 52:427–434.
- Terada N, Banno Y, Ohno N, Fujii Y, Murate T, Sarna JR, Hawkes R, Zea Z, Baba T, Ohno S. 2004. Compartmentation of the mouse cerebellar cortex by sphingosine kinase. *J Comp Neurol* 469:119–127.
- Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, Breustedt J, Schuelke M, Streu N, Kieselmann O, et al. 2009. Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell* 138:1222–1235.
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G. 1999. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23:99–103.
- Vaillant C, Monard D. 2009. SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum* 8:291–301.
- van Meesteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, et al. 2006. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 26:5015–5022.
- Weller M, Krautler N, Mantei N, Suter U, Taylor V. 2006. Jagged1 ablation results in cerebellar granule cell migration defects and depletion of Bergmann glia. *Dev Neurosci* 28:70–80.
- Yacubova E, Komuro H. 2002. Intrinsic program for migration of cerebellar granule cells in vitro. *J Neurosci* 22:5966–5981.
- Yamada K, Fukaya M, Shibata T, Kurihara H, Tanaka K, Inoue Y, Watanabe M. 2000. Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells. *J Comp Neurol* 418:106–120.
- Yamada K, Watanabe M. 2002. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int* 77:94–108.
- Yuasa S. 1996. Bergmann glial development in the mouse cerebellum as revealed by tenascin expression. *Anat Embryol (Berl)* 194:223–234.

Receptores y transportadores en la glía de Bergmann: posibles funciones en la fisiología del cerebelo

A. López-Juárez

RECEPTORES Y TRANSPORTADORES EN LA GLÍA DE BERGMANN: POSIBLES FUNCIONES EN LA FISIOLOGÍA DEL CEREBELO

Resumen. Introducción. La glía de Bergmann es un tipo de astrocito especializado de la corteza del cerebelo de los vertebrados. Por su localización y morfología, este tipo de célula glial se relaciona estrechamente con las sinapsis que establece la célula de Purkinje, la cual es la neurona encargada de integrar las diferentes señales de la corteza del cerebelo y emitir la única respuesta de este sistema. Desarrollo y conclusiones. En la presente revisión se hace una descripción de los transportadores y de los receptores presentes en la membrana de la glía de Bergmann, que interactúan con los principales neurotransmisores del sistema nervioso central, el glutamato y el ácido gamma-aminobutírico (GABA). La actividad de estas proteínas se analiza con un enfoque sobre su posible repercusión en la regulación de la actividad sináptica de la célula de Purkinje. [REV NEUROL 2008; 47: 527-35]

Palabras clave. Astrocitos. Cerebelo. Glía de Bergmann. Receptores de GABA. Receptores de glutamato. Transportadores de GABA. Transportadores de glutamato.

INTRODUCCIÓN

La glía de Bergmann (GB) es el tipo de célula glial más abundante en la corteza del cerebelo de los vertebrados adultos y se la considera como un tipo de astrocito especializado. Respecto a su función como astrocito, se ha constatado que la GB expresa proteínas que intervienen en el acoplamiento metabólico con las neuronas, como el transportador de monocarboxilatos 4 [1]. Además, este tipo de célula glial participa en la remoción de neurotransmisores liberados en las sinapsis y presenta un incremento en la expresión de la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) en respuesta al daño inducido por cainato o metilazoximetanol [2,3]. Este último proceso se asocia comúnmente al estado reactivo de los astrocitos. Debido a que la GB interactúa con los neurotransmisores del sistema nervioso a través de transportadores y receptores, se ha intensificado la investigación sobre esta célula como elemento partícipe de la comunicación en el sistema nervioso. El presente trabajo se enfoca a revisar las características de los transportadores y receptores de glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA) de la membrana de la GB.

ORIGEN Y DESTINO DE LA GLÍA DE BERGMANN

Se ha propuesto que los precursores de la GB son células neuroepiteliales de la capa germinativa del cuarto ventrículo que migran hasta colocarse en la corteza del cerebelo. Por análisis clonal, se describió que estos precursores son distintos a los de los

oligodendrocitos y pueden o no ser distintos a los de los astrocitos de la sustancia blanca del cerebelo [4]. La presencia de células morfológicamente identificadas como GB inmaduras se ha observado desde estadios del desarrollo tan tempranos como los días embrionarios 15 y 17 en ratones y ratas, respectivamente [5]. Desde este punto y hasta su estado maduro, la GB cursa una serie de cambios citológicos que han llevado a comparar su diferenciación con un proceso de metamorfosis, relacionado además con funciones específicas que dependen del estado de desarrollo del cerebelo. La diferenciación de la GB está influida por las neuronas del cerebelo, como es el caso del establecimiento de su morfología radial, promovida por las células granulares [6], con lo cual se establece el andamio por el que estas últimas migran desde la capa granular externa hasta la capa granular interna [7]. De manera similar, señales de las células de Purkinje (CP) promueven la extensión de procesos laterales a partir de las ramas principales de la GB, con lo que es posible constituir la envoltura glial de las sinapsis que establecen las CP con otras neuronas del cerebelo [8].

Diversas moléculas tienen la capacidad de regular la diferenciación de la GB. Por citar algunos ejemplos, la señalización inducida por la activación del receptor Notch [9] y por la proteína β_1 integrina [10], promueven la extensión de procesos y el anclaje de su pie terminal a la superficie pial. La proteína DNER, expresada en la membrana de la CP, se une al receptor Notch1 en la GB a través de contactos célula-célula, con lo que activa vías no canónicas de Notch e induce la extensión de procesos de la GB [11]. En otros estudios se ha demostrado que la señalización inducida por el factor *sonic hedgehog*, producido por la CP, puede regular positivamente la migración, diferenciación y densidad de la GB [12], en tanto que la señalización inducida por moléculas como la fosfatasa PTEN [13] o el receptor Notch2 [14] regulan negativamente la diferenciación de la GB.

Debido a que la GB no cursa la llamada 'transformación astrocítica' después de la migración neuronal, como normalmente lo hace la glía radial del cerebro en desarrollo, en el cerebelo maduro la GB sigue siendo morfológicamente comparable a la glía radial. De hecho, la GB madura del cerebelo de ratones de 8 semanas, expresa marcadores celulares asociados a la glía ra-

Aceptado tras revisión externa: 29.09.08.

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México DF, México.

Correspondencia: Dr. Alejandro López Juárez. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Lab. AL-103. Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. UNAM. Ciudad Universitaria. Circuito Exterior, s/n. CP 04510. México DF, México. E-mail: aleloju@ifc.unam.mx

Trabajo financiado con la beca de doctorado CONACyT 195334.

Agradecimientos. A las doctoras L. Massieu, D. Escalante-Alcalde y E. López-Bayghen, por la asesoría y revisión meticulosa del manuscrito.

© 2008, REVISTA DE NEUROLOGÍA

dial, así como a células madre neuronales, tales como S100b, GFAP, Sox1, Sox2 y Sox9 [15]. Cabe señalar que los genes de la familia Sox antes mencionados intervienen en la neurogénesis embrionaria y también del adulto, por lo que se ha propuesto que la GB es un tipo de célula madre en potencia del organismo adulto [16]. A este respecto, diversos autores han señalado la posibilidad de desarrollar estrategias de reemplazo neuronal para los cerebros que así lo requieran [17].

CONTEXTO CELULAR DE LA GLÍA DE BERGMANN

En su estado maduro, el soma de la GB se encuentra en la capa de CP y sus procesos se proyectan desde este punto hasta la superficie pial, atravesando completamente la capa molecular del cerebelo. Por su localización y morfología, la GB tiene una estrecha relación con las CP, hasta el punto de que sus procesos involucran casi la totalidad de las sinapsis inhibitorias y excitadoras que la CP establece con otras neuronas del cerebelo [18,19]. Se ha calculado que existen ocho GB por cada CP, y que los procesos de una sola de estas células gliales pueden envolver entre 2.142 y 6.358 sinapsis de la capa molecular [20]. Además, se ha descrito que el espacio extracelular que se encuentra entre los elementos presinápticos y la GB adyacente puede ser aún más estrecho que el encontrado en el botón sináptico mismo, por un factor de 1,9 veces [21].

Pakhotin y Verkhratsky [22], que pusieron de manifiesto la relación física más estrecha entre la GB y las CP, describieron un acoplamiento eléctrico entre la GB y la CP en rebanadas de cerebelo de ratas adultas, manifestado por corrientes generadas en alguna de las células cuando la otra era despolarizada o hiperpolarizada. Dichas corrientes son dependientes de uniones *gap*, lo cual se comprobó al abatir completamente las corrientes con los inhibidores octanol y halotano. Además, estas uniones intercomunicantes permiten la difusión de colorantes entre la GB y la CP. Estos autores propusieron que dichas uniones pueden participar en el procesamiento de la información en el cerebro. Aunque el acoplamiento eléctrico entre neuronas y células gliales se ha descrito en otras regiones del cerebro [23], la función de dichas estructuras de unión aún es objeto de controversia.

Debido a que las CP integran las diferentes señales generadas en la corteza del cerebelo, la GB se convierte en un elemento clave para la salida de información del cerebelo y con potencial para regular la comunicación en este sistema. Como se ha citado, la GB cuenta con estructuras de interacción directa con las CP; sin embargo, otro tipo de proteínas en la membrana de la GB, como los transportadores y los receptores de neurotransmisores, se han estudiado desde hace tiempo y han sentado las bases para proponer que la GB tienen una función reguladora de la actividad sináptica.

TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO DE LA GLÍA DE BERGMANN

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados. Los astrocitos contienen en su citoplasma 2-3 mM de glutamato, mientras que las neuronas presentan más de 5 mM. Esta diferencia de concentraciones radica en la presencia de la enzima glutamina sintetasa en los astrocitos, que convierte el glutamato en glutamina, la cual es liberada al medio extracelular para incorporarse a las neuronas. Aunque la determinación de la concentración del

glutamato extracelular tiene dificultades técnicas por lo estrecho del espacio entre las células, generalmente se acepta que la concentración extracelular de glutamato es de 1-2 μ M [24]. Las bajas concentraciones de glutamato extracelular se mantienen aun después de la transmisión sináptica gracias a la actividad de transportadores de glutamato en la membrana celular de neuronas y astrocitos.

En el SNC se han clonado cinco tipos de transportadores de glutamato, GLAST/EAAT1, GLT-1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 y EAAT5, los cuales tienen especificidad neuronal o glial [25]. En la membrana de la GB, se ha descrito la presencia de los transportadores GLT1 y GLAST [26,27]. Estos transportadores utilizan el potencial de membrana y los gradientes de concentración de los iones Na^+ y K^+ para acumular glutamato en la célula. Así, por cada molécula de glutamato⁻ que entra en la célula, ingresan tres Na^+ y un H^+ , mientras que un K^+ abandona la célula. Por lo tanto, dos cargas positivas provocan que el transporte de glutamato tenga un efecto electrogénico en la célula [28]. De esta manera, el glutamato produce en la GB corrientes entrantes sensibles en un 70% a bloqueadores del transporte de glutamato [21,29,30].

En la corteza del cerebelo, las CP establecen sinapsis glutamatérgicas con las fibras paralelas (axones de las células granulares) y con las fibras trepadoras (axones con origen en la oliva inferior). Las sinapsis más abundantes del cerebelo, y de hecho de todo el cerebro, son las que se establecen entre las fibras paralelas y las dendritas de la CP, por lo que el cerebelo es un sistema donde predominan las señales excitadoras. Las sinapsis de las CP se encuentran recubiertas por los procesos de la GB, los cuales limitan la difusión del glutamato por medio de la actividad de sus transportadores, manteniendo así bajas concentraciones extracelulares de glutamato. Esto es importante debido a que las CP son susceptibles a la excitotoxicidad ocasionada por la excesiva estimulación de sus receptores glutamatérgicos [31]. A este respecto, se ha descrito que la función de la GB es importante para mantener un adecuado funcionamiento del cerebelo, ya que la ablación de la GB en ratones adultos y la consecuente ausencia de los transportadores GLAST y GLT1 ocasionan una coordinación motora deficiente, producto de la degeneración de las neuronas de la corteza del cerebelo [32]. Además, la inhibición de la síntesis de los transportadores GLAST y GLT1 in vivo a través de la administración de oligonucleótidos antisentido eleva las concentraciones extracelulares de glutamato y da lugar a neurodegeneración por excitotoxicidad y parálisis progresiva [33]. Estos estudios sugieren que una función esencial de la GB es mantener concentraciones de glutamato no tóxicas para las neuronas. Otros trabajos han establecido que el transporte de glutamato llevado a cabo por la GB limita la difusión del glutamato para impedir una estimulación inespecífica de sinapsis vecinas y regular las corrientes generadas en la CP.

La influencia sobre las sinapsis de la CP del transporte de glutamato llevado a cabo por la GB ha sido objeto de diferentes estudios con rebanadas de cerebelo de ratas de 9 a 22 días. Utilizando la técnica de doble *patch clamp* GB-CP, Bordey y Sontheimer demostraron que la inhibición biofísica de la captura de glutamato de una célula de GB, por la inducción de corrientes despolarizantes que modifican el potencial de membrana del que depende el transporte de glutamato, produce un incremento reversible en la frecuencia de las corrientes excitadoras postsinápticas espontáneas de la CP adyacente [30]. Debido a que la amplitud de las corrientes permaneció sin cambio, se propuso

que el efecto se debe a una modulación presináptica. Por otro lado, se demostró que la inhibición farmacológica selectiva de los transportadores de glutamato de la GB, realizada con bloqueadores administrados vía pipeta de patch a la GB, produce un aumento en la frecuencia de las corrientes inhibitorias postsinápticas miniatura de las CP cercanas a la GB en cuestión [34]. En este estudio se propuso que la modulación se debe a la activación de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) de las neuronas gabérgicas que establecen sinapsis con la CP. Estos estudios sugieren que los transportadores de glutamato de la GB limitan la difusión del glutamato hacia sitios clave para la activación de las sinapsis excitadoras e inhibitorias de la CP.

Estas y otras investigaciones ofrecen evidencias de que el transporte de glutamato llevado a cabo por la GB es importante para evitar la excitotoxicidad neuronal, así como para modular la actividad sináptica de las CP; sin embargo, esto sólo se ha demostrado en condiciones experimentales de inhibición del transporte de glutamato o de modificación de las propiedades de la GB. Por tal motivo, otro campo de investigación importante, referente a la actividad de transporte de glutamato, es el de los factores que pueden influir en la actividad de transporte de la GB *in situ*.

La expresión y actividad de los transportadores de glutamato puede regularse. Esto se ha demostrado en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson, así como en respuesta a diferentes compuestos naturales y sintéticos *in vitro* [35]. Además, se ha propuesto que defectos en la estructura de estos transportadores y la consiguiente alteración de su función podrían conducir a trastornos patológicos que se presentan en la epilepsia [36]. Se ha descrito que, en cultivos de GB, el glutamato y sus análogos, el cainato y el AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico), pueden regular de manera negativa la actividad de transporte de glutamato [37]. Debido a que en la GB el nivel de expresión del transportador GLAST es seis veces mayor que el de GLT1 [38], se ha propuesto que la modulación del transporte de glutamato se lleva a cabo principalmente por este transportador y, por lo tanto, se ha intensificado su investigación a nivel molecular. Ensayos con genes indicadores dirigidos por el promotor transcripcional de GLAST han mostrado, en cultivos primarios de GB de pollo, que el glutamato puede dar lugar a un decremento en la transcripción y la actividad del transportador GLAST [37,39,40]. Puesto que el glutamato puede regular la actividad de su transporte en la GB y que la regulación del transporte de glutamato puede modular la actividad sináptica de la CP, se ha propuesto que la GB participa en la plasticidad dependiente de actividad sináptica [41].

Sin embargo, la función del GLAST como principal transportador de la GB se ha cuestionado en estudios con ratones deficientes de la actividad de GLAST ($-/-$), los cuales mostraron un desarrollo normal y sólo una ligera deficiencia en la coordinación motora [42]. Además, la cinética de las corrientes excitadoras postsinápticas de las CP mediadas por las fibras trepadoras no es diferente en los ratones GLAST ($-/-$) a la de los animales silvestres [43], por lo que se sugirió que la actividad de GLAST era menor que la de GLT1. Recientemente, Takatsuru et al compararon la cinética de las corrientes excitadoras postsinápticas de ratones silvestres con la de los carentes de la actividad de GLT1 ($-/-$) y de GLAST ($-/-$) en presencia de ciclotiacida, la cual atenúa la desensibilización de los receptores glutamatergicos de AMPA, y demostraron que el tiempo de decaimiento de las corrientes medidas en la CP es más prolongado en los ratones GLAST ($-/-$) que en los GLT1 ($-/-$) y en éstos más que en los silvestres [44]. Por otro lado, los picos de las corrientes generadas por transportadores en la GB por el estímulo de las fibras trepadoras son menores en los ratones GLAST ($-/-$) que en los GLT1 ($-/-$) y en éstos menos que en los silvestres. Como se mencionó anteriormente, la inactividad de GLAST causa una ligera deficiencia en la coordinación motora, mientras que la inactividad de GLT1 da lugar a convulsiones y una mayor susceptibilidad al daño cortical [45]. Sin embargo, cuando se inactivan ambos transportadores, los animales mueren antes del nacimiento [46]. Estos datos llevaron a proponer que el GLT1 es capaz de compensar la ausencia de GLAST en los animales modificados GLAST ($-/-$) [44].

Hay funciones de los transportadores de glutamato descritas para otros tipos de células gliales que no se han explorado en la GB. Utilizando cultivos de astrocitos, se ha observado que el transporte de glutamato podría estar ligado a la señalización por cinasas activadas por mitógenos (MAPK) [47], y que puede inducir la actividad y la expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ y del mismo transportador GLAST [48]. Se ha descrito que los astrocitos liberan glutamato por diversas vías, una de ellas puede ser la actividad 'inversa' de los transportadores de glutamato gliales, lo que se conoce como 'liberación no vesicular de glutamato' [49]. Por último, se ha propuesto que la entrada de Na^+ a través de los transportadores de glutamato constituye una señal para la captura de glucosa y la liberación de lactato por las células gliales, elemento fundamental en el acoplamiento metabólico glía-neurona [50].

La modulación de la actividad de transporte de glutamato de la GB podría repercutir en diferentes planos sobre el procesamiento de la información en el cerebelo; sin embargo, hacen falta técnicas con las que se integren las investigaciones *in vitro* e *in situ* hasta hoy realizadas. Lo anterior es importante para delimitar las funciones de los transportadores de glutamato de la GB.

TRANSPORTADORES DE GABA DE LA GLÍA DE BERGMANN

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio más importante del SNC y se sintetiza en las neuronas gabérgicas a partir del glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) con mayor o menor participación del cofactor fosfato de piridoxal [51]. Las células gliales no producen GABA, ya que carecen de GAD, por lo que la presencia temporal del GABA en estas células es producto del influjo mediado por transportadores. Como sucede con el glutamato, las concentraciones extracelulares de GABA se regulan por transportadores en la membrana de neuronas y células gliales. Los transportadores de GABA retiran el GABA liberado en las sinapsis y éste se recicla en la presinapsis. En la glía, el GABA también puede convertirse en succinato semialdehído por la enzima GABA-transaminasa e incorporarse posteriormente al ciclo de Krebs en forma de succinato. La estequiometría del transporte de GABA es de un GABA, dos Na^+ y un Cl^- , lo cual genera una carga positiva neta por cada molécula de GABA transportada a la célula. En la actualidad se han identificado cuatro transportadores de GABA de alta afinidad (GAT1-3, BGT) con distinta farmacología, estructura y distribución [52]. La expresión de GAT1 es preferentemente neuronal y la de GAT2-3 es preferentemente glial [53]. Así, la distri-

bución del ARNm de GAT1 se asemeja al patrón de expresión de la GAD de 67 kDa (GAD67) en las neuronas. Sin embargo, en el cerebelo, las CP que expresan el ARNm de GAD67, no presentan el ARNm de GAT1 [54]. En cambio, en la GB, inmunopositiva a GFAP, sí se detectan niveles altos del ARNm de GAT1 [54,55]. La presencia de GAT1 en los procesos de la GB que rodean sinapsis gabérgicas se ha corroborado en estudios inmunohistoquímicos [56] y electrofisiológicos [57].

La señalización gabérgica en la corteza del cerebelo está compuesta por circuitos de interneuronas que establecen sinapsis con las CP. La sinapsis gabérgica más importante del cerebelo es la que se ubica entre las células en cesta y el soma de las CP. Otro tipo de neurona gabérgica, la célula estrellada, establece sinapsis con las dendritas de las CP. Se ha propuesto que la señalización gabérgica del cerebelo tiene una función esencialmente reguladora de la prominente excitabilidad producida por el glutamato sobre la CP.

La presencia de GAT1 en la GB parece compensar su ausencia en la CP. Esta peculiar distribución del transportador GAT1 sugiere una participación más estrecha de la GB en las sinapsis gabérgicas del cerebelo. Estudios electrofisiológicos en rebanadas de cerebelo de rata demostraron que, en presencia de bloqueadores de los receptores de GABA, éste produce corrientes entrantes en la GB, sensibles a la eliminación del Na⁺ externo y a los bloqueadores de GAT1 [57]. Lo anterior indica que los transportadores GAT1 de la GB son funcionales al mediar el flujo de GABA. Sin embargo, no hay información acerca de las repercusiones que pudiera tener la modulación del transporte de GABA de la GB sobre la actividad sináptica de la CP.

Barakat y Bordey describieron que la inyección intracelular de GABA a la GB produce un flujo de este neurotransmisor hacia el exterior de la célula a través del transportador GAT1 y que la acumulación del GABA liberado al espacio extracelular activa receptores de GABA en la misma GB, aunque no se describió efecto alguno sobre la CP [57]. Exceptuando este trabajo, en la GB no se ha descrito ningún tipo de regulación de la actividad de GAT1 que pudiera modificar la concentración del GABA extracelular; sin embargo, el transporte de GABA puede regularse positivamente en cultivos de astrocitos corticales por la adrenalina [58] o en astrocitos de cerebelo por la proteína de inducción del transporte de GABA (GABA-CIP), liberada por las células granulares [59]. Además, se ha descrito una regulación negativa de la captura de GABA *in vivo* por serotonina, en endimiocitos del órgano subcomisural [60]. En las neuronas, la actividad de transporte de GABA puede estar regulada por el mismo GABA [61].

De manera general, la atenuación del transporte de GABA puede prolongar los efectos inhibitorios de este neurotransmisor y modificar el balance excitación-inhibición del que depende de la generación de señales en el cerebro. A este respecto, Kaner propuso que los inhibidores del transporte de GABA podrían constituir una clase de fármacos antiepilépticos [62]. Cabe la posibilidad de que, en el cerebelo, dada la cercanía de la GB a las sinapsis inhibitorias de la CP [19], una regulación del transporte de GABA en la GB afectara a la concentración extracelular de GABA y, por lo tanto, a su efecto inhibitorio sobre la CP.

Como se puede apreciar, la investigación referente al transporte de GABA llevado a cabo por la GB es un campo poco explorado, pero con posibles implicaciones sobre la fisiología del cerebelo.

RECEPTORES DE NEUROTRANSMISORES EN LA GLÍA DE BERGMANN

Aunque las células gliales no pueden generar un potencial de acción como lo hacen las neuronas, es interesante que algunos tipos de células gliales expresen canales iónicos y receptores de neurotransmisores. La GB expresa receptores glutamatérgicos (GluR) [63,64] y gabérgicos [19,65], los cuales, por su cercanía a la CP, podrían activarse durante la transmisión sináptica. La presencia de receptores en la GB podría representar una función adicional a las previamente descritas, como la capacidad de percibir la comunicación entre neuronas para posteriormente generar una respuesta. Debido a que un cambio en el potencial de membrana de la GB, producido por la activación de sus receptores, no puede desencadenar un potencial de acción como el que se produce en las neuronas, han sido los efectos a largo plazo los que han ayudado a proponer algunas funciones de los receptores de neurotransmisores de la GB. Así pues, la activación de los receptores de la GB puede a su vez activar segundos mensajeros y conducir a la modificación de proteínas preexistentes o a la regulación de la tasa de expresión de nuevas proteínas. Esto es importante, ya que el repertorio de proteínas y su nivel de actividad podrían afectar la interacción de la GB con las neuronas del cerebelo [66].

RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS EN LA GLÍA DE BERGMANN

Los receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluR) son la vía principal de la neurotransmisión excitadora en el cerebro. Los iGluR son canales iónicos activados por ligando permeables a cationes, y su clasificación se basa en su afinidad a diferentes análogos del glutamato como el NMDA, el AMPA y el cainato. Estos receptores son heterómeros compuestos por subunidades codificadas por diferentes familias de genes definidas por homología de secuencias; una para los receptores de AMPA (GluR1-4) dos para los receptores de cainato (GluR5-7, KA1-2) y tres para los de NMDA (NR1, NR2A-D, y NR3) [67]. La permeabilidad iónica de los iGluR depende de las subunidades que conforman al receptor. Por ejemplo, los receptores de AMPA que carecen de la subunidad GluR2, son permeables al flujo de Ca²⁺, mientras que los que presentan esta subunidad son impermeables a Ca²⁺ [68].

Se pensaba que la expresión de GluR era exclusiva de las neuronas, pero ahora sabemos que también se expresan en diversos tipos de células gliales. En la GB se ha constatado la presencia de las subunidades GluR1 y GluR4, pero no la de GluR2; por lo tanto, los receptores de AMPA expresados en la GB son permeables a Ca²⁺ [69]. Por otro lado, se ha descrito la presencia de la proteína y el ARNm de la subunidad NR2B de los receptores de NMDA en la GB de cortes de cerebelo de rata [70] y en cultivos de GB de pollo [71].

Algunos estudios han evaluado las funciones y los mecanismos de activación de los iGluR en la GB. Se ha comprobado que estos receptores pueden activarse por la aplicación directa de glutamato y sus análogos [72,73] o por la estimulación de fibras paralelas y musgosas en rebanadas de cerebelo [21,29,74,75]. Como se indicó anteriormente, la actividad de los transportadores de glutamato conduce a la generación del 70% de la corriente generada por el glutamato en la GB. El resto de la corriente es sensible al bloqueo de los iGluR con antagonistas como la 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) y, por

lo tanto, mediada por receptores de AMPA y cainato [21,29,73]. Müller et al demostraron que la aplicación de cainato a rebanadas de cerebelo de ratón produce curvas de corriente-voltaje de tipo sigmoideo e incremento del Ca^{2+} intracelular de la GB, observado a través de fluoróforos de Ca^{2+} . Estas respuestas son sensibles a antagonistas de los receptores de AMPA y a las concentraciones bajas de Ca^{2+} extracelular [73]. La aplicación de glutamato a las rebanadas de cerebelo de ratón ocasiona, además, un lento incremento del Ca^{2+} citoplasmático de la GB, en respuesta a la liberación de depósitos intracelulares [72].

Aunque la presencia de receptores de NMDA en la GB se ha puesto en duda por la ausencia de componentes de corriente sensibles a los antagonistas de dichos receptores cuando se estimulan las fibras paralelas [29], Muller et al describieron que la aplicación directa de NMDA a rebanadas de cerebelo incrementa conductancias de membrana en la GB, sensibles a antagonistas de los receptores de NMDA. A diferencia de los receptores de NMDA de las neuronas, la relación corriente-voltaje generada por la activación de los receptores de NMDA de la GB es lineal, con un potencial de reversión a los -40 mV. Además, estas corrientes no son sensibles al bloqueo por Mg^{2+} , no aumentan con la glicina y no van acompañadas de un incremento en el Ca^{2+} citoplasmático [63]. Por lo tanto, los receptores de NMDA de la GB presentan diferencias notables respecto a los neuronales y es de notar que no median el aflujo de Ca^{2+} , un segundo mensajero que puede activar diversas cascadas de señalización en las neuronas, incluida la excitotoxicidad.

La localización y la morfología de la GB sugieren que la activación de los iGluR se lleva a cabo por el proceso de difusión del glutamato hacia los sitios 'extrasinápticos' en la GB. Además, se ha demostrado que la activación de las fibras trepadoras puede dar lugar a una liberación ectópica de glutamato hacia la GB, que activa sus receptores de AMPA. Es decir, que el glutamato puede liberarse directamente a la GB y que la activación de sus receptores de AMPA no sólo es un efecto secundario de la comunicación entre las neuronas [74].

Metea y Newman han evaluado las señales mediadas por el Ca^{2+} en respuesta a la activación de los iGluR de la GB con respecto a la comunicación glía-neurona [76]. Iino et al describieron que la composición específica de los receptores de AMPA de la GB, carente de la subunidad GluR2 y, por lo tanto, permeable a Ca^{2+} , es importante para mantener una asociación de los procesos de la GB con las sinapsis de la CP. La expresión artificial de la subunidad GluR2 en la GB in vivo confiere a sus receptores de AMPA impermeabilidad al Ca^{2+} , con lo cual los procesos de la GB se separan de las sinapsis de la CP. El efecto producido sobre la CP es un cambio en la cinética de las corrientes excitadoras postsinápticas, que se asocia a la ausencia de transportadores de glutamato gliales cercanos a las sinapsis de la CP [66].

Se ha descrito un incremento de Ca^{2+} , espontáneo y por la estimulación de las fibras paralelas, en regiones específicas de los procesos de la GB de rebanadas de cerebelo de ratón de 20-22 días [77]. Estudios de microscopía electrónica han demostrado que esas regiones, denominadas 'microdominios', se encuentran envolviendo unas cuantas sinapsis de la CP (generalmente cinco) y que estos microdominios están separados de otros y del resto de la célula glial por regiones muy estrechas que impiden la difusión de señales de Ca^{2+} [78]. También se ha descrito un acoplamiento eléctrico entre las células de GB que es dependiente de uniones *gap* y se inhabilita por la activación

de los receptores de AMPA [79]. Dichos eventos se pueden interpretar como mecanismos de aislamiento de microdominios durante el periodo de la transmisión glutamatérgica. Se ha especulado que las señales de Ca^{2+} en los microdominios pueden modificar las propiedades electrofisiológicas de las diferentes poblaciones de sinapsis de la CP [80] por una captura diferencial de glutamato o por la liberación de sustancias biológicamente activas sobre el grupo de sinapsis que envuelve el microdominio [77,78].

Por otro lado, el Ca^{2+} es un segundo mensajero que puede activar un gran número de vías de señalización intracelulares y, como ya se ha citado, la activación de los iGluR de la GB conduce a un incremento del Ca^{2+} intracelular. Por esta razón se han investigado las repercusiones que a largo plazo pueda ocasionar la activación de los iGluR de la GB en cultivo y se han encontrado repercusiones sobre la fosforilación, traducción, formación de complejos proteicos y translocación de proteínas, además de la transcripción de genes [37,39,41,81,82].

RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS METABOTRÓPICOS EN LA GLÍA DE BERGMANN

Los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) son proteínas de siete segmentos transmembranales acoplados a proteínas G triméricas. A partir de la homología de secuencias, mecanismos de transducción de señales y de su farmacología, los mGluR se han subdividido en tres grupos. El grupo I (mGluR1 y mGluR5) estimula la actividad de la fosfolipasa C y genera señales de Ca^{2+} intracelulares, mientras que los grupos II (mGluR2 y mGluR3) y III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) regulan los niveles de AMP cíclico.

López et al [84] mostraron que, en cultivos primarios de GB, la expresión del ARNm de la subunidad GluR4 de los receptores de AMPA se incrementa en respuesta a agonistas de los mGluR. Estos hallazgos condujeron a la conclusión de que la GB expresa el ARNm de las subunidades mGluR1 y mGluR5 pertenecientes al grupo I de los mGluR [83]. Poco después, se observó la presencia de las subunidades mGluR2/3 en la GB por inmunodetección en cortes de cerebelo de ratas recién nacidas. Los cambios en la distribución temporal de los mGluR2/3 de la GB sugieren que la función de los mGluR en la GB se asocia al desarrollo del cerebelo y que son necesarios para las interacciones glía-neurona durante la maduración de las neuronas granulares.

Recientemente se ha informado de que, en cultivos de GB, la exposición a glutamato puede mediar la fosforilación de la proteincinasa S6 de una manera dependiente de la activación de iGluR, así como de los mGluR del grupo I [41].

RECEPTORES GABÉRGICOS IONOTRÓPICOS EN LA GLÍA DE BERGMANN

Los receptores gabérgicos ionotrópicos, pertenecientes a la superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando, son proteínas pentaméricas compuestas por combinaciones de las diferentes subunidades clonadas hasta el momento (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-3} , δ , ϵ , ρ_{1-3} y θ), que juntas forman un canal que permite el flujo de Cl^- en respuesta a la unión del GABA. La actividad de dicho canal depende de las subunidades que lo componen. Así, cuando el receptor no incluye las subunidades ρ (receptores GABA_A), su actividad se regula por la unión de benzodiazepinas, esteroides y barbituratos.

En la GB de diferentes especies se ha confirmado la presencia de receptores GABA_A [19,85-88]. La GB de ratones jóvenes (P5-P12) expresa las subunidades α_2 , α_3 y δ , mientras que en el organismo adulto la composición de los receptores GABA_A incluye las subunidades α_2 , γ_1 . La CP expresa las subunidades α_1 y γ_2 [19,88], lo cual ha llevado a sugerir funciones específicas de los receptores de GABA dependiendo del tipo celular [88]. Como sucede con el resto de los canales iónicos dependientes de ligando, la activación de los receptores GABA_A produce un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática y, consecuentemente, en el potencial de membrana de la célula. Es bien aceptado que los receptores GABA_A de las neuronas maduras median la inhibición sináptica rápida como producto de una hiperpolarización de la membrana. Sin embargo, en los astrocitos la activación de los receptores gabérgicos solo puede producir un efecto despolarizante [89].

Las fibras paralelas pueden establecer sinapsis con neuronas gabérgicas del cerebelo y, de hecho, la principal actividad sináptica espontánea en la CP en ratas de 11-17 días es del tipo inhibitorio bloqueado por los antagonistas de los receptores GABA_A [90]. Se ha descrito que la estimulación de las fibras paralelas produce corrientes entrantes en la GB, producidas por GluR y transportadores de glutamato; sin embargo, en esos trabajos no se consideró la participación de los receptores de GABA, ya que los experimentos se realizaron en presencia de antagonistas de los receptores de GABA [29]. Müller et al han comunicado que la aplicación de GABA y su agonista muscimol a rebanadas de cerebelo produce corrientes entrantes y una rápida activación de conductancias de Cl⁻ en la GB. Este efecto es suprimido por la bicuculina, un antagonista de los receptores GABA_A, y es insensible a la modulación por benzodiazepinas [88]. Hasta hoy, ésta es toda la información electrofisiológica con la que se cuenta acerca de la activación de los receptores de GABA de la GB.

La búsqueda de información acerca de funciones a largo plazo en las que participen los receptores GABA_A ha conducido a describir algunas características en la GB. Ponomarev et al utilizaron ratones *knock-out* de la subunidad α_1 de los receptores GABA_A y describieron el perfil transcripcional asociado a esta alteración genética. Utilizando microarreglos de ADNc y bases de datos de expresión genética específica del tipo de célula, describieron la activación transcripcional de diversos genes que se encuentran enriquecidos en la GB. La expresión celular específica de algunos de estos genes se identificó en la base del Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>). Estos datos sugieren que el GABA puede mediar efectos a largo plazo en la GB, como la regulación transcripcional, y que esta función puede estar relacionada con la plasticidad sináptica [91]. Aunque uno de los mecanismos propuestos es que la ausencia de la subunidad α_1 induce la permanencia (del desarrollo al estado adulto) y la actividad de otras subunidades de los receptores GABA_A [92], hace falta demostrar que la activación de los receptores GABA_A específicos de la GB puede regular la transcripción de genes.

En otros tipos de células gliales, se han explorado funciones del GABA independientes de las descritas como neurotransmisor. En cultivos de astrocitos de bulbo olfatorio, se ha encontrado que la señalización mediada por los receptores GABA_A provoca un cambio en su morfología [93] y además, cuando los astrocitos se cultivan junto con neuronas [94], la activación de los receptores GABA_A de los astrocitos estimula el desarrollo de

las dendritas de las neuronas adyacentes. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descubierto la ruta de señalización de la que depende esta respuesta.

RECEPTORES GABÉRGICOS METABOTRÓPICOS EN LA GLÍA DE BERGMANN

Los receptores gabérgicos metabotrópicos (receptores GABA_B) pertenecen a la superfamilia de receptores de siete segmentos transmembranales y están acoplados a proteínas G triméricas del tipo inhibitorio (G_i), por lo que regulan negativamente la adenilato ciclasa. Se ha descrito que, para que los receptores GABA_B sean funcionales, requieren estar ensamblados como complejos heterodiméricos de las subunidades GABA_{B1a-b} y GABA_{B2} [95]. La principal actividad de los receptores GABA_B es producir una lenta y prolongada señal inhibitoria, además de modular la liberación de neurotransmisor en las neuronas.

En la GB de humano adulto se ha mostrado, por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, la presencia de la subunidad GABA_{B1} de los receptores GABA_B [65]. Debido a que la subunidad GABA_{B2} no se ha encontrado en la GB, se propuso que los receptores GABA_B de la GB pueden tener una composición y una función diferentes a la del receptor dimérico descrito en las neuronas. No hay más estudios descriptivos ni de los efectos de la activación de estos receptores en la GB. Sin embargo, en otros sistemas neuronales y gliales, los receptores GABA_B tienen muy diversos efectos en el plano molecular.

Debido a que los receptores GABA_B de los astrocitos corticales regulan de manera negativa al segundo mensajero cAMP, se ha propuesto que los receptores GABA_B de las células gliales pueden desencadenar cascadas de señalización similares a las de las neuronas [96]. Tanto en astrocitos como en neuronas, la activación de los receptores GABA_B regula el flujo de Ca²⁺ extracelular. Esta entrada de Ca²⁺ se lleva a cabo por mecanismos en los que intervienen canales activados por los depósitos intracelulares [97,98]. Puesto que la GB expresa este tipo de canales, no se descarta que en este tipo celular se puedan producir mecanismos similares [99]. Por otro lado, se ha demostrado que los receptores GABA_B pueden regular la tasa transcripcional de genes al interactuar directamente con factores de transcripción como ATF4 y CREB en la glía de cerebelo [100]. La investigación de las respuestas generadas por la activación de los receptores GABA_B se hace más compleja por el hallazgo de que, en neuronas del cerebelo, la subunidad GABA_{B1a} y los GluR metabotrópicos pueden interactuar directamente y modular la actividad sináptica [101]. Cabe recordar que ambos tipos de receptores se expresan en la GB.

La investigación sobre los receptores GABA_B de la GB es aún escasa, por lo que la función de éstos sigue siendo objeto de especulación; sin embargo, en otros tipos de células gliales, se ha propuesto que los receptores GABA_B pueden mediar efectos neuroprotectores [96,102].

COMENTARIOS FINALES

El tipo de células gliales conocido como 'glía de Bergmann' tiene una estrecha relación morfológica y funcional con las CP a lo largo de la vida del organismo. La identificación de receptores y transportadores de neurotransmisores en la GB ha convertido a este tipo celular en un excelente modelo para investigar la comunicación glía-neurona. Un ejemplo de ello es cómo la re-

moción de neurotransmisores, llevada a cabo por la GB a través de sus transportadores, modula las corrientes de la CP. Sin embargo, resta por describir los mecanismos por los que el transporte de glutamato es regulado *in vivo*.

Por otro lado, la activación de los receptores de neurotransmisores de la GB, especialmente los de glutamato, puede ser un efecto indirecto propiciado por la difusión de neurotransmisores desde el espacio sináptico, o un efecto directo por la libera-

ción ectópica hacia la GB. Las repercusiones de la activación de estos receptores dependen, en primer lugar, de la conformación misma de los receptores en la GB y podrían tener su principal blanco en la modulación de las señales de comunicación celular en el cerebelo. Además, las señales eléctricas y las señales de Ca²⁺ extracelulares e intracelulares apuntan a una extraordinaria complejidad de los mecanismos por los que la GB puede interactuar con las CP.

BIBLIOGRAFÍA

- Bergersen L, Rafiki A, Ottersen OP. Immunogold cytochemistry identifies specialized membrane domains for monocarboxylate transport in the central nervous system. *Neurochem Res* 2002; 27: 89-96.
- Milenkovic I, Nedeljkovic N, Filipovic R, Pekovic S, Culic M, Rakic L, et al. Pattern of glial fibrillary acidic protein expression following kainate-induced cerebellar lesion in rats. *Neurochem Res* 2005; 30: 207-13.
- Lafarga M, Andres MA, Calle E, Berciano MT. Reactive gliosis of immature Bergmann glia and microglial cell activation in response to cell death of granule cell precursors induced by methylazoxymethanol treatment in developing rat cerebellum. *Anat Embryol (Berl)* 1998; 198: 111-22.
- Miyake T, Takahiro F., Kiyoshi T., Tadahisa K. Glial cell lineage in vivo in the mouse cerebellum. *Dev Growth Differ* 1995; 37: 273-85.
- Del Cerro M, Swarz JR. Prenatal development of Bergmann glial fibres in rodent cerebellum. *J Neurocytol* 1976; 5: 669-76.
- Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas G. Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 1997; 19: 39-50.
- Edmondson JC, Hatten ME. Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J Neurosci* 1987; 7: 1928-34.
- Lippman JJ, Lordkipanidze T, Buell ME, Yoon SO, Dunaevsky A. Morphogenesis and regulation of Bergmann glial processes during Purkinje cell dendritic spine ensheathment and synaptogenesis. *Glia* 2008; 56: 1463-77.
- Weller M, Krautler N, Mantei N, Suter U, Taylor V. Jagged1 ablation results in cerebellar granule cell migration defects and depletion of Bergmann glia. *Dev Neurosci* 2006; 28: 70-80.
- Belvindrah R, Nalbant P, Ding S, Wu C, Bokoch GM, Muller U. Integrin-linked kinase regulates Bergmann glial differentiation during cerebellar development. *Mol Cell Neurosci* 2006; 33: 109-25.
- Eiraku M, Tohgo A, Ono K, Kaneko M, Fujishima K, Hirano T, et al. DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci* 2005; 8: 873-80.
- Dahmane N, Ruiz i Altaba A. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 1999; 126: 3089-100.
- Yue Q, Groszer M, Gil JS, Berk AJ, Messing A, Wu H, et al. PTEN deletion in Bergmann glia leads to premature differentiation and affects laminar organization. *Development* 2005; 132: 3281-91.
- Tanaka M, Kadokawa Y, Hamada Y, Marunouchi T. Notch2 expression negatively correlates with glial differentiation in the postnatal mouse brain. *J Neurobiol* 1999; 41: 524-39.
- Sottile V, Li M, Scotting PJ. Stem cell marker expression in the Bergmann glia population of the adult mouse brain. *Brain Res* 2006; 1099: 8-17.
- Alcock J, Scotting P, Sottile V. Bergmann glia as putative stem cells of the mature cerebellum. *Med Hypotheses* 2007; 69: 341-5.
- Arias-Carrión O, Olivares-Buñuelos T, Drucker-Colín R. Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol* 2007; 44: 541-50.
- Castejon OJ, Dailey ME, Apkarian RP, Castejon HV. Correlative microscopy of cerebellar Bergmann glial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2002; 34: 131-42.
- Riquelme R, Miralles CP, De Blas AL. Bergmann glia GABA(A) receptors concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J Neurosci* 2002; 22: 10720-30.
- Reichenbach A, Siegel A, Rickmann M, Wolff JR, Noone D, Robinson SR. Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. *J Hirnforsch* 1995; 36: 509-17.
- Bergles DE, Dzubay JA, Jahr CE. Glutamate transporter currents in Bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 14821-5.
- Pakhotin P, Verkhratsky A. Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurones in rat cerebellar slices. *Mol Cell Neurosci* 2005; 28: 79-84.
- Froes MM, Correia AH, García-Abreu J, Spray DC, Campos de Carvalho AC, Neto MV. Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7541-6.
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 748-55.
- Tzingounis AV, Wadiche JI. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 935-47.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 10955-9.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 1994; 13: 713-25.
- Grewer C, Rauen T. Electrogenic glutamate transporters in the CNS: molecular mechanism, pre-steady-state kinetics, and their impact on synaptic signaling. *J Membr Biol* 2005; 203: 1-20.
- Clark BA, Barbour B. Currents evoked in Bergmann glial cells by parallel fibre stimulation in rat cerebellar slices. *J Physiol* 1997; 502 (Pt 2): 335-50.
- Bordey A, Sontheimer H. Modulation of glutamatergic transmission by Bergmann glial cells in rat cerebellum in situ. *J Neurophysiol* 2003; 89: 979-88.
- Slemmer JE, De Zeeuw CI, Weber JT. Don't get too excited: mechanisms of glutamate-mediated Purkinje cell death. *Prog Brain Res* 2005; 148: 367-90.
- Cui W, Allen ND, Skynner M, Gusterson B, Clark AJ. Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia* 2001; 34: 272-82.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 1996; 16: 675-86.
- Huang H, Bordey A. Glial glutamate transporters limit spillover activation of presynaptic NMDA receptors and influence synaptic inhibition of Purkinje neurons. *J Neurosci* 2004; 24: 5659-69.
- Gegelashvili G, Schousboe A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 6-15.
- Medina-Ceja L, Guerrero-Cazares H, Canales-Aguirre A, Morales-Villagrán A, Fera-Velasco A. Características estructurales y funcionales de los transportadores de glutamato: su relación con la epilepsia y el estrés oxidativo. *Rev Neurol* 2007; 45: 341-52.
- Gonzalez MI, Ortega A. Regulation of high-affinity glutamate uptake activity in Bergmann glia cells by glutamate. *Brain Res* 2000; 866: 73-81.
- Lehre KP, Danbolt NC. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 1998; 18: 8751-7.
- Rosas S, Vargas MA, López-Bayghen E, Ortega A. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1: a role for YY1. *J Neurochem* 2007; 101: 1134-44.
- López-Bayghen E, Ortega A. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST: role of PKC. *J Neurochem* 2004; 91: 200-9.
- González-Mejía ME, Morales M, Hernández-Kelly LC, Zepeda RC, Bernabé A, Ortega A. Glutamate-dependent translational regulation in cultured Bergmann glia cells: involvement of p70S6K. *Neuroscience* 2006; 141: 1389-98.
- Watake K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, et al. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 976-88.
- Takatsuru Y, Takayasu Y, Iino M, Nikkuni O, Ueda Y, Tanaka K, et al. Roles of glial glutamate transporters in shaping EPSCs at the climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neurosci Res* 2006; 54: 140-8.
- Takatsuru Y, Iino M, Tanaka K, Ozawa S. Contribution of glutamate transporter GLT-1 to removal of synaptically released glutamate at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neurosci Lett* 2007; 420: 85-9.
- Tanaka K, Watake K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K.

- et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 1997; 276: 1699-702.
46. Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, Nakatomi R, Yamada K, Kondo T, et al. From the cover: indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12161-6.
 47. Abe K, Saito H. Possible linkage between glutamate transporter and mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 2001; 76: 217-23.
 48. Gegelashvili M, Rodríguez-Kern A, Sung L, Shimamoto K, Gegelashvili G. Glutamate transporter GLAST/EAAT1 directs cell surface expression of FXYP2/gamma subunit of Na, K-ATPase in human fetal astrocytes. *Neurochem Int* 2007; 50: 916-20.
 49. Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 1990; 348: 443-6.
 50. Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, et al. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 2003; 37: 275-86.
 51. Battaglioli G, Liu H, Martin DL. Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *J Neurochem* 2003; 86: 879-87.
 52. Borden LA, Smith KE, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL. Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. *J Biol Chem* 1992; 267: 21098-104.
 53. Pow DV, Sullivan RK, Williams SM, Scott HL, Dodd PR, Finkelstein D. Differential expression of the GABA transporters GAT-1 and GAT-3 in brains of rats, cats, monkeys and humans. *Cell Tissue Res* 2005; 320: 379-92.
 54. Rattray M, Priestley JV. Differential expression of GABA transporter-1 messenger RNA in subpopulations of GABA neurones. *Neurosci Lett* 1993; 156: 163-6.
 55. Swan M, Najlerahim A, Watson RE, Bennett JP. Distribution of mRNA for the GABA transporter GAT-1 in the rat brain: evidence that GABA uptake is not limited to presynaptic neurons. *J Anat* 1994; 185 (Pt 2): 315-23.
 56. Morara S, Brecha NC, Marcotti W, Provini L, Rosina A. Neuronal and glial localization of the GABA transporter GAT-1 in the cerebellar cortex. *Neuroreport* 1996; 7: 2993-6.
 57. Barakat L, Bordey A. GAT-1 and reversible GABA transport in Bergmann glia in slices. *J Neurophysiol* 2002; 88: 1407-19.
 58. Hansson E, Ronnback L. Receptor regulation of the glutamate, GABA and taurine high-affinity uptake into astrocytes in primary culture. *Brain Res* 1991; 548: 215-21.
 59. Nissen J, Schousboe A, Halkier T, Schousboe I. Purification and characterization of an astrocyte GABA-carrier inducing protein (GABA-CIP) released from cerebellar granule cells in culture. *Glia* 1992; 6: 236-43.
 60. Didier-Bazes M, Chouaf L, Hardin H, Aguera M, Fevre-Montange M, Belin MF. Developmental neuron-glia interaction: role of the serotonin innervation upon the onset of GABA uptake into the ependymocytes of the rat subcommissural organ. *Brain Res Dev Brain Res* 1991; 63: 135-9.
 61. Bernstein EM, Quick MW. Regulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) transporters by extracellular GABA. *J Biol Chem* 1999; 274: 889-95.
 62. Kanner BI. Structure and function of sodium-coupled GABA and glutamate transporters. *J Membr Biol* 2006; 213: 89-100.
 63. Muller T, Grosche J, Ohlemeyer C, Kettenmann H. NMDA-activated currents in Bergmann glial cells. *Neuroreport* 1993; 4: 671-4.
 64. López T, López-Colomé AM, Ortega A. AMPA/KA receptor expression in radial glia. *Neuroreport* 1994; 5: 504-6.
 65. Berthele A, Platzer S, Weis S, Conrad B, Tolle TR. Expression of GABA (B1) and GABA(B2) mRNA in the human brain. *Neuroreport* 2001; 12: 3269-75.
 66. Iino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, et al. Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science* 2001; 292: 926-9.
 67. Dingleline R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 7-61.
 68. Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 1991; 252: 851-3.
 69. Petralia RS, Wenthold RJ. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comp Neurol* 1992; 318: 329-54.
 70. Luque JM, Richards JG. Expression of NMDA 2B receptor subunit mRNA in Bergmann glia. *Glia* 1995; 13: 228-32.
 71. López T, López-Colomé AM, Ortega A. NMDA receptors in cultured radial glia. *FEBS Lett* 1997; 405: 245-8.
 72. Kirischuk S, Kirchoff F, Matyash V, Kettenmann H, Verkhratsky A. Glutamate-triggered calcium signalling in mouse Bergmann glial cells in situ: role of inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated intracellular calcium release. *Neuroscience* 1999; 92: 1051-9.
 73. Muller T, Moller T, Berger T, Schnitzer J, Kettenmann H. Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 1992; 256: 1563-6.
 74. Matsui K, Jahr CE. Differential control of synaptic and ectopic vesicular release of glutamate. *J Neurosci* 2004; 24: 8932-9.
 75. Bellamy TC, Ogden D. Short-term plasticity of Bergmann glial cell extrasynaptic currents during parallel fiber stimulation in rat cerebellum. *Glia* 2005; 52: 325-35.
 76. Metea MR, Newman EA. Calcium signaling in specialized glial cells. *Glia* 2006; 54: 650-5.
 77. Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 1999; 2: 139-43.
 78. Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A. Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res* 2002; 68: 138-49.
 79. Muller T, Moller T, Neuhaus J, Kettenmann H. Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation. *Glia* 1996; 17: 274-84.
 80. Denk W, Sugimori M, Llinas R. Two types of calcium response limited to single spines in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 8279-82.
 81. López-Bayghen E, Aguirre A, Ortega A. Transcriptional regulation through glutamate receptors: involvement of tyrosine kinases. *J Neurosci Res* 2003; 74: 717-25.
 82. Millán A, Arias-Montano JA, Méndez JA, Hernández-Kelly LC, Ortega A. Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors signaling complexes in Bergmann glia. *J Neurosci Res* 2004; 78: 56-63.
 83. López T, López-Colomé AM, Ortega A. Changes in GluR4 expression induced by metabotropic receptor activation in radial glia cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 58: 40-6.
 84. Meguro R, Ohishi H, Hoshino K, Hicks TP, Norita M. Metabotropic glutamate receptor 2/3 immunoreactivity in the developing rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 1999; 410: 243-55.
 85. Wisden W, McNaughton LA, Darlison MG, Hunt SP, Barnard EA. Differential distribution of GABA_A receptor mRNAs in bovine cerebellum -localization of alpha 2 mRNA in Bergmann glia layer. *Neurosci Lett* 1989; 106: 7-12.
 86. Laurie DJ, Wisden W, Seeburg PH. The distribution of thirteen GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* 1992; 12: 4151-72.
 87. Quirk K, Gillard NP, Ragan CI, Whiting PJ, McKernan RM. Model of subunit composition of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes expressed in rat cerebellum with respect to their alpha and gamma/delta subunits. *J Biol Chem* 1994; 269: 16020-8.
 88. Muller T, Fritschy JM, Grosche J, Platt GD, Mohler H, Kettenmann H. Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABA_A receptor expression in Bergmann glial cells. *J Neurosci* 1994; 14: 2503-14.
 89. Verkhratsky A, Steinhauser C. Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 32: 380-412.
 90. Konnerth A, Llano I, Armstrong CM. Synaptic currents in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 2662-5.
 91. Ponomarev I, Maiya R, Harnett MT, Schafer GL, Ryabinin AE, Blednov YA, et al. Transcriptional signatures of cellular plasticity in mice lacking the alpha1 subunit of GABA_A receptors. *J Neurosci* 2006; 26: 5673-83.
 92. Vicini S, Ferguson C, Prybylowski K, Kralic J, Morrow AL, Homanics GE. GABA(A) receptor alpha1 subunit deletion prevents developmental changes of inhibitory synaptic currents in cerebellar neurons. *J Neurosci* 2001; 21: 3009-16.
 93. Matsutani S, Yamamoto N. Neuronal regulation of astrocyte morphology in vitro is mediated by GABAergic signaling. *Glia* 1997; 20: 1-9.
 94. Matsutani S, Yamamoto N. GABAergic neuron-to-astrocyte signaling regulates dendritic branching in coculture. *J Neurobiol* 1998; 37: 251-64.
 95. Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, et al. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 1998; 396: 674-9.
 96. Oka M, Wada M, Wu Q, Yamamoto A, Fujita T. Functional expression of metabotropic GABA_B receptors in primary cultures of astrocytes from rat cerebral cortex. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 874-81.
 97. Albrecht J, Pearce B, Murphy S. Evidence for an interaction between

- GABAB and glutamate receptors in astrocytes as revealed by changes in Ca²⁺ flux. *Eur J Pharmacol* 1986; 125: 463-4.
98. New DC, An H, Ip NY, Wong YH. GABAB heterodimeric receptors promote Ca²⁺ influx via store-operated channels in rat cortical neurons and transfected Chinese hamster ovary cells. *Neuroscience* 2006; 137: 1347-58.
99. Singaravelu K, Lohr C, Deitmer JW. Regulation of store-operated calcium entry by calcium-independent phospholipase A2 in rat cerebellar astrocytes. *J Neurosci* 2006; 26: 9579-92.
100. Ritter B, Zschunsch J, Kvachnina E, Zhang W, Ponimaskin EG. The GABA(B) receptor subunits R1 and R2 interact differentially with the activation transcription factor ATF4 in mouse brain during the postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 2004; 149: 73-7.
101. Tabata T, Araishi K, Hashimoto K, Hashimoto Y, Van der Putten H, Bettler B, et al. Ca²⁺ activity at GABAB receptors constitutively promotes metabotropic glutamate signaling in the absence of GABA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16952-7.
102. Fern R, Waxman SG, Ransom BR. Endogenous GABA attenuates CNS white matter dysfunction following anoxia. *J Neurosci* 1995; 15: 699-708.

BERGMANN GLIA RECEPTORS AND TRANSPORTERS: POSSIBLE ROLES IN CEREBELLUM PHYSIOLOGY

Summary. Introduction. *Bergmann glia is a specialized astrocyte of the vertebrate cerebellar cortex. By its localization and morphology, this glial cell type is tightly related with Purkinje cell, which is the neuron that integrates the different inputs signals in the cerebellum cortex and the unique output of this system. Development and conclusions. This review makes a description of plasma membrane transporters and receptors in Bergmann glia, which interact with the major neurotransmitters in the central nervous system, glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA). Activity of these proteins is analyzed with respect to their possible role in the regulation of Purkinje cell synaptic activity. [REV NEUROL 2008; 47: 527-35]*

Key words. Astrocytes. Cerebellum. Bergmann glia. GABA receptors. GABA transporters. Glutamate receptors. Glutamate transporters.