

Portadako irudia: DAGL α (berdez) eta lamina B1 (gorriz) proteinen immunomarkaketa nuklearra arratoi helduaren garun-kortex somatosensorialeko V. geruzaren neurona batean. Kromatina Hoechst 33342 konposatuarekin tindatu zen (urdinez). Irudiaren iturria: García del Caño et al., 2015 (alearen portada irudia).

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**2-ARAKIDONILGLIZEROL ENDOKANNABINOIDEAREN SINTESI- ETA
DEGRADAZIO-MAKINERIA NEURONAREN NUKLEOAN:
DIAZILGLIZEROL LIPASA α -REN KONPARTIMENTAZIOA ETA
AKTIBITATE ENTZIMATIKOA**

Zuzendariak: Gontzal García del Caño eta Sergio Barrondo Lakarra Doktoreak.

Xabier Aretxabala Rodriguez

Vitoria-Gasteiz, 2017

Tesi hau helmugatzat duen ibilbidea luzea izan da. Ibilbide luze guztiak bezala, bizipen asko izateko aukera. Bada denbora karrera bukatu nuenetik pasa den hamarkadaren amaieran. Garai haietan oraindik ez nuen ikerketaren munduarekin inolako harremanik. Karrera bukatu eta botika batean egin nahi nuen lan. Probatu eta mundua irauli zitzaidan, ez nuen nire burua *per secula seculorum* botikario lanetan ikusten. Orduan masterra egitearen ideia burua zeharkatu eta Neurozientzietako masterrak atentzioa deitu zidan. Karreraren ikasitako ezagutzei aplikazioa emateko irtenbide ezin hobea, eta, gustuko izatekotan, ikerketa munduan frogatzeko aukera. Masterrean murgilduta genbiltzan Gontzal García del Caño doktorea biologia molekularreko tekniken klasea emateko klaseko atea zeharkatu zuenean. Irakasle zorrotza, baina zertaz ari den dakien horietakoa, zorrotasuna bertute beraz. Eta gustuko dut hori. Berarekin master bukaerako lana egitea erabaki nuen. Horrela sartu nintzen Joan Sallésen ikerketa taldean. Bertan Sergio ezagutu nuen eta Gontzalekin batera nire tesia zuzentzea erabaki zuten. Garai latzak haiek, krisiaren hastapenak gurean, eta tesi lan bat egin ahal izateko finantziaketarik ezin topatu. Beraiek, beti animatzen eta oso estimagarria den “lasai, Xabi, lehenbailehen zerbait topatuko dugu eta!” batekin. Heldu bitartean, U87 astrozitoekin borrokan hasi ginen.

Gure taldearen ikerketa lerroa aspaldidanik sistema endokannabinoidea izan da. Nerbio Sistema Zentralean kokatutako sistema endokannabinoidea. Garai hartan oso bogan zegoen gaia sistema honen hartzaileen arteko heteromerizazioak ziren, horregatik pronostiko oso txarreko glioma (astrozitoma) bateko zeluletan izan zezaketen garrantzia ikertzen hasi ginen. U87 astrozitoekin asko borrokatu ostean, gauzak ez ziren nahi bezala joan eta jatorrira bueltatu egin ginen, master bukaerako lanean jorratutako gaira, orain dela erlatiboki gutxi aztertzen hasi den gaira: neuronaren nukleoan sistema endokannabinoidearen ikerketara.

Garai oso onak izan dira laborategian bizitakoak, asko ikasi dut, ez bakarrik ikerketa zientifikoaren inguruan, baizik eta bizitzako beste hainbat esparruren inguruan ere. Bizitza osorako iraungo duten lagun onak egin ditut. Eskerrik asko ibilbide guztian lagundu nauzuen guztiei. Eskerrik asko Gontzal eta Sergiori zientzia irakasteagatik, eta Joan eta Mainerrekin batera ikerketa taldearen baitan hartzeagatik. Eskerrik asko Imanol, Mario, Ana, Miquel, Amaia eta Leireei, laborategiko garaipen eta porrotak konpartitzeagatik. Zeresanik ez, nire eskerrik beroenak familiakoei, daudenei eta joan zirenei. Eskerrak Eneritzi, egunero Jekyll Doktore eta Mr Hyde naizen hori jasateagatik. Eskerrik asko koadrilakoei eta urte hauetan bide lagun izan zaituztedan **guztiei**, tesi honen parte ere bazarete eta.

Xabi Aretxabala

2017

Finantziazioa:

- Ez-Dokotore Ikerlari Kontratua. UPV/EHU. 2013-2014.
- Jesús de Gangoiti Barrera Fundazioaren Dirulaguntza. 2015-2016.
- Euskal Unibertsitate Sistemaren Ikerketa Taldeak. Eusko Jaurlaritza: IT-330-10, IT-589/13, IT-921-16
- SAIOTEK Programa. Eusko Jaurlaritza. S-PE11UN124, S-PE11UN125.
- Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental, CIBERSAM.
- Prestakuntza eta Ikerkuntzarako Unitateak. UPV/EHU. PIU11/35.

AURKIBIDEA

I. SARRERA	1
1. Diazilglicerol Lipasa Aktibitatearen Aurkikuntza. Entzimen Identifikazioa eta Karakterizazioa	3
2. DAGL Aktibitatearen Garrantzia Seinaleztapen Endokannabinoiden	4
2.1 Sistema Endokannabinoiden Funtzionamendua.....	4
2.2 DAGL Aktibitatearen Menpeko Seinaleztapen Endokannabinoiden: DAGL α Isozimaren Garrantzia.....	6
3. DAGL Isozimen Egitura-Ezaugarriak	8
3.1 Mintz-zeharreko Domeinuak	8
3.2 Domeinu Katalitikoak	9
3.3 DAGL α -ren Karboxi Buztana.....	11
4. DAGLα Isozimaren Menpeko 2-AG Sintesia. Funtzio Fisiologikoak	11
4.1 DAGL Aktibitatearen Rola Axoien Hazkuntza eta Gidatze Prozesuetan.....	12
4.2 DAGL α Isozimaren Rola Garun Helduaren Neurogenesian.....	13
4.3 DAGL α Aktibitatearen Rola Plastikotasun Sinaptikoan	15
5. 2-AG Kontzentrazioaren (METAKETAREN?) Erregulazio Mekanismoak	16
6. PLCβ/DAGLα Seinaleztapena Nukleoan	18
II. HELBURUAK	21
1. DAGLα Entzimaren Espresioa Arratoi Helduaren Garun-Kortexean Aztertzea.	23
1.1 DAGL α -ren aurkako antigorputzen espezifikotasunaren balioestea.	23
1.2 Immunohistokimia- eta immunofluoreszentzia-tekniken bidez, DAGL α -ren banaketa garun-kortexean aztertzea.	23
2. DAGLα Entzimaren Espresioa Garun-Kortexeko Mintz Zelularretan eta Nukleo Osoetan Aztertzea	23
2.1 DAGL α -ren konpartimentazioaren azterketa garun-kortexetik isolatutako mintz zelularretan.	23
2.2 DAGL α -ren espresioa garun-kortexeko nukleo neuronaletan aztertzea.	23

3. DAGLα-ren Konpartimentazio Azpinuklearra Garun-Kortexeko Nukleo Neuronaletan Aztertzea	23
3.1 DAGL α -ren konpartimentazioa garun-kortexeko nukleoen azpifrakzioetan aztertzea	23
3.2 DAGL α -ren konpartimentazioa nukleo osoetan immunofluoreszentsia bidez aztertzea	24
3.3 DAGL α -ren eta PLC β isozimen ko-konpartimentazioa nukleo osoetan aztertzea	24
4. PLCβ eta DAGLα Aktibitateen Menpeko 2-AG Ekoizpen Endogenoa Garun-Kortexeko Nukleo Osoetan Aztertzea	24
4.1 m-3M3FBS konposatuak estimulatutako 2-AG ekoizpen endogenoa nukleo osoetan aztertzea	24
4.2 Kaltzioak bultzatutako 2-AG ekoizpen endogenoa nukleo osoetan aztertzea	24
5. DAGL Aktibitatearen Menpeko 2-AGren Ekoizpen-Zinetika Garun-Kortexeko Nukleoaren Matrizean Aztertzea	24
6. 2-AG Degradazio Entzimatikoa Garun-Kortexeko Nukleoaren Matrizean Aztertzea	24
6.1 2-AG degradazioan inplikaturiko entzimen espresio eta konpartimentazio nuklearra aztertzea	24
6.2 2-AG degradazioan inplikaturiko entzimen aktibitatea matrize nuklearrean aztertzea	24
III. MATERIALAK	25
1. Lagin Biologikoak	27
1.1 Immunohistokimia eta Immunofluoreszentziarako Laginak.....	27
1.2 Immunoblot, eta Kromatografia Likidoari Lotutako Masa Espektrometria (LC/MS)	27
1.3 Zelulen Kultura eta Transfekzioa.....	28
2. Material Fungiblea	28

2.1 Erreaktibo Orokorrak	28
2.2 Erreaktibo eta Material Espezifikoak	29
2.2.1 Immunohistokimia	29
2.2.2 LC-MS/MS	30
2.2.3 Western Blot	31
2.3 Antigorputz Primarioak	32
2.4 Antigorputz Sekundarioak	33
2.5 Suero Normalak	33
IV. METODOAK	35
1. Garun-Kortexaren Frakzionamendu Prozedurak	37
1.1 Mintz Gordin (P2), Nukleo Gordin (P1) eta Zitoplasma (Cyt) Frakzioak Garun-Kortexetik Isolatzeko prozedura	37
1.2 Garun-Kortexeko Mintzak Frakzionatzeko Prozedura.....	39
1.3 Garun-Kortexeko Nukleo Osoak Isolatzeko Prozedura.....	41
1.4 Garun-Kortexeko Nukleo Osoen Azpifrakzioen Banaketa.....	43
2. Proteina Kontzentrazioaren Estimazioa Garuneko Laginetan.....	46
2.1 Proteina Kontzentrazioaren Estimazioa: <i>Bradford</i> Metodoa.....	46
2.2 Proteina Kontzentrazioaren Estimazioa: Azido Bizinkoninikoaren Entsegua.....	47
3. Immunohistokimia Arratoiaren Garun-Kortexeko Ebaketa Histologikoetan.....	49
4. Western Blot Protokoloa	50
5. Immunofluoreszentzia eta Mikroskopia	51
5.1 Immunofluoreszentzia Arratoiden Garun-Kortexeko Nukleo Osoetan.....	51
5.1.1 Nukleoen Zenbaketa eta Ereinketa.....	51
5.1.2 Immunofluoreszentzia Prozedura	52
5.2 Immunofluoreszentzia Arratoiden Garun-Kortexeko Ebaketa Histologikoetan.....	53
5.3 Immunofluoreszentzia Transfektatutako Zeluletan.....	53

5.4	Immunofluoreszentzia-Markaketaren Azterketa	54
6.	LC-MS Bidezko 2-AG Metaketaren Neurketa	55
6.1	Baldintza Esperimentalak	55
6.2	Metabolito Lipidikoen Detekzio eta Kuantifikazioa	57
6.2.1	Diluzio Isotopikoa Adizioarekin	57
6.2.2	Diluzio Isotopikoa	58
V.	EMAITZAK	59
1.	DAGLα Isozimaren Aurkako Antigorputzen Hautaketa	61
1.1	DAGL α -Immunomarkaketaren Distribuzioa Garun-Kortexean	61
1.2	DAGL α -ren Aurkako Antigorputzen Espezifikotasun Frogak	65
2.	DAGLα-ren Espresioaren Azterketa Arratoi Helduaren Garun-Kortexeko Mintz Sinaptikoetan eta Nukleo Osoetan	69
2.1	DAGL α -Immunomarkaketa Arratoiaren Garun-Kortexean	69
2.2	DAGL α -ren Espresioa Garun-Kortexetik Isolatutako Azpifrakzioetan	73
2.2.1	DAGL α -ren Espresioa Garun-Kortexetik Isolatutako Mintzen Azpidomeinuetan	73
2.2.2	DAGL α -ren Espresioa Garun-Kortexetik Isolatutako Nukleo Osoetan	76
3.	2-Arakidonil Glizerolaren Sintesi-Makineriaren Konpartimentazioa eta Funtzionalitatea Garun-Kortexeko Neuronen Nukleoan	78
3.1	DAGL α -ren Konpartimentazio Azpinuklearra	78
3.1.1	<i>Immunoblot</i> Analisiak	78
3.1.2	Immunofluorezentzia Bikoitza eta Bereizmen Handiko Mikroskopia Analisiak	81
3.2	PLC β Isozimen Konpartimentazio Azpinuklearra	83
3.3	PLC β eta DAGL α Menpeko 2-AG Ekoizpen Endogenoa Nukleo Osoetan	85
4.	Diazilglizerol Lipasaren Aktibitate Entzimatikoa eta 2-AG Hidrolisia Matrize Nuklearrean	89

4.1 DAGL Aktibitate Entzimatikoa Matrize Nuklearrean.....	89
4.2 Serina-Hidrolasa Aktibitatearen Menpeko 2-AG Degradazioa Matrize Nuklearrean	91
4.3 2-AG Degradazio-Entzimen Espresioa Garun-Kortexetik Isolatutako Azpifrakzioetan	92
4.4 2-AG Degradazio-Entzimen Konpartimentazio Azpinuklearra.....	96
4.4.1 Immunofluorezentzia Bikoitza eta Bereizmen Handiko Mikroskopia Analisiak	96
4.4.2 <i>Immunoblot</i> Analisiak.....	99
4.5 Serina-Hidrolasa Aktibitate Entzimatikoaren Azterketa Matrize Nuklearrean.....	101
VI. EZTABAIDA.....	103
1. DAGLα arratoi helduaren garun-kortexeko nukleoetan espresatzen da	105
2. DAGLα garun-kortexeko nukleo neuronalen matrizean kokatzen da	108
3. Arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleo osoetan, PLCβ/DAGLα ardatzaren menpeko 2-AG emari endogenoa dago	114
4. Nukleo neuronalean ekoiztutako 2-AG-ren ahalezko funtzioak.....	124
VII. ONDORIOAK	129
VII. BIBLIOGRAFIA	133
IIX. ERANSKINAK	153

LABURDURAK

15d-PGJ2	15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2
15d-PGJ2-G	15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2 glycerol ester
1-AG	1-Arachidonoylglycerol
2-AG	2-Arachidonoylglycerol
aa	Amino acid
AA	Arachydonic acid
ABC	Avidin-biotin complex
ABHD12	Alpha/beta-Hydrolase domain containing 12
ABHD6	Alpha/beta-Hydrolase domain containing 6
AEA	Anandamide
BCA	Bicinchoninic Acid Assay
BiP	Binding Immunoglobulin Protein
BSA	Bovine Sero Albumin
CAM	Cell Adhesion Molecules
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II
CB1	Cannabinoid Receptor 1
CB2	Cannabinoid Receptor 2
cdk	Cicline Dependent Kinase
COPI	Coat Complex Protein I
COX2	Cyclooxygenase 2
DAB	Diaminobenzidine
DAG	Diacylglycerol
DAG	Diacylglycerol Lipase
DAGK	Diacylglycerol Kinase
DAGLα	Diacylglycerol Lipase Alpha
DAGLβ	Diacylglycerol Lipase Beta
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DSE	Depolarization-Induced Suppression of Excitation
DSI	Depolarization-Induced Suppression of Inhibition
DTT	DL-Dithiothreitol

eCB	Endocannabinoid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid or egtazic acid
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ER	Endoplasmatic Reticulum
ERK	Extracellular – signal regulated kinases
FAAH	Fatty Acid Amide Hidrolase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GABA	Gammaaminobutiric Acid
GAP	GTPase Activating Protein
GAP-43	Growth Associated Protein 43
GDP	Guanosine diphosphate
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GPCR	G protein coupled receptor
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Hemagglutinin
HEK293	Human embryonic kidney cells 293
HRP	Horseradish peroxidase
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
JZL184	4-nitrophenyl-4-[bis(1,3-benzodioxol-5-yl)(hydroxy)methyl]piperidine-1-carboxylate
KO	Knockout
LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
LTD	Long Term Depression
LTP	Long Term Potentiation
MAFP	Methyl-arachidonyl fluorophosphonate
MAGL	Monoacylglycerol Lipase
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEL	Murine Erythroleukemia
mGluR	Metabotropic Glutamate Receptor

mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MSE	Metabotropic-Suppression of Excitation
MSN	Medium Spiny Neuron
NAM	N-Arachidonyl Maleimide
NAPE-PLD	N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecules
NLS	Nuclear Localization Sequence
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NPCx	Nuclear Pore Complex
NSZ	Nervio Sistema Zentrala
Nup62	Nucleoporin 62
PA	Phosphatidic Acid
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffer saline
PGD2-G	Prostaglandin-D2 glycerol ester
PGE2-G	Prostaglandin-E2 glycerol ester
PGF2a-G	Prostaglandin-F2a glycerol ester
PGH2-G	Prostaglandin-H2 glycerol ester
PGI2	Prostacyclin
PGI2-G	Prostaglandin-I2 glycerol ester
PIP2	Phosphatidylinositol biphosphate
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PLCβ	Phospholipase C Beta
PLCγ	Phospholipase γ
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PPD	p-phenylenediamine
pRb	Retinoblastome Protein
PSD95	Post Synaptic Density Protein 95

PtdIns	Phosphatidylinositol
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RMS	Rostral Migratory Stream
Rpm	Revolutions per minute
SC-35	Serine/Arginine rich splicing factor 35
SGZ	Subgranular Zone
siRNA	Small interfering RNA
SNAP-25	Synaptosomal-associated protein 25
STD	Short Term Depression
SVZ	Subventricular Zone
TEMED	Tetramethylethylenediamine
THL	Tetrahydrolipstatine
TX-100	Triton X-100
TXA2	Thromboxane A2
V-SVZ	Ventricular-Subventricular Zone

I. SARRERA

1. DIAZILGLIZEROL LIPASA AKTIBITATEAREN AURKIKUNTZA. ENTZIMEN IDENTIFIKAZIOA ETA KARAKTERIZAZIOA

Diazilglizerol lipasa (DAGL) aktibitatea plaketetan eta mastozitoetan deskribatu zen lehengo aldiz. Bertan, DAGL aktibitateak azido arakidonikoaren (AA) askapena bideratzen duten erreazio entzimatikoen sekuentzian duen garrantzia agerian jarri zen. Bide horretatik, DAGLaren substratua (diazilglizerola, DAG) fosfolipasa C (PLC) aktibitate bati esker sortuko litzateke. Hurrengo pausoetan, DAGL eta monoazilglizerol lipasa (MAGL) aktibitate hidrolitiko sekuentzialen ondorioz, 2-arakidonilglizerola (2-AG) eta AA sortuko lirateke hurrenez hurren (Kennerly et al., 1979; Prescott eta Majerus, 1983; Allen et al., 1992). Urte horietan, RHC80267 DAGL aktibitatearen inhibitzaile gisa identifikatu zen (Sutherland eta Amin, 1982), eta konposatu honen erabilerari esker DAGL aktibitatearen zeregin fisiologiko batzuk deskribatu ahal izan ziren. Lehenengo ikerketetan, besteak beste, DAGL aktibitatea honako funtzio hauekin erlazionatu zen: guruin tiroidean tiroptropinak estimulatutako prostagladinen jariaketa (Levasseur et al., 1984), prolaktinaren hipofisi-jariaketa (Canonico et al., 1985) eta plaketetan trombinak eragindako azido arakidonikoaren jariaketa (Amin et al., 1986).

DAGL aktibitate entzimatikoa deskribatu ondoren, DAGL entzima arazteko eta karakterizatzeko asmoz, ikerketa batzuk burutu ziren behi-garunetan (Farooqui et al., 1984; Farooqui et al., 1986; Rosenberger et al., 2007). Ikerketa horietan, DAGL aktibitatea 27 kDa-eko frakzioan isolatu zen, eta AMP ziklikoaren menpeko proteina kinasak (PKA), baina ez kaltzioak, aktibitate entzimatikoa estimula zezakeela demostratu zen (Rosenberger et al., 2007). Geroago, giza plaketen mikrosometatik 33 kDa inguruko DAGL aktibitatea isolatu zen, kaltzioak zuzenean ezin estimula zezakeena (Moriyama et al., 1999). Dena den, garai hartan identifikatutako DAGL aktibitate entzimatiokoek orduz geroztik identifikatutako isozimekin erlazioren bat duten ezezaguna da. Arlo horretan, aurrerapenik nagusia 2003an gauzatu zen, bioinformatika bidezko analisiaz, DAGL entzimen sekuentziak identifikatu eta klonatu zituztenean (Bisogno et al., 2003). Bi gene desberdin identifikatu ziren, eta gene horiek kodetutako produktuak 1042 eta 642 aminoazidoz osatutako isozimak zirela ikusi zen,

DAGL α eta DAGL β hurrenez hurren. Isozima horiek egitura-ezaugarriak partekatzen dituztela ikusi zen. Hala, amino terminal sekuentzia labur baten ondoren, lau mintz-zeharreko domeinu dituzte eta, jarraian, alde zitosoan kokatutako domeinu katalitikoak. DAGL β -k ez bezala, DAGL α -k buztan zitosoan luzea du domeinu katalitikoaren ondoren (ikus aurrerago). COS zeluletan gainespresatu zirenean, DAGL α eta DAGL β puntukako banaketa erakutsi zuten mintz plasmakoan, mintz-mikrodomeinuetan kokatzen direla iradoki zuena (Bisogno et al., 2003). Halaber, SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, sodio dodezil sulfato eta poliakrilamida geleko elektroforesia) bitartez aztertu zirenean, DAGL α eta DAGL β proteinen migrazioa beren pisu molekular teorikoarekin bat zetorren, 120 kDa eta 70 eta kDa hurrenez hurren. Azterketa entzimologikoak biak glizerolaren sn-1 posizioarako espezifikoak direla erakutsi zuen, eta, beraz, 2-AG sintesiaren erantzuleak (Bisogno et al., 2003). Aktibitate katalitikoan bi isozimak oso antzekoak izanik ere, desberdin banatzen dira organismoan. Hala, DAGL β -ren ehun banaketa DAGL α -rena baino zabalagoa izanik ere, DAGL α isozimaren espresioa askoz handiagoa da nerbio-sistema zentralean (Bisogno et al., 2003).

2. DAGL AKTIBITATEAREN GARRANTZIA SEINALEZTAPEN ENDOKANNABINOIDEAN

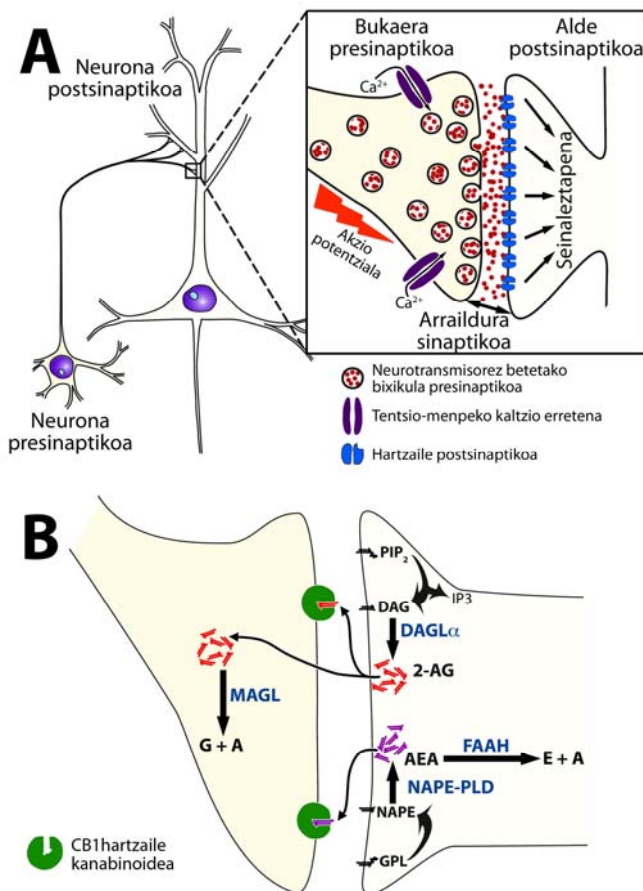
Lehenago komentatu den bezala, DAGL aktibitatea AA emariaren testuinguruan aztertzen hasi zen. Izan ere, DAGL/MAGL sekuentzia hidrolitikoan, DAGL aktibitatea pauso bitartekari hutsa bezala hartzen zen AA ekoizteko. Sistema endokannabinoidea deskribatu zenez geroztik, DAGL aktibitatearen inguruko ikerlan gehienak sistema horretan duen premiazko rola aztertzerantz bideratu ziren.

2.1 Sistema Endokannabinoidearen Funtzionamendua

CB1 eta CB2 hartzaille kannabinoideak pasa den mendeko 80ko hamarkadan deskribatu ziren aurrenekoz, eta tetrahidrokannabinola (*Tetrahydrocannabinol*, THC) kalamuaren (*Cannabis sativa*) eragin psikoaktiboaren erantzule nagusi bezala identifikatu zen (Devane et al., 1992a; Munro et al., 1993). Hartzaille kannabinoideen aurkikuntzak ligando endogenoen

bilaketara bideratutako ikerketak bultzatu zituen. Aurkitu zen lehenengo kannabinoide endogenoa, N-arakidoniletanolamina (*anandamide*, anandamida -AEA- izenarekin ezagututakoa), 1992an isolatu zen (Devane et al., 1992b) eta, geroxeago, 2-arakidonoilglizerola (2-AG) (Stella et al., 1997).

Neurotransmisore klasikoak ez bezala, endokannabinoideak ez dira ez bixikuletan metatzen ezta exozitosi bidez askatzen (1. irudia). Endokannabinoideak, beharrezkoak direnean ekoizten eta askatzen dira, mintz plasmatikoko fosfolipidoen degradazioaren bidez. AEA eta 2-AG sintesiaren erantzule nagusiak fosfolipasa D (NAPE-PLD) eta DAGL dira hurrenez hurren. AEA eratzeko, NAPE-PLDk N-arakidonoil fosfatidiletanolamina (*N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D*, NAPE) erabiltzen du substratu bezala. DAGL entzimak DAG substratutik eratzen du 2-AG, eta DAG mintz plasmatikoan dagoen fosfatidilinositol 4,5- bifosfatoaren (PIP₂) degradaziotik eratzen da.



1. irudia. Neurotransmisioaren ezaugarriak sinapsi klasikoan eta sistema kannabinoide endogenoan. **A.** Neuronen arteko sinapsi klasikoan, neurotransmisoreak sintetizatu eta bixikuletan metatu egiten dira. Hala, neurona presinaptikoa kitzikatzearen ondorioz sortutako depolarizazioa bukaera presinaptikoetara hedatu egiten da. Ondorioz, neurotransmisoreak bixikula presinaptikoetatik arraildura sinaptikora askatzen dira eta mintz postsinaptikoan dauden hartzailleak aktibatzen dituzte. **B.** Berriz, AEA eta 2-AG endokannabinoideak «on-demand» sintetizatzen eta askatzen dira, eta atzera-mezulari moduan jokatzen dute. Mintz plasmatikoko dauden fosfolipidoak substratu gisa erabiliz, NAPE- PLD eta DAGLα entzimek AEA eta 2-AG ekoizten dute hurrenez hurren. Behin sintetizaturik, atzerantz igarotzen dira eta CB1 hartzaille presinaptikoak kitzikatzen dituzte. Seinaleztapena AEA eta 2-AG endokannabinoideen degradazioaz bukatzen da. FAAH (*Fatty acid amide hydrolase*, gantz-azidoen hidrolasa) eta MAGL entzimek AEA eta 2-AG degradatzen dituzte hurrenez hurren.

Liposolugarriak direnez, behin sintetizaturik, AEA zein 2-AG mintz biologikoak zeharkatzen dituzte, eta jakin badakigu bi endokannabinoiden hauek atzera-mezulari gisa jokatzen dutela sinapsian. Sistema endokannabinoiden osagaien kokapena mota horretako seinaleztapenaren oinarrian dago (Katona eta Freund, 2012). Horrela, sintesirako makineria alde postsinaptikoan kokatzen da eta CB1 hartzailea, aldiz, alde presinaptikoan. Neurona postsinaptikoan zelula barneko kaltzio kontzentrazioa igotzen denean, AEA eta 2-AG askatzen dira, eta hauek neurona presinaptikoaren CB1 hartzaileak aktibatzen dituzte. Horren ondorioz, neurotransmisore presinaptikoaren askapena jaitsiko da. Hortik ondorioztatu da endokannabinoiden sintesia «*on-demand*» ekoizpen mekanismoaren bidez kontrolatzen dela. Hala, kitzikapen handiegia jasaten duenean, neurona postsinaptikoak endokannabinoidak erabiliko lituzke neurona presinaptikoaren aktibitatea murrizteko.

Aipatutako atzera-mezulari mekanismoa dela medio, endokannabinoiden epe laburrerako eta epe luzerako aldaketak eragiten dituzte sinapsiaren eraginkortasunean. Zehazki, plastizitate fenomeno hauei epe laburrerako depresio (*short-term depression*, STD) eta epe luzerako depresio (*long-term depression*, LTD) deritze. $G_{i/o}$ proteinei akoplaturik dagoenez, CB1 hartzailearen aktibazioak adenilato ziklasaren aktibitatea murrizten du eta, aldi berean, kaltzio- eta potasio-erretenen itxiera eta irekiera eragiten du hurrenez hurren. Horrela, CB1 hartzailearen bidezko seinaleztapenak indar sinaptikoa gutxitzen du epe laburrean. Horrez gainera, CB1en estimulazioak beste seinaleztapen bide batzuk aktiba ditzake (esaterako, *mitogen-activated protein kinase*, mitogenoz aktibatutako proteina kinasen -MAPK- bidea) eta, horrela, sistema endokannabinoiden ekspresio genikoari eragin diezaike. Beraz, CB1 hartzailearen bidezko seinaleztapenak epe luzerako aldaketak ere eragin ditzake.

2.2 DAGL Aktibitatearen Menpeko Seinaleztapen Endokannabinoida: DAGL α

Isozimaren Garrantzia

Anandamida eta 2-AG aurkitu ondoren, beste hainbat konposatu deskribatu dira balizko endokannabinoiden gisa, baina bakoitzak tonu endokannabinoidari egiten dion ekarpena

zehazteke dago. Identifikatutako substantzien artean, noladin eterra (Hanus et al., 2001), virodhamina (Porter et al., 2002) eta N-arakidonildopamina (Bisogno et al., 2000) aipa daitezke. Edonola ere, 2-AG nabarmen ugariagoa da beste endokannabinoidak baino, eta azterketa farmakologikoetan lortutako emaitzen arabera endokannabinoida nagusia dela ondoriozta daiteke (Sugiura et al., 1999).

Egun, DAGL α eta DAGL β sn-1 isozima espezifikoek 2-AGren maila basala erregulatzen dutela jakin badakigu, «*on-demand*» mekanismoaren bidez estimulatutakoa. Izan ere, isozima horien aktibitatea beharrezkoa da endokannabinoidak eragindako erantzun fisiologikoak antzeman ahal izateko (Chevaleyre eta Castillo, 2003; Williams et al., 2003; Szabo et al., 2006; Goncalves et al., 2008; Hashimoto et al., 2008; Oudin et al., 2011). DAGL isozima bakoitzak ehun desberdinetan 2-AG emariari egiten dion ekarpena argitzeko, balio handikoak izan dira *Knockout* ereduak. Horrela, saguaren nerbio-sistema zentralean eta gibelean, DAGL α -ren ezabatze genikoak 2-AG mailaren %80 eta %60 murrizten du hurrenez hurren. Aitzitik, DAGL β -*knockout* saguen garunean, 2-AG mailaren murrizketa %50ekoa baino ez da, eta antzeman ezina bizkar-muinean. Animalia horien gibelean, ordez, 2-AG mailaren %90 murrizten da (Gao et al., 2010), DAGL β gibeletako 2-AG emariaren erantzule nagusia dela erakusten duena. Beste autore batzuek sortutako DAGL α -*knockout* saguen zerebeloan, hipokanpoan eta konplexu estriatuan %80eko murrizketa antzeman da 2-AG mailan, DAGL β -*knockout* saguen eremu berdinetan aldaketa nabarmenik detektatu ez den bitartean (Tanimura et al., 2010).

Laburbilduz, DAGL aktibitatea 2-AG sintesiaren erantzulea da ehun guztietan eta, nerbio-sistema zentralean, DAGL α eta DAGL β isozima biak espresatzen badira ere, DAGL α da 2-AG emariaren erantzule nagusia. Are gehiago, DAGL α nerbio-sistema zentralean duen banaketa eta espresio maila altua ikusita, 2-AG bidezko atzera-seinaleztapen sinaptikoaren erantzule nagusia dela ondorioztatu da. Horrekin bat, DAGL α -ren (baina ez DAGL β -ren) ezabaketak CB1 hartzailaren menpeko plastikotasun sinaptikoa galarazten du (Gao et al., 2010; Tanimura et al., 2010).

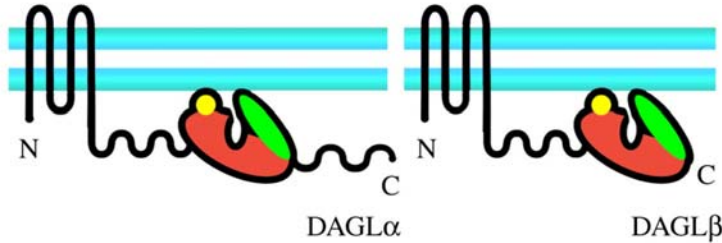
3. DAGL ISOZIMEN EGITURA-EZAUGARRIAK

DAGL α eta DAGL β isozimak egitura-homologia handia dute. Biek, amino terminal sekuentzia zitოსoliko labur baten ondoren, lau mintz-zeharreko domeinu dituzte eta, jarraian, domeinu katalitikoa. Bien arteko desberdintasun nagusia mutur karboxi terminalean aurki daiteke, DAGL β -k ez bezala, DAGL α -k 600 aminoazidoz osaturiko buztan luze samarra baitauka (Bisogno et al., 2003) domeinu katalitikoaren ostean.

3.1 Mintz-zeharreko Domeinuak

DAGL α -ren sekuentzian, lau mintz-zeharreko domeinuen aurrean dauden 22 aminoazidoek mutur amino terminal zitოსolikoa osatzen dute. Sekuentzia labur honen funtsa ezezaguna bada ere, garrantzitsua omen da, oso kontserbatuta baitago filogenetikoki urrun dauden espezieetan (esaterako, *Drosophila* eta Gizakia). Aitzitik, DAGL α eta DAGL β proteinen arteko homologia askoz baxuagoa da, %63 ingurukoa.

Bi zelula kanpoko lakio daude mintz-zeharreko I-II eta III-IV helizeen artean, eta zelula barneko beste bat II-III helizeen artean. Sekuentzia-analisiak zelula kanpoko lakioetan glikosilazio lekuak egon litezkela iradokitzen du (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y4D2>). Mintz-zeharreko helizeek entzimaren mintz-paketatzea eta seinaleztapen-osagai desberdinez osaturiko mikrodomeinu zehatzetan kokatzea erraztu lezakete, tetraspanina proteinen kasuan gertatzen den bezala (Yáñez-Mó et al., 2009). Are gehiago, helize hauek euskarri moduan joka lezakete beste proteinen finkapenerako, konplexu funtzionalen eraketa ahalbidetuko lukeena. Era berean, mintz-zeharreko domeinuak erreten baten partaideak izan litezke, DAG substratuaren domeinu katalitikorako sarrera erregulatzeko edo 2-AG jariaketa kontrolpean mantentzeko (Reisenberg et al., 2012). Hala ere, domeinu horien ezabaketak ez du inpakturik aktibitate katalitikoan eta ezta 2-AG jariaketan ere (Won et al., 2009).

Drosophila DAGLDAGL α DAGL β 

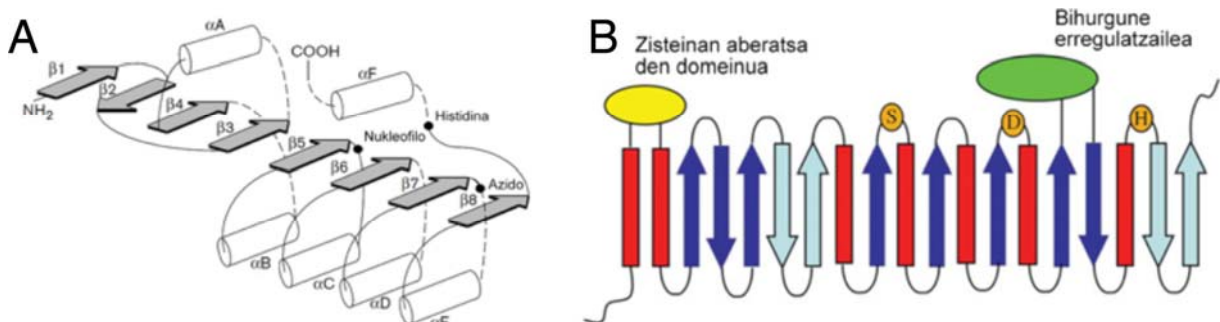
2. irudia. Ornodunen DAGL α eta DAGL β entzimen exoi-konposaketaren irudikapen eskematikoa. Marra bertikalek exoien arteko mugak adierazten dituzte. Marra beltz lodiek bi isozimetan kontserbatuta dauden sekuentziak adierazten dituzte. Mintz-zeharreko 4 domeinuak kodetzen dituen eremua urdinez ageri da, domeinu katalitikoa gorritz, eta DAGL α -ren buztan zitosolikoa grisez. Domeinu katalitikoaren baitan, zisteinetan aberatsa den sekuentzia horiz markatu da eta exoi bakar batek kodetutako erregulazio-bihurgunea berdez. Beheko irudian, DAGL α eta DAGL β entzimen egitura eskematikoki erakusten da. Proteinaren eremu desberdinei dagozkien exoien identifikazioa errazteko, gaineko marrazkian erabilitako kolore-kode bera erabili da. Irudiaren jatorria: Reisenberg et al., 2012.

3.2 Domeinu Katalitikoa

DAGL entzimak α/β hidrolasen superfamiliaren barnean kokatzen dira. Familia horretako entzima guztiek egitura-muin bat partekatzen dute eta, muin komun horretan, hidrogeno zubiz lotutako 8 β -xafla aurkitu ditzakegu. β -xafla horien artean, egitura desberdineko lotze sekuentziak kokatzen dira, α -helizeak gehienbat, baina baita β -xaflak edo egitura zehatzik gabeko lakioak ere. DAGL α eta DAGL β entzimek ondo karakterizatutako lipasen egitura-ezaugarriak kontserbatzen dituzte. Horien artean, serina/aspartiko/histidina hirukote katalitikoa aipagarria da, non hirukote hori osatzen duten aminoazidoen arteko distantzia kritikoa dirudien leku aktibo hidrofobikoa eratzeko (Bisogno et al., 2003; Pedicord et al., 2011). Beste ezaugarri bat hirukote katalitikotik gertu dagoen tamaina aldakorreko txertoa da (3. irudia). Txerto horrek konporta modura jokatzeko omen du. Hala, hutsune katalitiko hidrofobikoa uretatik babestuko luke eta, entzimaren mintz-adsortzioaren ondorioz, lipidoen sarrera baimentzeko irekiko litzateke (Nardini eta Dijkstra, 1999; Miled et al., 2003).

DAGL α eta DAGL β entzimen hidrolasa domeinuak 50-60 aminoazidoz osaturiko txerto ezezagun bat du 7. eta 8. β xafla kanonikoen artean (3. irudia), zentru katalitikorako substratu sarrera kontrola dezakeen lakio erregulazailea izan litekena (Reisenberg et al., 2012). Lakio erregulazailea beste lipasa gehienena baino nabarmen handiagoa da DAGL α eta DAGL β isozimetan, irekitze edo ixte egoeraren erantzulea konformazio-aldaketa izan

litekeela iradokitzen duena (Reisenberg et al., 2012). Domeinu horren azterketa zehatzetik, mekanismo erregulatzaileak nagusia fosforilazioa izan daitekeela ondoriozta daiteke. Izan ere, masa-espektrometria bidezko azterketek DAGL entzimen domeinu katalitikoan eta erregulatuaren fosforilazioaren ebidentziak aurkitu dituzte (Wang et al., 2006; Rikova et al., 2007; Dephoure et al., 2008; Brill et al., 2009; Huttlin et al., 2010; Hsu et al., 2011). Are gehiago, garun-mikrosometan eta behi-betsareko makiletan, PKA kinasaren menpeko gora-erregulazioa ikusi da DAGL aktibitatean (Pérez Roque et al., 1998; Rosenberger et al., 2007). Halaber, neurona sentorioetan PKA eta PKC kinasek estimulatutako 2-AG emaria frogatu da, antza denez, DAGL aktibitateak zuzenduta (Vellani et al., 2008). Gainera, DAGL α eta DAGL β entzimek PKA, PKC, CaMKII eta src kinasen substratuak izan litezkeen kontsentsu-motiboak dituzte (Reisenberg et al., 2012). Beraz, badirudi domeinu katalitikoaren fosforilazioak (lakio erregulatuaren barne) DAGL isozimen aktibitatea erregula dezakeela.



3. irudia. A. α/β hidrolasa tolestura "kanonikoaren" egitura sekundarioaren diagrama. α -helizeak eta β -zuntzak zilindro zuri eta gezi gris bezala adierazten dira hurrenez hurren. Hirukote katalitikoaren lokalizazioa puntu beltzek adierazten dute. Marra etenek aminoazidoen txerto funtzional desberdinak adierazten dituzte. **B.** DAGL α/β hidrolasen domeinu katalitikoaren tolesturaren topologia. Domeinu katalitikoaren egitura desberdinek (α -helizeak, gorri; β -xalflak, urdin argiz) lotzen dituzten 8 β -zuntzez (urdin ilunez) osatuta dago. Hirukote katalitikoaren (serina, aspartato eta histidina) biribil laranjek adierazten dute. Zisteinetan aberatsa den eremua eta balizko erregulazio eremua elipse hori eta elipse berde bezala erakusten dira hurrenez hurren. Irudiaren iturriak: Nardini et al. 1999; Reisenberg et al. 2012.

DAGL α (Kang et al., 2008) eta DAGL β (Martin eta Cravatt, 2009; Yang et al., 2010) entzimen palmitoilazioa beste erregulazio mekanismo gisa proposatu da. Palmitoilazioa itzulpen osteko eraldaketa itzulgarria da eta, horretan, entzima palmitoilatzaileen familia handi batek hartzen du parte. Palmitoilazioaren bidez, kate luzeko gantz-azidoak mintz-proteinen zisteinei lotzen zaizkie. Hala, proteinen hidrofobizitatea handituz, mintz-finkapena indartuko litzateke. Baitere, palmitoilazioak proteinen arteko elkarrekintza, zelularen

zeharreko trafikoa eta substratuen sarrera (Smotrys eta Linder, 2004; Resh, 2006; Fukata eta Fukata, 2010) bezalako prozesuak modula ditzake. Garapenean, DAGL α eta DAGL β entzimez gain, axoi-hazkuntza eta gidatze prozesuetan parte hartzen duten hainbat proteina palmitoilatu egiten dira (esaterako, L1, NCAM eta GAP-43). Beraz, palmitoilazioak mintz-mikrodomeinuetara bidera ditzake proteinak, seinaleztapen-konplexu eraginkorren eraketa baimenduko lukeena (Resh, 2006; Rimmerman et al., 2008; Yáñez-Mó et al., 2009).

3.3 DAGL α -ren Karboxi Buztana

Egitura aldetik, DAGL α eta DAGL β entzimen arteko desberdintasunik nabarmenena karboxi muturrean aurkitzen da (2. irudia). Zehazki, domeinu katalitikoaren ondoren buztan luze bat dago DAGL α , baina ez DAGL β isoziman. Beste aldetik, atzeranzko seinaleztapen endokannabinoidetan DAGL α , baina ez DAGL β , inplikaturik dago. Beraz, badirudi karboxi muturreko buztana 2-AG bidezko atzera-seinaleztapena ziurtatzeko beharrezkoa dela. Izan ere, buztan honetan Homer proteinak finkatzeko PPxxF kontsentsu-sekuentzia dago (Shiraishi-Yamaguchi eta Furuichi, 2007). Homer familiako euskarri-proteinek proteina desberdinen kokapen postsinaptikoa bideratzen dute (Shiraishi-Yamaguchi eta Furuichi, 2007). Beraz, DAGL α eta Homer proteinen arteko elkarrekintza beharrezkoa omen da DAGL α dentsitate postsinaptikoan koka dadin. Zentzu horretan, MAGLuR5 hartzaileak estimulatutako seinaleztapen endokannabinoida neurona sinpatikoetan molekularki "berreraikitze", DAGL α , CB1 hartzailea eta hartzaile glutamatergikoarekin batera, Homer-2b espresatzea beharrezkoa dela frogatu da (Won et al., 2009).

4. DAGL α ISOZIMAREN MENPEKO 2-AG SINTESIA. FUNTZIO FISIOLOGIKOAK

Oro har, DAGL α -k eragindako 2-AG ekoizpenari esleitu zaizkion funtzio fisiologiko nagusienak bi dira: garun-garapenean, axoi-hazkuntza eta axoi-gidatze prozesuetan parte hartzea eta, garun helduan, neurogenesiaren eta plastikotasun sinaptikoaren erregulazioa dira. Erdibizitza laburra duenez, 2-AG bere itu biologikotik hurbil sintetizatu behar da

mintzean (Sugiura eta Waku, 2002) eta, beraz, CB1 edo CB2 hartzaile kannabinoidetatik hurbil. Beraz, DAGL α kokatzen den tokietan 2-AGk funtzioaren bat duela adieraziko luke.

4.1 DAGL Aktibitatearen Rola Axoien Hazkuntza eta Gidatze Prozesuetan

Garapenean, CB1 hartzaileak espresio zabala du nerbio-sistema zentrolean: bizkar-muinean, zubian, goiko kolikuluan, hipokanpoan, hipotalamoan, usaimen-erraboilean eta neokortexean (Buckley et al., 1998). Honek CB1 hartzaileak garun garapenean garrantzi handia duela adierazten du. Horren ildotik, saguen garun garapenean, DAGL α eta DAGL β axoietan eta hazkuntza-konoetan CB1 hartzailearekin batera espresatzen direla ikusi izan da (Bisogno et al., 2003; Berghuis et al., 2007; Mulder et al., 2008).

Inerbazio leku zuzenetara hel daitezen axoi-gidatzea oso zehatza izan behar da garun garapenean. Horretarako, jasotzen dituzten estimuluen arabera, axoien hazkuntza-konoetako hartzaileek hazkuntza bultzatu ala inhibitu egingo dute. Hazkuntza faszikulatuan, axoi taldeak batera hedatzen dira axoi-traktuak eratzeko. Prozesu honetan, zelula-atxikidura molekulek (*cell adhesion molecules*, CAM) parte hartzen dute, besteak beste, aipagarrienak NCAM, N-kaderina eta L1 dira. Hasieran, atxikidurak berak (alboz alboko CAM bitarteko elkarrekintzak) hazkuntza prozesua bideratzen zuela uste zen, baina egun badakigu bigarren mezulari bidezko ohiko seinaleztapen aktibazioa beharrezkoa dela (Doherty et al., 1991). Izan ere, egungo hipotesien arabera, CAM gisako zelula-atxikidura proteinek eragindako erantzun biologiko konplexuak (hala nola, axoi-hazkuntza edo zelulen migrazioa) bigarren mezulari klasikoaren aktibazioaren menpe daude, CAM horiek atxikidura bultzatzeko duten gaitasuna edozein izanik ere (Cavallaro eta Dejana, 2011). Izan ere, CAM proteinek fibroblastoen hazkuntza-faktorearen hartzailearen (*Fibroblast growth factor receptors*, FGFR) ordeko estekatzaille moduan jokatzen dute axoi-hazkuntza bultzatzeko (Doherty eta Walsh, 1996; Sanchez-Heras et al., 2006) eta prozesu horretan PLC γ eta DAGL entzimen aktibitateak inplikaturik daudela ikusi zen. Horrela, DAGL entzimak PLC γ -k sortutako DAGa degradatuko luke. Horrela ekoiztutako 2-AGak, CB1 hartzailea aktibatuz, hazkuntza-konoaren mugikortasuna bultzatuko luke (Williams et al., 2003).

Gorago aipatutako aurrekariak DAGL menpeko seinaleztapen endokannabinoidak garun garapena erregulatzen duela agerian jartzen dute. Testuinguru horretan, DAGL aktibitateak FGFR eta CB1 hartzailen arteko komunikazioa zuzenduko luke, eta CB1 hartzailen aktibazioa beharrezkoa eta nahikoa izango litzateke axoi-hazkuntza martxan jartzeko (Williams et al., 2003). Beraz, DAGL menpeko seinaleztapen endokannabinoidak garun-garapenean duen garrantzia zalantzarik gabekoa da. Izan ere, DAGL aktibitatea edo CB1 bidezko seinaleztapena farmakologikoki inhibitzen edo genetikoki ezabatzen denean, garun konexioak asaldatzen direla ikusi da (Berghuis et al., 2007; Watson et al., 2008; Wu et al., 2010; Argaw et al., 2011). Dena den, ikerketa batzuen arabera CB1 hartzailen agonistek axoi-hazkuntza bultzatzen dutela adierazi badute ere (Williams et al., 2003; Keimpema et al., 2010), beste batzuen arabera murriz dezakete (Zhou eta Song, 2001; Berghuis et al., 2007; Argaw et al., 2011). Kontraesan horren zergatia ezezaguna bada ere, axoi-hazkuntzaren gainean estimuluek duten eragina zelula-fenotipoaren araberakoa izan daitekeela frogatu da (Williams et al., 1995). Are gehiago, zelula barneko AMP ziklikoaren kontzentrazioak estimulu baten aurrean neuronen erantzuna baldintza dezakeela proposatu da (Cai et al., 2001). Beraz, CB1 hartzailen menpeko erantzunen aldakortasuna testuinguru horretan aztertu beharko litzateke.

4.2 DAGL α Isozimaren Rola Garun Helduaren Neurogenesian

Garun helduaren neurogenesisia zelula-plastikotasunaren alderdietako bat da eta depresioaren prebentzioan, funtzio kognitiboen hobekuntzan, eta garun erreparazioa areagotzean inplikaturik dago. Neurogenesisia, batez ere, garapen enbrionarioan gertatzen da, hots, gorputzeko neurona gehienak garatzen ari diren garaian. Egun, jakin badakigu neurogenesisia garun helduaren bi eremu jakinetan mantentzen dela: eremu azpibentrikularra (*subventricular zone*, SVZ) eta hipokanpoko hortz-bihurguneko geruza pikortsuaren azpialdean (*subgranular zone*, SGZ). Eremu horietan etengabeko neuroblastoen ekoizpena gertatzen da eta, ondoren, neuroblasto horien diferentziazioaz sortutako neurona berriak aurre-eraturako zirkuituetan integratzen dira.

Nitxo neurogeniko horiek zenbait funtzio kognitiborekin erlazionatuta daude. Adibidez, SGZ eremuko neurogenesiak garrantzi handia du memoria espazialean (Snyder et al., 2005; Deng et al., 2010; Sahay et al., 2011). Memorian ezezik, depresio gaixotasunarekin ere zerikusirik baduela ikusi egin da. Alde batetik, depresioa hipokanpoko neurogenesiarekin murrizketarekin erlazionatu da. Bestetik, zenbait farmako antidepressibok SGZ eremuko neurogenesia berreskuratzen dute, eta kirol jardueraren eragin antidepressiboak SGZko neurogenesiarekin areagotzearekin erlazionaturik daudela ikusi da (Sun et al., 2017). Horrez gain, neurogenesia hipokanpalak epe-luzerako potentziazioa eta depresioa gisako plastikotasun sinaptikoan eragiten du (Massa et al., 2011).

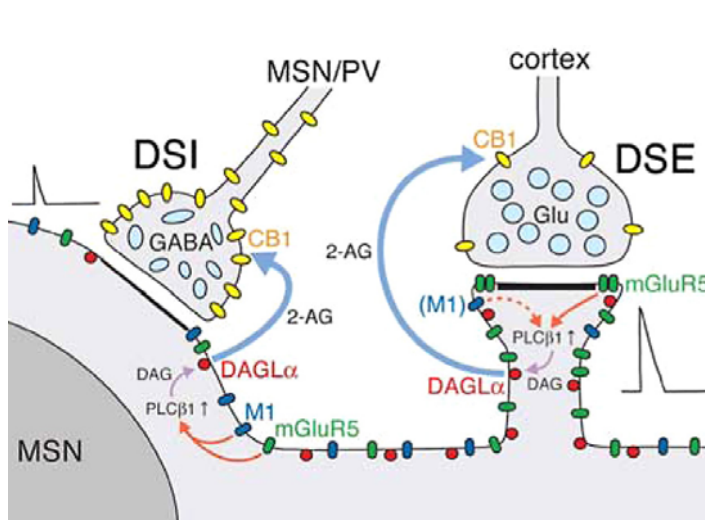
Garuneko nitxo neurogenetikorik handiena den SVZ eremua bentrakulu lateralaren kanpoko horman kokatzen da. Karraskari gazteen SVZn, milaka neuroblasto sortzen dira egunero, migrazio-korrente rostralek (*rostral migratory stream*, RMS) usaimen-errabilera joaten direnak. Han, neurona GABAergicotan desberdintzen dira, usaimen-errabilera zirkuituetan integratzen direnak (Lois eta Alvarez-Buylla, 1994; Lledo et al., 2008). SVZko neurona aitzindarietan, DAGL α -ren espresioa altua da, entzima horren aktibitatea neurogenesian garrantzitsua izan litekeela iradokitzen duena. Izan ere, DAGL α -*knockout* saguen SVZ eremuan neurona aitzindarien proliferazioa erdira murriztuta dago. Aitzitik, DAGL β -*knockout* saguetan ez da horrelakorik ikusi. Berriz, DAGL α - zein DAGL β -*knockout* saguetan neurri bereko (%50) murrizketa antzeman da hipokanpoan (Gao et al., 2010). CB1 eta CB2 hartzaileen ezabaketa genikoak ere neurogenesia murrizten du (Jin et al., 2004; Aguado et al., 2006; Palazuelos et al., 2006), seinaleztapen endokannabinoidearen areagotzeak (degradazio entzimatiakoaren inhibizioaren bidez) neurogenesia handitzen duen bitartean (Goncalves et al., 2008).

Laburbilduz, garapenean zein garun helduaren neurogenesian, seinaleztapen endokannabinoidea neurona zirkuituen eraketa zuzena ziurtatzeko beharrezkoa omen da eta, zeregin horretan, DAGL α ezinbesteko bitartekaria dela dirudi.

4.3 DAGL α Aktibitatearen Rola Plastikotasun Sinaptikoan

Askatutako neurotransmisore kantitatea eta sentikortasun postsinaptikoa epe luzera edo epe laburrera moldatzeko gertatzen den aldaketa multzoari plastikotasun sinaptiko deritzo. Plastikotasun sinaptikoa, seinaleztapen bide desberdinen aktibazioaren bidez edo/eta epe luzerako aldaketa estrukturalak eta biokimikoak direla medio, ezinbestekoa da sinapsiaren indarra gora ala behera zuzentzeko.

Asko dira plastikotasun sinaptikoa erregulatzen duten bideak eta, horien artean, seinaleztapen endokannabinoidearen menpekoek egundoko rola jokatzen dute (Harkany et al., 2008). Gorago azaldu den bezala (ikus 2.1 atala), atzera-mezulari gisa jokatuz, endokannabinoideek eraginkortasun sinaptikoa modulatu dute. Zehazki, neurona postsinaptikoek kitizikapen handiegia jasaten dutenean, endokannabinoideek neurona presinaptikoaren aktibitatea murrizten dute. Horrela, endokannabinoideek epe laburrerako eta epe luzerako aldaketak eragin ditzakete indar sinaptikoan. Gertakari elektrofisiologiko nagusienak depolarizazioak eragindako inhibizioaren eta kitizikapenaren ezabatzea dira (*Depolarization-induced suppression of inhibition* -DSI- eta *Depolarization-induced suppression of excitation* -DSE- hurrenez hurren). Plastikotasun sinaptiko fenomeno horiek erregistro elektrofisiologikoetan jartzen dira agerian, sinapsi inhibitzaile batean (DSI) edo sinapsi kitizikatzaile batean (DSE) indar sinaptikoa behera erregulatzen denean (4. irudia).



4. irudia. Konplexu estriatuko neurona arantzadun ertainen (*medium spiny neuron*, MSN) sinapsian, 2-AG bidezko atzera-seinaleztapenaren menpeko epe laburrerako plastikotasun sinaptikoaren oinarri molekular, estruktural eta fisiologikoak erakusten dituen irudia. Sinapsi kitizikatzaileetan (eskuina), CB1 hartzaile presinaptikoa oso urria denez, DSE eragiteko behar beste 2-AG (PLCβ1/DAGLα ardatzaren menpe) ekoiz dadin, beharrezkoa da depolarizazioa eta MAGLur5 hartzaileen aktibazioa aldi berean gertatzea. M1 hartzaileen aktibazioa lagungarria da DSE eragiteko, baina ez nahikoa. Sinapsi inhibitzaileetan (ezkerra), CB1 hartzailearen espresio presinaptikoa oso altua denez, depolarizazioa nahikoa da DSI eragiteko, horretan, MAGLur5 eta M1 hartzaileen aktibazioak lagundu badezake ere. Irudiaren iturria: Uchigashima et al., 2007.

Ikerketa askoren emaitzen arabera, sistema endokannabinoidearen menpeko plastikotasun sinaptikoaren erantzule nagusia 2-AG da (Straiker eta Mackie, 2009; Bin Pan et al., 2009; Kim eta Alger, 2010) eta, beraz, argi dago DAGL aktibitatea ere funtsezkoa izan behar dela. Testuinguru horretan, garapen aldietan DAGL isozimen espresioaren erregulazioa aztertzeraz bideratutako ikerketak bereziki interesgarriak dira. Nabarmenki, garapen goiztiarrean, DAGL entzimen espresioa oso handia da hazkuntza-konoetan. Ordea, neurona helduetan, DAGL isozimen espresio maila handia da dendritetan, baina ezin antzeman daiteke axoietan eta terminal presinaptikoetan (Oudin et al., 2011). Fenomeno horrek, seguru asko, DAGL aktibitatearen funtzio aldaketa adierazten du, axoi-hazkuntza/gidatze prozesuak erregulatzetik plastikotasun sinaptikoa erregulatzera. Izan ere, CB1 hartzaillearen eta DAGL α -ren espresioa elektroimikroskopia bidez aztertu denean, sinapsietan duten ispilu-profila argi ikusi da, CB1 alde presinaptikoan eta DAGL α alde postsinaptikoan kokaturik (Katona et al., 2006; Yoshida et al., 2006). Seinaleztapen endokannabinoidearen menpeko plastikotasun sinaptikoan DAGL isozima bakoitzaren ekarpena aztertu denean, DAGL α -ren nagusitasuna agerian jarri da. Hala, DAGL α -*knockout* saguetan, CB1 hartzaillearen menpeko plastikotasun sinaptikoa galtzen da, baina ez DAGL β -*knockout* saguetan (Gao et al., 2010; Tanimura et al., 2010).

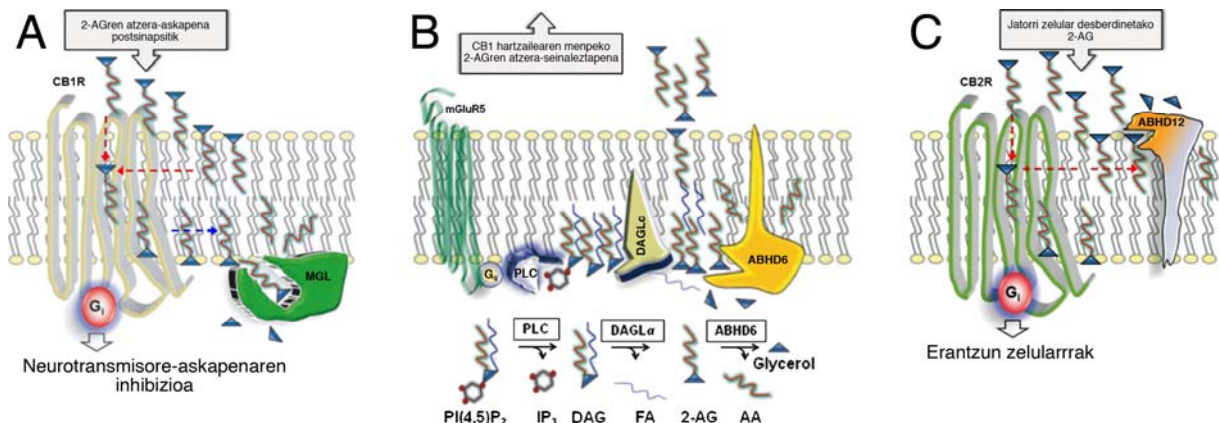
5. 2-AG KONTZENTRAZIOAREN ERREGULAZIO MEKANISMOAK

2-AG sintesiaren eta degradazioaren arteko orekak DAGL menpeko seinaleztapen endokannabinoidea kontrolpean mantentzen du. 2-AG endokannabinoidea behin sintetizaturik, serina-hidrolasa bidezko degradazioa jasaten du. Horren entzima erantzule nagusiak MAGL, α/β hidrolasa domeinudun proteina 6 (ABHD6) eta α/β hidrolasa domeinudun proteina 12 (ABHD12) dira. Izan ere, entzima horiek 2-AG degradazioaren %99 eragiten dute (Savinainen et al., 2012).

Garunean, 2-AG hidrolisiaren %85 MAGLk egiten du eta, beraz, degradazioaren erantzule nagusia da. Entzima horren kokapena aztertu denean (ikus 2.1 atala), MAGL terminal presinaptikoetan eta CB1 hartzaillearen ondoan kokatzen dela ikusi da (Dinh et al.,

2002b; Gulyas et al., 2004; Ludányi et al., 2011). Kokapen horrek, MAGLk endokannabinoide bitartezko CB1 hartzailearen estimulazioa erregulatzea ahalbidetuko luke eta, dentsitate postsinaptikoan, MAGL espresio gabeziak depolarizazioak eragindako 2-AG metaketa eta atzera-seinaleztapena posible egingo luke (5. irudia, A).

MAGL aktibitateak 2-AG degradazioan duen garrantzi handiaz gain, AA sorkuntza eta mantentze prozesuetan betetzen duen rola ez da arbuia behar. *Knockout* animalietan egingako entseguek DAGL/MAGL bideak AAren sintesian duen garrantzia berretsi dute (Gao et al., 2010). Testuinguru honetan, nerbio-sistema zentralean, MAGL menpeko 2-AG hidrolisiak prostaglandina proinflamatorioen sintesia bultzatzea proposatu da (Nomura et al., 2011). Are gehiago, MAGL inhibitzaile batekin tratatutako Parkinson gaixoetan antzeman den hobekuntza AA menpeko erantzun inflamatorioen blokeoarekin eta 2-AG menpeko seinalaztapenaren areagotzearekin erlazionatu da (Nomura et al., 2011).



5. irudia. A. Presinapsian, CB1 hartzaileari lotutako 2-AGa disoziatzen denean, MAGL bidezko inaktibazioa gerta daiteke. Disoziatu ondoren, difusio lateralaz (gezi eten urdina), 2-AG molekulak MAGLren domeinu katalitikora gerturatzen dira, buru polarra domeinu katalitiko aldera orientaturik. **B.** ABHD6 entzima ekoizpen tokitik hurbil estrategikoki kokatua dago, sintetizatu berri den 2-AG maila erregulatzeko. Gune katalitikoak zitosol aldera orientatuta egonda sintetizatu berri den 2-AGa degrada dezake. **C.** Mikroglia zeluletan, ABHD12 entzimak, zelula kanpoko 2-AG mailak kontrolatuz, CB2 hartzaileen bidezko seinalaztapenaren erregulazioan izan lezakeen funtzioa. Irudiaren iturria: Savinainen et al., 2012.

ABHD6 eta ABHD12 entzimek dagokienez, α/β hidrolasa lipasen superfamiliako kideak dira. Biak mintz-zeharreko proteinak izanik, ABHD6ren gune-katalitikoak zitosol aldera dagoen bitartean, ABHD12rena zelularen kanpoaldera dago (Savinainen et al., 2012) (5. irudia, B). ABHD6 entzima mintz postsinaptikoan kokatuta dagoenez, gehiegizko 2-AG emaria kontrola dezake. Izan ere, entzima honen inhibizio akutuak aktibitate sinaptikoaren menpeko 2-AG metaketa areagotzen du eta, garun-kortexeko xafletan, CB1 menpeko LTDa

errazten du. Garunean, ABHD12 entzima mikroglia espresatzen da gehienbat eta, han, CB2 hartzaileen bidezko seinaleztapenaren erregulazioan parte hartzen omen du (Savinainen et al., 2012) (5. irudia, C).

Komentatu diren bide hidrolitikoek gain, 2-AG ziklooxigenasa-2 (*Cyclooxygenase-2*, COX2) entzimaren substratua da. Beherago azalduko den bezala, bide hori prostaglandina glizerol esterren iturria da, ondo karakterizatu gabeko erantzun farmakologikoen erantzule izan litezkeenak (Kozak et al., 2004).

6. PLCB/DAGL α SEINALEZTAPENA NUKLEOAN

Gorago azaldu den bezala, garunean, 2-AG endokannabinoideari esleitu zaizkion funtzio gehien-gehienak seinaleztapen sinaptikoaren doitzearekin erlazionatuta daude, non 2-AGk atzera-mezulari gisa jokatzeko duen. Mintz postsinaptikoan, 2-AG ekoizpena kontrolatzen duen makineria oso ondo deskribatu bada ere (Katona eta Freund, 2008), 2-AGren biosintesi-makineria bestelako konpartimentu zelularretan ere kokatzen dela frogatzen duten aurkikuntzak ugaritu dira azken urteotan (Farooqui eta Horrocks, 2005; Montana et al., 2012; García del Caño et al., 2014; García del Caño et al., 2015). 2-AGk erdibizitza laburra izanik, kokapen horietan sintesi-makineria osoa egoteak 2-AG bere ituetatik gertu sintetizatzea ahalbidetuko luke.

Nukleoan, fosfoinositidoen sintesi- eta degradazio-makineria existitzen dela onartuta dago. Makineria hori zelula-mintzeko fosfoinositidoen ziklotik bereizita dago eta proliferazio eta diferentziazio zelularrean parte hartzen duela ikusi da (Kuriki et al., 1992; Divecha et al., 1995; Matteucci et al., 1998; Faenza et al., 2003; Fiume et al., 2005; Faenza et al., 2007; Ramazzotti et al., 2008; Faenza et al., 2012). Bestalde, fosfolipasa aktibitatearen menpeko fosfoinositidoen biosintesi- eta degradazio-makineriaz gain, zenbait lerro zelularren nukleoan, DAGL aktibitatea ere badagoela demostratu da, esaterako, LA-N-1 neuroblastoma zelulen nukleoan. Zelula horietan, fosfolipasa familia desberdinetako isozimen menpeko aktibitatearen ondorioz ekoiztutako DAG espezieak DAGL bidez hidrolizatzen dira (Antony et al., 2001; Farooqui eta Horrocks, 2005). Aldi berean, DAG kinasa (*Diacylglycerol kinase*,

DAGK) aktibitatea frogatu da nukleoan (Martelli et al., 2002; Hozumi et al., 2003). Hala, DAGL eta DAGK aktibitate nuklearrek lekuko DAG kontzentrazioa eta, beraz, PKC entzimaren aktibazioa kontrola dezakete. Aurrekari hauek, fosfolipasen menpeko DAG ekoizpena eta DAGL aktibitateak bideratutako 2-AG biosintesia kateatuta egon litezkela iradokitzen dute.

Nukleoan, DAG emariaz arduratzen den entzima nagusia fosfatidil inositol PLC familiako PLC β 1 isozima da, eta bere aktibitateak ziklo zelularren efektore batzuren erregulazioan dituen eraginak ezagunak dira. PLC β 1 nuklearraren aktibazio eta inaktibazio-mekanismoak ondo bereizten dira mintz plasmatikoko dauden mekanismoetatik. Mintz plasmatikokoan, aktibatutako G α_q subunitateak (G α_q -GTP) PLC β 1 aktibitatea suspertzen du eta horrek G $_{q/11}$ proteinei akoplatutako mintz-hartzaile metabotropikoen seinaleztapena inplikatzeko du. Inaktibazioa, PLC β 1 berak duen GAP (*GTPase activating protein*, GTPasa aktibatzen duen proteina) aktibitateak bideratzen du (Wallace et al., 1991; Sallés et al., 1993a; Sallés et al., 1993b). Nukleoan, ordez, PLC β 1 entzimaren aktibazioa MAPK menpeko fosforilazioak bideratzen du (Xu et al., 2001b; Martelli et al., 2002) eta inaktibazioa PKC α -k katalizatutako fosforilazioaren menpekoa da (Xu et al., 2001a).

Nolanahi ere, PLC β 1 nuklearra ziklo zelularrean inplikaturik dagoela ikusi da eta, testuinguru zelularren arabera, proliferazioa ala diferentziazioa bultzatu dezake. Esaterako, sagu-eritroleuzemia (MEL) zeluletan, PLC β 1 nuklearrak hazkuntza-faktoreek estimulatutako proliferazioa bultzatzen du eta DMSOk eragindako diferentziazioa geldotzen du (Kim et al., 1996; Matteucci et al., 1998). Ordez, PLC β 1 nuklearraren aktibitate katalitikoa ezinbestekoa da IGF-1 (*insuline-like growth factor*, intsulina bezalako hazkuntza faktorea) bidez bultzatutako 3T3-L1 pre-adipozitoen (O'Carroll et al., 2009) eta C2C12 sagu mioblastoen diferentziaziorako (Faenza et al., 2003). Lan honekin erlazionatuago, gure aurretiko emaitzek PLC β 1 isozimak zelulen diferentziazio neuronalean parte hartzen duela iradokitzen dute, PLC β 1 espresioaren ezabaketak eta haren gainespresioak NT2 zelulen diferentziazio

neuronalak erabat galarazten eta bultzatzen baitute hurrenez hurren (González-Burguera et al., 2015).

PLC β 1 nuklearrak bultzatutako proliferazio eta diferentziazio erantzunetan, ziklinen menpeko kinasek (*Cyclin-dependent kinase*, Cdk), ziklinek, E2F familiako transkripzio faktoreek eta retinoblastomak (Rb) osatzen duten seinaleztapen-ardatzak giltza moduan jokatzen du ziklo zelularren efektoreak erregulatzeko (Faenza et al., 2000b; Faenza et al., 2003; O'Carroll et al., 2009). Efektore horien artean, garrantzitsuenetako bat peroxisomen proliferaziorako aktibatutako gamma hartzailea (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR γ) da (Fajas et al., 2002; Abella et al., 2005; Sarruf et al., 2005). Nabarmenki, 2-AG PPAR γ -ren agonista endogenoa dela ikusi da (Raman et al., 2011) eta, beraz, PLC β 1 nuklearraren aktibitatea eta PPAR γ -k bultzatutako diferentziazio neuronalak lotzen dituen mekaniak 2-AG izan litekeela planteatu daiteke, eta baita ere 2-AG nuklearraren degradazio oxidatiboz sor litezkeen ziklopentenona glizerol esterrak (bereziki, 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -J2 prostaglandinaren glizerol esterra; 15d-PGJ2-G). Aipatzekoa da PLC β 1 bidezko PPAR γ aktibazioak 3T3-L1 adipozitoen diferentziazioa mantentzen duela (O'Carroll et al., 2009). Oso espekulatiboa bada ere, beharbada, 2-AG nuklearra edo bere oxidaziotik sortutako metabolitoek bitartekari gisa joka lezake adipozitoen eta neurona helduen egoera postmitotikoa mantentzen. Baitere, PPAR γ hartzailearen aktibazioaren bidez, 2-AGk neurona helduen babesle gisa joka lezake. Izan ere, PPAR γ agonistek neuronan biziraupena faboratzen dutela ikusi da (Sun et al., 2008; Zhao et al., 2011; Gray et al., 2012; Corona eta Duchon, 2016; Díaz-Alonso et al., 2016).

Aurrekari bibliografikoetan oinarritutako ideia hauek oso interesgarriak izanik ere, PLC β 1/DAGL α /2-AG seinaleztapen-ardatza nukleo neuronalean egon badagoela egiaztatzea ezinbesteko aurrebaldintza da hipotesi sendoak planteatu ahal izateko.

II. HELBURUAK

1. DAGL α ENTZIMAREN ESPRESIOA ARRATOI HELDUAREN GARUN-KORTEXEAN AZTERTZEA.

1.1 DAGL α -ren aurkako antigorputzen espezifikotasunaren balioestea.

- Antigorputzen karakterizazioa immunohistokimia eta immunofluoreszentzia bidez.
- Antigorputzen espezifikotasunaren karakterizazioa HEK293 zeluletan.
- Antigorputzen karakterizazioa *Western blot* teknikaren bidez.

1.2 Immunohistokimia- eta immunofluoreszentzia-tekniken bidez, DAGL α -ren banaketa garun-kortexean aztertzea.

2. DAGL α ENTZIMAREN ESPRESIOA GARUN-KORTEXEKO MINTZ ZELULARRETAN ETA NUKLEO OSOETAN AZTERTZEA.

2.1 DAGL α -ren konpartimentazioaren azterketa garun-kortexetik isolatutako mintz zelularretan.

- Garun-kortexeko frakzio azpizelularrak isolatzeko prozeduraren balioestea.
- DAGL α -ren banaketa garun-kortexetik isolatutako frakzio azpizelularretan *Western blot* bidez aztertzea.

2.2 DAGL α -ren espresioa garun-kortexeko nukleo neuronaletan aztertzea.

- Garun-kortexeko nukleo osoak isolatzeko prozedura balioestea.
- Garun-kortexeko nukleo osoetan, DAGL α -ren espresioa frogatzea.
- Garun-kortexeko nukleo osoetan, PLC β isozimen espresioa aztertzea.

3. DAGL α -REN KONPARTIMENTAZIO AZPINUKLEARRA GARUN-KORTEXEKO NUKLEO NEURONALETAN AZTERTZEA.

3.1 DAGL α -ren konpartimentazioa garun-kortexeko nukleoen azpifrakzioetan aztertzea.

- Garun-kortexeko frakzio azpizelularrak isolatzeko prozeduraren balioestea.
- DAGL α -ren banaketa garun-kortexeko nukleoen azpifrakzioetan *Western blot* bidez aztertzea.

3.2 DAGL α -ren konpartimentazioa nukleo osoetan immunofluoreszentzia bidez aztertzea.

3.3 DAGL α -ren eta PLC β isozimen ko-konpartimentazioa nukleo osoetan aztertzea.

4. PLC β ETA DAGL α AKTIBITATEEN MENPEKO 2-AG EKOIZPEN ENDOGENOA GARUN-KORTEXEKO NUKLEO OSOETAN AZTERTZEA.

4.1 m-3M3FBS konposatuak estimulatutako 2-AG ekoizpen endogenoa nukleo osoetan aztertzea.

4.2 Kaltzioak bultzatutako 2-AG ekoizpen endogenoa nukleo osoetan aztertzea.

5. DAGL AKTIBITATEAREN MENPEKO 2-AGREN EKOIZPEN-ZINETIKA GARUN-KORTEXEKO NUKLEOEN MATRIZEAN AZTERZEA.

6. 2-AG DEGRADAZIO ENTZIMATIKOA GARUN-KORTEXEKO NUKLEOEN MATRIZEAN AZTERZEA.

6.1 2-AG degradazioan inplikaturiko entzimen espresio eta konpartimentazio nuklearra aztertzea.

6.2 2-AG degradazioan inplikaturiko entzimen aktibitatea matrize nuklearrean aztertzea.

III. MATERIALAK

1. LAGIN BIOLOGIKOAK

1.1 Immunohistokimia eta Immunofluoreszentziarako Laginak

Imunohistokimiarako laginak lortzeko, 200-250 g eta 8-10 aste artean zituzten arratoi arrak kloral hidrato gaindosi batekin (1 g/kg i.p.; Panreac Química S.A. Bartzelona) anestesiatu genituen. Lo zeuden bitartean, bihotzetik %0,37 sodio sulfuro (p/b) soluzio batekin perfunditu genituen 4 minutuz ehunak odolez garbitzeko. Ondoren, %4 paraformaldehido soluzioa (0.1 M fosfato tanpoian -PB-, pH 7.4) perfunditu genien beste 4 minutuz ehunak fixatzeko. Ehunak behin fixatuta, garunak garezurretik atera eta fixapen-tanpoi berdinean sartu genituen 4 orduz 20-25°C tenperaturan. Ondoren sakarosa %30 zeukan PB tanpoian sartu eta 4°C-tan mantendu genituen hondoratu arte. Jarraian, kontrol-sentsore batez (5MP BFS-Physitemp Controller) hornitutako mikrotomo bat (Leitz-Wetzlar 1310; Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, Germany) erabiliz, garunaren 40 µm lodierako ebaketa koronalak egin genituen. Moztutako ebaketak iragazkortzeko eta babestuta mantentzeko, DMSO kontzentrazio gorakorretan (%5, %10, eta %20 PBS tanpoian) sekuentzialki inkubatu genituen. 10 minutuz mantendu genituen DMSO kontzentrazio bakoitzean konstanteki irabiatzen genituen bitartean. Azkenengo inkubaketaren ostean, ahalik eta likido bolumenik handiena kenduta, pintzel batekin arretaz batu eta eppendorf hodietan bildu genituen. Bukatzeko, hodiak hiru aldiz sartu eta atera genituen arinki -80°C-tan zegoen isopentanoan horrela ebaketei izozte ziklo azkarrak aplikatzeko. Azkenik, laginak -80°C-tan gorde ziren.

1.2 Immunoblot eta Kromatografia Likidoari Lotutako Masa Espektrometria (LC/MS)

Immunoblot eta LC/MS esperimentuetarako adin eta pisu berdineko anestesiatutako arratoi arrak 0,1 M, pH 7.4 fosfato gatz tanpoiarekin (PBS) bihotzetik perfunditu genituen. Ondoren, garuna garezurretik azkar atera eta kortexa garunetik banandu genuen. Aurrerantzean, kortex laginak une oro izotzaren gainean manipulatu ziren. Banandutako kortexak jarraian prozesatu genituen "Metodoak" ataleko 1. Atalburuan deskribatutako prozedurekin edo -80°C-tan gorde ziren prozesatu genituen arte.

1.3 Zelulen Kultura eta Transfekzioa

Giza teratokartzinomatik eratorritako NT2 zelulak (NTERA-2 cl.D1 [NT2/D1], ATCC® CRL-1973™) 75 cm²-ko plastikozko kultura-flaskoetan (frakzionamendu zelularrerako) edo poli-D-lisinaz tratatutako estalkien gainean (immunofloreszentzia entseguetarako) erein genituen, EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium* -ATCC® 30-2003™) kultura-medio osoan (% 10 behi-sueroa eta % 1 penizilina-estreptomizina). Zelulak %80ko konfluentziara heldu zirenean, transfekzioa egin genuen DAGL α -HA (*Hemagglutinin*, hemagglutinina -HA-epitopoa, giza DAGL α proteinaren karboxilo muturrean fusionaturik) proteina errekonbinantearen adierazpena bultzatzeko. Horretarako, DAGL α -ren cDNA sekuentzia txertaturik zuen pPM-C-HA bektorea (Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, Canada) erabili genuen. Aurretiazko entseguetan, Lipofectamine® 2000 (Life technologies) eta Xfect™ (Clontech) transfekzio medioak probatu genituen ondorengo esperimenduetan eraginkorrena aukeratzeko. Transfekzioa hornitzailearen gomendioak jarraituz burutu genuen. Kasu guztietan, erabilitako DNA plasmidiko kantitatea 0.5 μ g/cm²-koa izan zen. Transfekziotik 24 ala 48 ordu igaro ondoren, zelulak frakzionamendurako edo immunofluoreszentziarako prozesatu ziren (ikus "Metodoak" atala).

2. MATERIAL FUNGIBLEA

2.1 Erreaktibo Orokorrak

- Azida Sodikoa (Panreac, 122712).
- Azido Klorhidrikoa %37 (Panreac).
- Behi albumina serikoa (Sigma, A3608).
- Bradford Erreaktibo (Bio-Rad, 500-0006) eta γ -Globulina estandarra (Bio-Rad, 500-0208).
- Bromofenol Urdina (Sigma, 11,439-1).
- DL-Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, 43815).
- EDTA (Sigma, ED).
- EGTA (Sigma-Aldrich, E4378).
- Filtro-Papera (Bio-Rad, 165-0962).

MATERIALAK

- Glizerola (Sigma-Aldrich, G8773).
- Glizina (Bio-Rad, 161-0724).
- Isopentanoa.
- Kloral hidratoa (Panreac Química).
- Magnesio Kloruro Hexahidratao (Panreac, 131396).
- Metanol Absolutua (Sigma-Aldrich, 32213).
- Mowiola (Calbiochem, 17951).
- Paraformaldehidoa (Panreac, 141451).
- Potasio Kloruroa (Sigma-Aldrich, P5405).
- PPD (Sigma-Aldrich, P1519).
- Sakarosa (Sigma-Aldrich, S0389).
- Sodio Fosfato dibasikoa ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, Sigma-Aldrich, S0876).
- Sodio Fosfato monobasikoa (PO_4NaH_2 , Sigma, S0751).
- Sodio Hidroxidoa (Probus, 131687).
- Sodio Kloruroa (Sigma-Aldrich, S7653).
- Sodio Sulfuro .
- Tris[Hidroximetil]aminometanoa (Trizma® Base, Sigma-Aldrich, T1503).
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787).
- Tween-20 (Bio-Rad, 170-6531).
- Urea (Sigma-Aldrich, U5378).
- 96 putzutako EIA/RIA Plakak (Corning, 3590).

2.2 Erreaktibo eta Material Espezifikoak

2.2.1 Immunohistokimia

- ABC (Abidina-Biotina konplexua).
- Diaminobenzidina (DAB).
- Hidrogeno Peroxidoa (H_2O_2).
- DPX (Fluka).

2.2.2 LC-MS/MS

- Hidrogeno Peroxidoa (H₂O₂).
- 1-AG (Cayman Chemicals, 62150).
- 1-AG-d5 (Cayman Chemicals, 362152).
- 2-AG (Cayman Chemicals, 62160).
- 2-AG-d5 (Cayman Chemicals, 362162).
- AA (Cayman Chemicals, 10007278).
- AA-d8 (Cayman Chemicals, 390010).
- Acetonitrilo Multisolvent® (Scharlab, AC03332500).
- Azetonitrilo isokratikoa (Panreac, 263092).
- Azido formikoa (Sigma-Aldrich, 33015).
- D609 (Tocris Bioscience, 1437).
- DAG (1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol; Cayman Chemicals 10008650).
- Ditiotreititol (DTT).
- Edelfosina (Tocris Bioscience, 3022).
- Hexanoa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- JZL184 (4-[Bis(1,3-benodioxol-5-yl)hydroxymethyl]-1-piperidinecarboxylic acid 4 nitrophenyl ester; Tocris Bioscience 3836).
- m-3M3FBS (Tocris Bioscience, 1941).
- N-arakidonilmaleimida (NAM) (Tocris Bioscience, 3329).
- o-3M3FBS (Tocris Bioscience, 1942).
- R59949 (Merck, 266788).
- R-flurbiprofenoa (R-2-fluoro-alpha-methyl-4-biphenylacetic acid; SIGMA, 545740).
- Tetrahidrolipstatina (THA) (Tocris Bioscience, 3540).
- WWL70 (N-methyl-N-[[3-4(4-pyridinyl)phenyl]methyl]-4'-(aminocarbonyl)[1,1'-biphenyl]-4-yl carbamic acid ester; Tocris Bioscience, 3252).

2.2.3 Western Blot

- Acrilamida/Bis-acrilamida, %40ko soluzioa (Bio-Rad, 161-0148).
- Amonio persulfatoa (Bio-Rad, 161-0700).
- BCA proteina-kuantifikazio *kit*-a (abcam, ab102536).
- Esne Gaingabetu Hautsa (Bio-Rad, 170-6404).
- Bromofenol Urdina (Sigma-Aldrich, 11439).
- CL-XPosure Film Fotosentikorra (Thermo Scientific, 34089).
- Coomassie Urdina (Bio-Rad, 161-0400).
- ECL Clarity™ Western Sustratua (Bio-Rad, 170-5060).
- Errebelatzailea (Sigma-Aldrich, 7042).
- Filme fotosentikorren fixatzailea (Sigma-Aldrich, P7167).
- Fenilmetilsulfonilo fluoruroa (PMSF, Sigma-Aldrich, P7626).
- Iodoazetamida (Sigma-Aldrich, I1149).
- *Laemmli* Tanpoia (Bio-Rad, 161-0737).
- Precision Plus Protein™ kolore-estandarrak (Bio-Rad, 161-0374).
- PVDF Immun-Blot® Mintza (Bio-Rad, 162-0177).
- RNasarik gabeko DNasa I errekonbinantea (TaKaRa, TB 2270A).
- TEMED (Bio-Rad, 161-0800).

2.3 Antigorputz Primarioak

Itua	Diluzioa		Hostalaria Klonalitatea	Isotipoa	Antigenoa	Erreferentzia
	IF/IHC	WB				
ABHD12		1:2500	Ahuntz- poliklonala		C-REFLGKSEPEHQH peptidoa	Sigma-Aldrich, SAB2500016
COX2		1:2500	Ahuntz- poliklonala	IgG	Giza jatorrizko COX2 entzimaren karboxi muturrean kokatutako peptidoa	Santa Cruz Biotechnology, sc- 1745
DAGLα (Af1080)	1:250		Ahuntz- poliklonala	Sueroa	Sagu DAGLα entzimaren karboxi muturraren 42 aminoazidoi dagokien peptidoa (NM198114)	Frontier Science, DGLα-Go-Af1080-1
DAGLα (Af380)	1:250	1:1000	Untxi- poliklonala	Sueroa	Sagu DAGLα karboxi muturraren 42 aminoazido (NM198114)	Frontier Science, DGLα-Rb-Af380-1
DAGLα (C-14)	1:250		Untxi- poliklonala	Sueroa	Giza DAGLα-ren domeinu zitoplasmatikoko karboxi muturra	S ^{la} Cruz Biotech., sc-133307
DAGLα (N-13)	1:250		Untxi- poliklonala	Sueroa	Giza DAGLα-ren zelulaz kanpoko domeinuetako batean kokatzen den sekuentzia peptidikoa	S ^{la} Cruz Biotech., sc-133308
Golgi 58K		1:1000	Sagu- monoklonala	IgG ₁	Arratoi gibeletik isolatutako Golgi 58K proteina	Abcam, ab21685
GRP78/BiP		1:2000	Untxi- poliklonala	IgG	Sagu GRP78/BiP proteinaren karboxi muturreko azken 55 aminoazidoi dagokien peptidoa	Abcam, ab21685
HA	1:1000		Sagu- monoklonala	IgG ₁	CYPYDVPDYASL peptidoa	Covance, Cod. MMS-101P, 16B12 klona
Histona H3		1:500	Untxi- poliklonala	IgG	H3 histonaren 1-20 bitarteko aminoazidoi dagokien peptido sintetikoa	Chemicon, 382157
Lamina B1	1:100		Sagu- monoklonala	IgG ₁	Giza epitelio kartzinoma HeLa zeluletatik purifikatutako nukleo zelularrak	S ^{la} Cruz Biotech, sc-56144, 8D1 klona
MAGL		1:1000	Ahuntz- poliklonala	IgG	Giza MAGL entzimaren 17-29 bitarteko aminoazidoi dagokien peptido sintetikoa	Abcam, ab77398
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa		1:5000/1:2000	Sagu- monoklonala	IgG ₁	Arkume gibeletik purifikatutako Na ⁺ /K ⁺ ATPasa-ren α1 azpiunitatea	Sigma-Aldrich, A- 277, M8-P1-A3 klona
NeuN/Fox-3	1:1000	1:2000/1:4000	Sagu- monoklonala	IgG ₁	Sagu garunetik purifikatutako nukleoak	Chemicon (Milipore), MAB377, A6 klona
NMDAR1		1:1000	Untxi- poliklonala	IgG	Giza NMDAR1 hartzailearen 897. serina hondarraren inguruko peptidoa	Abcam, ab52177
NPCx		1:5000	Sagu- monoklonala	IgG ₁	Poro nuklear konplexuen nahasketa	Abcam, ab24609, Mab414 klona
PLCβ1 (N-ter)		1:8000	Sagu- monoklonala	IgG ₁	Giza PLCβ1ren 4-159 aminoazidoen bitarteko peptido sintetikoa	BD Transduction Labs., 610924, 16/Phospholipase Cβ1 klona
PLCβ1 (R233)	1:250		Untxi- poliklonala	IgG	Giza PLCβ1ren 831-1063 aminoazidoaren bitartean kokatzen den peptido sintetikoa	S ^{la} Cruz Biotech., sc-9050
PLCβ2	1:100	1:500	Untxi- poliklonala	IgG	Giza PLCβ2ren karboxi muturretik gertu kokatzen den epitopoa	S ^{la} Cruz Biotech., sc-206
PLCβ4	1:100	1:500	Untxi- poliklonala	IgG	Sagu PLCβ4ren karboxi muturrean kokatutako epitopoa	S ^{la} Cruz Biotech., sc-404

MATERIALAK

SNAP-25	1:40000	Sagu-monoklonala	IgG1	Giza <i>post-mortem</i> garuneko prestakin sinaptiko gordina	Abcam, SP12: ab24732
SC35	1:500	Untxi-monoklonala	IgG1	Partzialki purifikatutako spliceosomak	Abcam, ab11826, SC-35 klonak
CD90/Thy1	1:6000	Untxi-monoklonala	IgG	Giza CD90/Thy1 proteinaren N-terminaletik gertu kokatzen den epitopoa	Abcam, ab92574, EPR3132 klonak
β -tubulina	1:1000	Sagu-monoklonala	IgG1	β -tubulinaren bost isoformen karboxilo muturrean, 281-446 aminoazidoen bitartean aurki daitekeen epitopoa	Sigma-Aldrich, T4026, TUB 2.1 klonak

1. taula. Erabilitako antigorputz primarioak

2.4 Antigorputz Sekundarioak

- Biotinylated rabbit anti-goat IgG (H+L) affinity purified (Vector Laboratories, BA-5000).
- Alexa Fluor 568 Goat anti-Mouse (Invitrogen, A11031).
- Alexa Fluor 488 Donkey anti-Goat (Invitrogen, A11055).
- Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit (Invitrogen, A11034).
- DyLight 549 Donkey anti-Rabbit (Jackson Immuno Research, 711-506-152).
- Anti-rabbit IgG HRP conjugate (Amersham, NA934).
- Anti-goat IgG HRP conjugate (Sigma-Aldrich, A5420).

2.5 Suero Normalak

- Ahuntz-suero normala (*normal goat serum* -NGS-, Vector Laboratories, U0328).
- Untxi-suero normala (*normal rabbit serum* -NRS-, Vector Laboratories, T1127).
- Asto-suero normala (*normal donkey serum* -NDS-, Vector Laboratories, U0111).

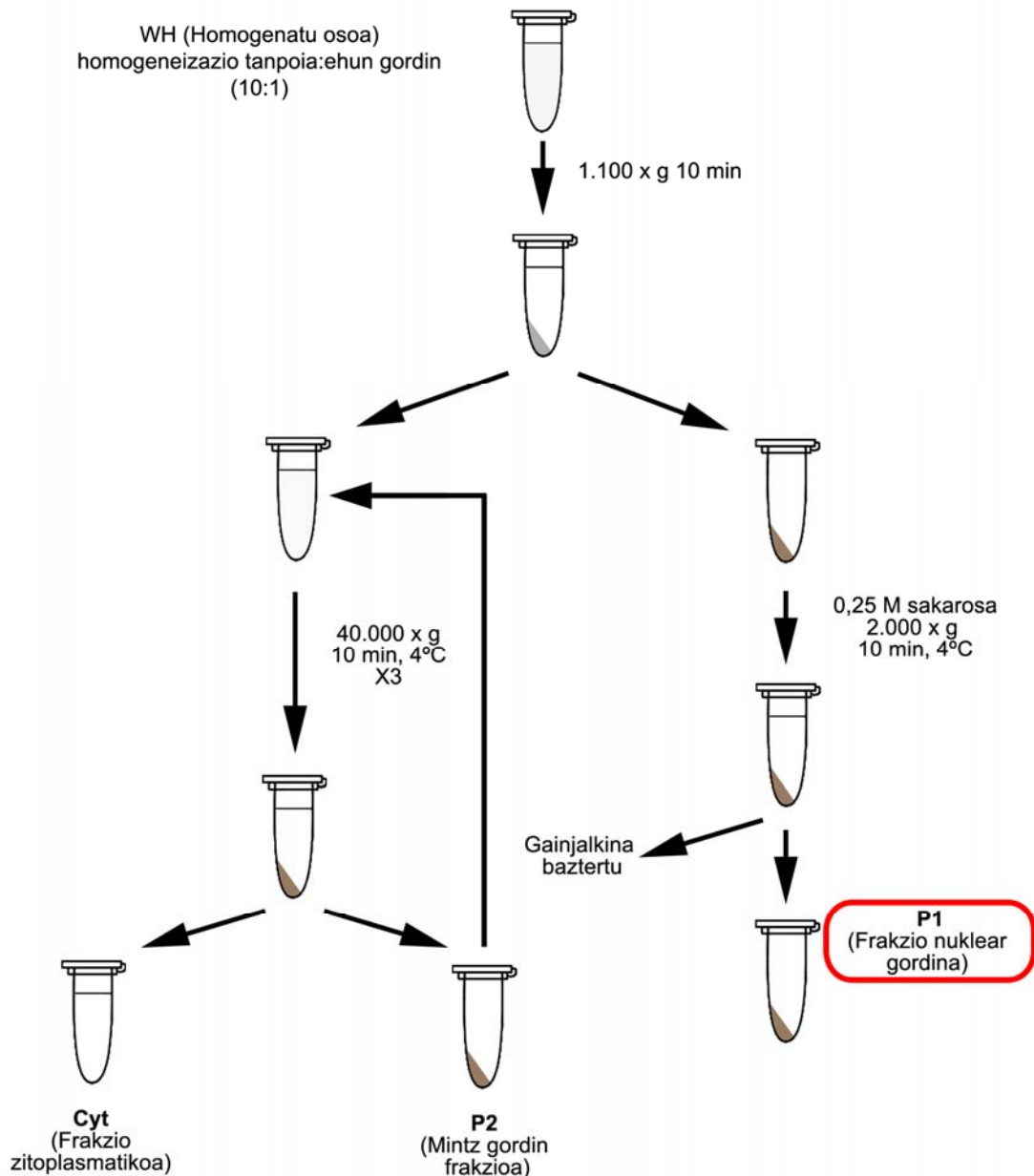
IV. METODOAK

1. GARUN-KORTEXAREN FRAKZIONAMENDU PROZEDURAK

1.1 Mintz Gordin (P2), Nukleo Gordin (P1) eta Zitoplasma (Cyt) Frakzioak Garun-

Kortxetik Isolatzeko prozedura

- **Homogeneizazio Tanpoia:** 20 mM Tris-HCl + 1 mM EGTA (+ proteasa inhibitzaileak)
- **0,32 M Sakarosa Tanpoia :** 0,25 M sakarosa, 15 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 5 mM EGTA, pH 7,9 (+ proteasa eta fosfatasa inhibitzaileak)



6. irudia. Mintz gordinak (P2), nukleo gordinak (P1) eta zitoplasma (Cyt) frakzioak prestatzeko prozeduraren eskema.

Frakzionamenduarekin hasi ahal izateko, lehenik eta behin -80°C-tara biltegitratutako arratoien garuneko kortxak desizoztu genituen. Horretarako, laginak proteasa inhibitzailez

METODOAK

osatutako homogenizazio tanpoi batean (20 mM Tris-HCl; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF; iodoacetamida 50 μ M; pH 7,5) desizoztu arte murgildu genituen. Ondoren, kortexak xafla metaliko hotz baten gainean jarri (4°C-tara izotz gainean mantenduz) eta iragaz paperaren laguntzarekin odolbildua kendu eta sikatu genituen. Artazi batzuen laguntzaz materia zuria erauzi genuen eta gelditzen zen ehuna pisatu eta balioa apuntatu genuen.

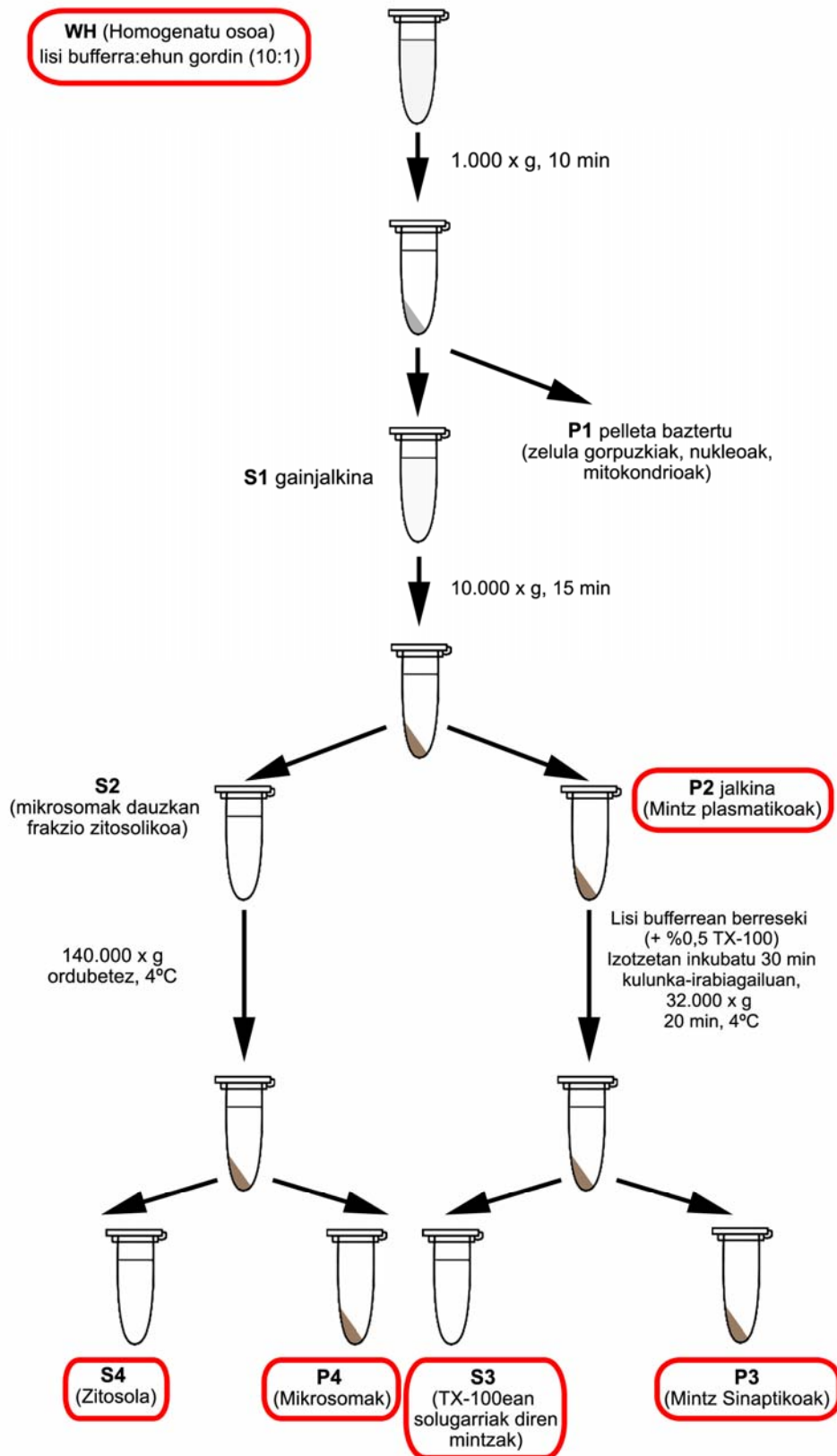
Kortexak eta homogenizazio tanpoia beirazko Potter-Evelhem batean 1:4 (p/b) proportzian jarri eta irabiagailu elektriko (RSLAB 13/20) batera akoplatutako teflonezko enbolo batekin homogeneizatu genuen. Enbolo eta Potter-Evelhemaren hormaren arteko hutsunearen neurria 0.15 - 0.20 milimetrokoa da eta ehuna txikitu zedin, hutsune honetan zehar hamar aldiz pasarazi genuen enboloa, 800 rpm-ko abiadurara biratzen zuen bitartean igo eta jaitsez. Prozesu guztian zehar muntaia 4°C-tara hoztuta mantendu behar da eta hau lortzeko, Potterra txikitutako izotzez inguratu genuen. Esekidura homogeneoa lortutakoan, 1:10 (p/b) erlazioa lortu arte esekidurari homogenizazio tanpoia gehitu genion tefloizko enboloarekin leunki eragiten genuen bitartean. Esekidura hau, 16 ml-tako zentrifuga hodian banandu eta hauek, balantza bidez orekatu eta gero, hoztutako abiadura handiko zentrifugadorearen (Kontron, Centrikon T-42K) A-19C errotorean sartu eta 3400 rpm-tara (~1100 xg), 4°C-tan eta 30 minutuz zentrifugatu genituen. Zentrifugazioa bukatutakoan, gainjalkinak pelletetik banandu genituen eta azken hauek, gerora Frakzio nuklear gordina (P1 frakzioa) osatuko zutenak, 4°C-tan gorde genituen. Gainjalkin guztiak batu eta 18500 rpm-tara (~ 40000 xg) 10 minutuz zentrifugatu genituen. Lortutako gainjalkina, Zitosola (Cyt) alegia, 4°C-tan gorde zen eta pelleta, 1:10 (p/b) proportzian homogeneizazio tanpoiarekin berreseki genuen. Esekidura hau, berriro ere 18500 rpm-tara zentrifugatu genuen. Prozedura hau hiru aldiz errepikatu eta lortutako pellet garbia (Mintz gordinen frakzioa -P2-) 80°C-tara gorde egin genuen. Lehenengo zentrifugazioan lortutako bi pelletak, bestalde, sakarosa 0,25 M tanpoi batetan (0,25 M sakarosa, 15 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 5 mM EGTA, 1 mM PMSF, 50 μ M iodoacetamida, pH 7,9) 1:4 (p/b) proportzian berreseki eta bateratu genituen. Izotzetan 10 minutuz inkubatu ostean berriro zentrifugatu

genituen 10 minutuz 4°C-tan. Kasu honetan, 6000 rpm (~ 2000 xg) abiadurara egin zen zentrifugazioa bakarrik partikula pisutsuenak hauspeatu eta baztertu ahal izateko. Lortutako azken pellet hau, P1 frakzioa da.

1.2 Garun-Kortexeko Mintzak Frakzionatzeko Prozedura.

Zelulen frakzionamendua burutzeko, Yang eta kolaboratzaileek (Yang et al., 2009) argitaratutako prozedimendua egokitzapen batzuekin jarraitu genuen. Izoztutako kortexak proteasa inhibitzaile nahaste bat (Sigma-Aldrich, P8340) zeraman lisi tanpoi hotz batetan (10 mM Tris-HCl; pH 7,6; 5 mM EDTA; 0,32 M sakarosa) desizoztu genuen. Ondoren, 1:10 (p/b) proportzioa lortu arte lisi tanpoi gehiago gehitu genuen eta beirazko Potter-Evelhem batean, irabiagailu elektriko (RSLAB 13/20) batera akoplatutako teflonezko enbolo batekin 800 rpm-tara homogenizatu genuen. Laginaren zati bat homogenatu oso (WH) bezala gorde eta gainontzekoa frakzionatzen jarraitu genuen. Lehenik eta behin, homogenatu osoa 1000 xg-tara 10 minutuz eta 4°C-tan zentrifugatu genuen. Lortutako P1 pelleta (zelula gorpuzkiak, nukleoak, mitokondriak etab.), baztertu eta gainjalkina (S1) berreskuratu genuen. Gainjalkin hau, 10000 xg-tara 5 minutuz eta 4°C-tan zentrifugatu genuen eta pellet (mintz plasmaticoak, P2) eta gainjalkin bat (mikrosomak dauzkan frakzio zitosolikoa, S2) lortu genituen. P2 frakzioa, %0,5 Tritoi X-100 (TX-100) detergentea zeukan lisi tanpoian berreseki eta kulunka-irabiagailu batean 4°C-tan 30 minutuz inkubatu genuen. Inkubatu eta gero, bolumen osoa eppendorf hodietan banatu genuen 32000 xg-tara 20 minutuz eta 4°C-tan zentrifugatzeko. Prozedura honekin, eppendorff bakoitzean mintz sinaptikoz (P3) eta TX-100ean solugarriak diren mintzez (S3) osatutako pellet eta gainjalkin bana lortzen dira hurrenez hurren. Bi faseak banatu eta alikuota guztiak -80°C-tan biltegiratu genituen erabiliak izan arte. Mikrosomak dauzkan S2 frakzio zitosolikoa bestalde, ordubetez 140000 xg-tara SW40Ti (331302, Beckman) errotore batean zentrifugatu genituen. Horrela, pellet bat (Mikrosomak, P4) eta gainjalkin bat (zitosola, S4) lortu genituen eta, erabili artean, -80°C-tara gorde genituen.

- **Lisi Tanpoia:** 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0,32 M sakarosa, 5 mM EDTA (+ proteasa eta fosfatasa inhibitzaileak)
- **Garbiketa Tanpoi Isotonikoa:** 5 mM Tris-HCl, pH 7.6, 135 mM NaCl, 5 mM EDTA (+ proteasa eta fosfatasa inhibitzaileak)

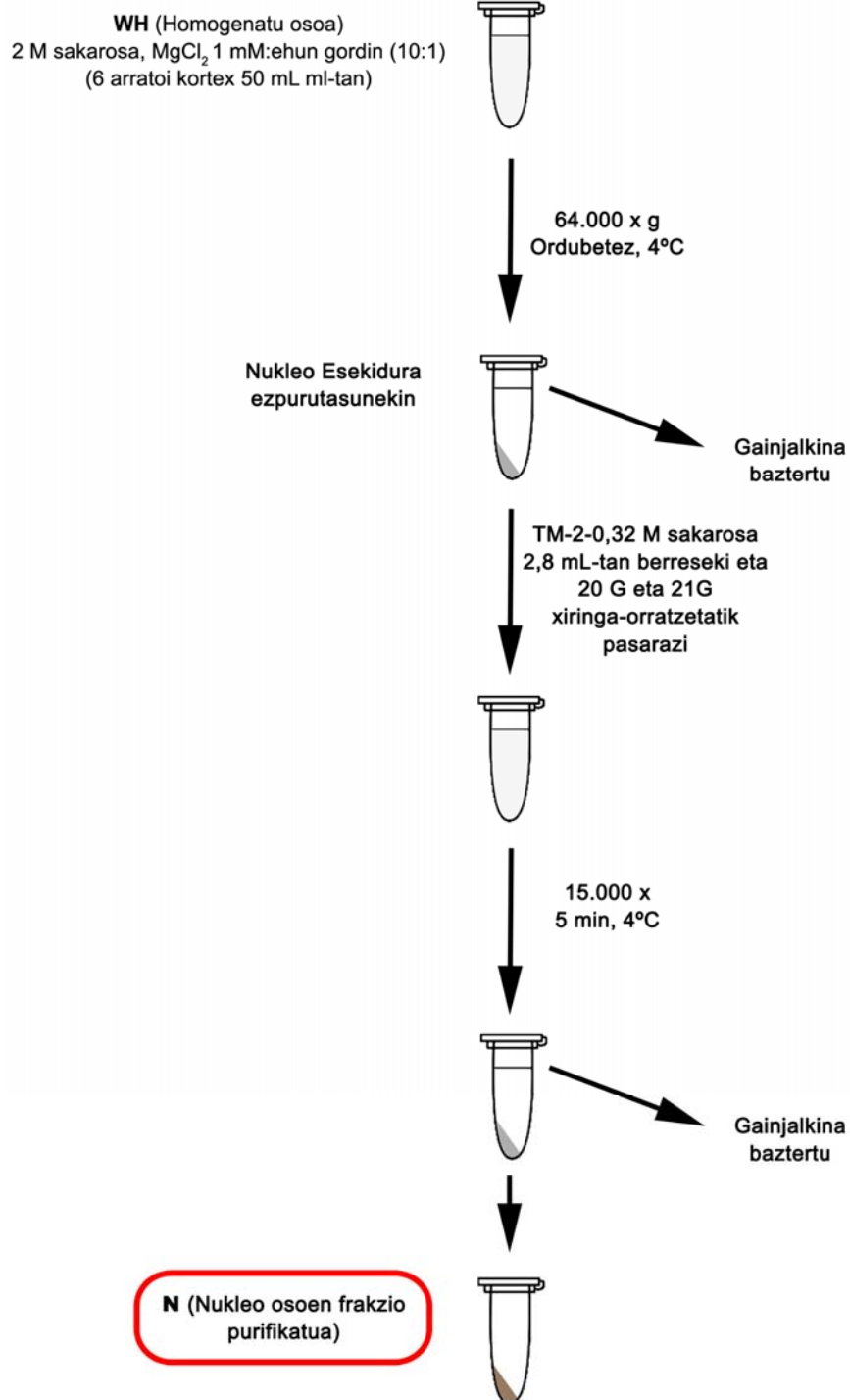


7. irudia. Arratoi helduaren garun-kortexetik abiatuta, mintzen azpifrakzioak isolatzeko prozeduraren eskema.

1.3 Garun-Kortexeko Nukleo Osoak Isolatzeko Prozedura

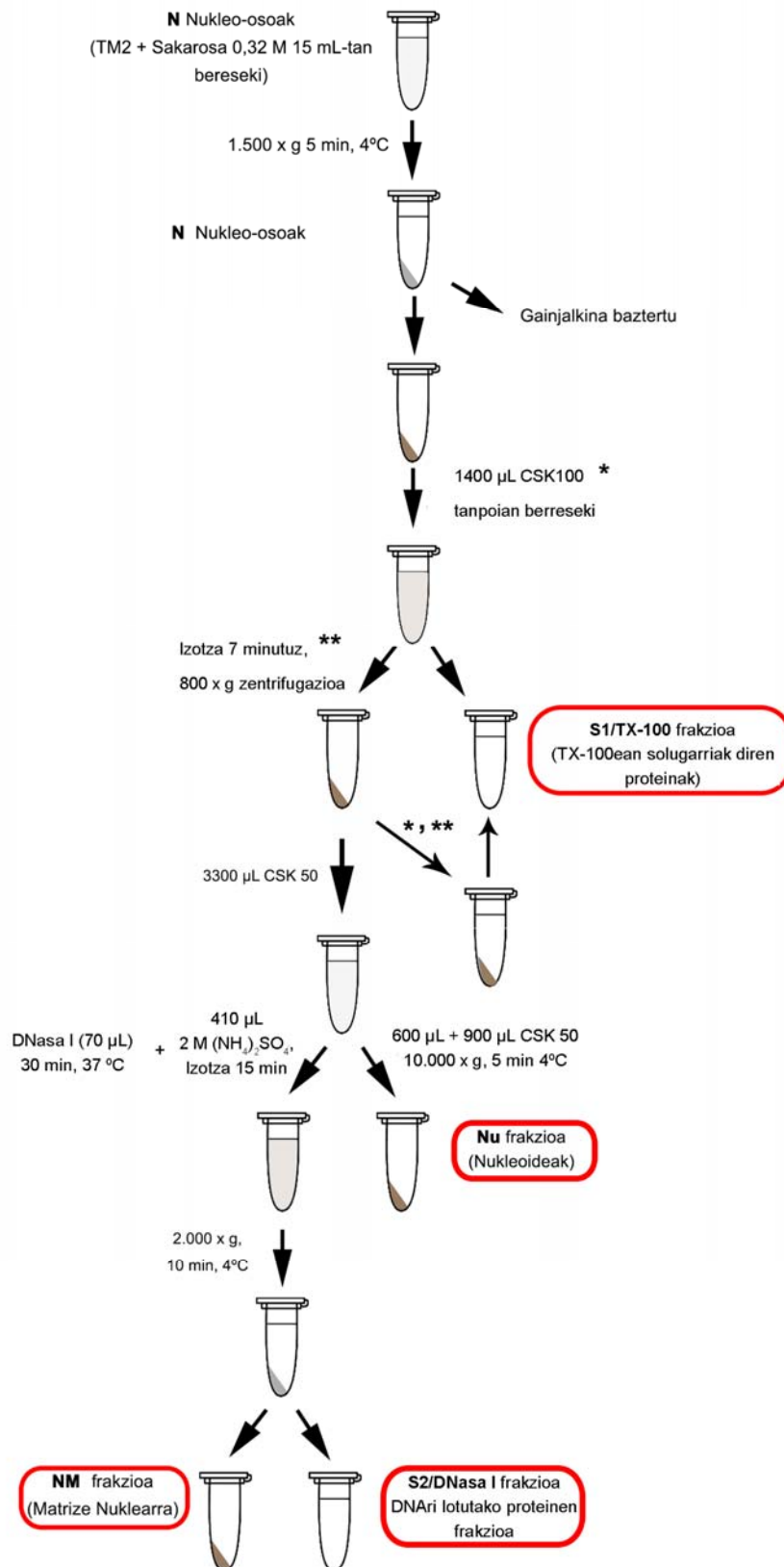
Nukleo osoen lorpenerako erabilitako Sprague-Dawley arratoien kortexak, zuzenean eskuratuak izan eta gero edo -80°C -tara izoztuak eta biltegitatuak izan eta gero prozesatu genituen. Bi kasuetan, ehuna, proteasa inhibitzaile eta 0,32 M sakarosa soluzio nukleobabesle batean (0,32 M sakarosa; 0.5 μM PMSF; 50 μM iodoazetamida; 1 mM MgCl_2) sartu genituen desizoztu eta pisatu ahal izateko. Ehuna pisatu ondoren, proteasa inhibitzaile eta 2 M sakarosa soluzio (2 M sakarosa; 0.5 μM PMSF; 50 μM iodoazetamida; 1 mM MgCl_2) batera pasatu genuen (1:5 p/b gutxi gorabehera) txikitu eta homogeneousatu ahal izateko. Prozesu hau, irabiagailu elektriko (RSLAB 13/20) batera akoplatutako teflonezko enbolo batekin beirazko Potter-Elvehjem batean egin genuen (aparailu honen ezaugarriak gorago aipatuak izan dira). Ehuna ondo txikitu zedin, Potterraren eta enboloaren arteko hutsunean zehar hamar aldiz pasarazi genuen, enboloa 800 rpm-ko abiadurara biratzen zuen bitartean igo eta jaitsez. Esekidura homogeneo bat lortu genuenean, 2 M sakarosa soluzioaren beste 24 ml gehitu genizkion, eta ondoren, mintz meningeoen aztarnak eta homogenizatu gabeko agregatuak kentzeko, gaza batean zehar iragazi genuen. Lortutako iragaziari 50 mililitroko bolumen finala lortzeko beharrezko 2 M sakarosa soluzioa gehitu genion (guztira 1:10 p/b) eta homogeneousadore berdinarekin berriro nahasi zen. Ondoren, bolumen guztia plastikozko 4 zentrifuga-hodietan banatu eta 64000 xg-tara (22500 rpm), ordubetez eta 4°C -tan ultrazentrifugadore batean (XL-90, Beckman Coulter; SW40Ti errotorea; 331302, Beckman) zentrifugatu genuen. Prozesuarekin lortutako lau pelletak, (nukleo osoen frakzioa -N frakzioa-), sikatu eta TM-2 + 0,32 M sakarosa (0,32 M sakarosa; 10 mM Tris-HCl; pH 7,4; 2 mM MgCl_2 ; 0,5 mM PMSF; 50 μM iodoazetamida) tanpoian berreseki ziren nukleo guztiak elkartu ahal izateko. Ondoren, lortutako nukleoek esekidura 20 G- eta 21 G-tako xiringa-orratzetatik 10 aldiz astiro-astiro pasatu genuen nukleo-agregatuak askatzeko eta 15000 xg-tara, 5 minutuz eta 4°C -tan zentrifugatu genituen. Zentrifugazio honekin, nukleoek frakzioa garbitu eta purifikatu egiten dugu. Azkenik, gainjalkina baztertu eta nukleoak pellet siku bezala -80°C -tan gorde genituen.

TM2 Tanpoia: 10 mM Tris-HCl, pH7,4; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM PMSF; 50 μM iodoazetamida (+ proteasa eta fosfatasa inhibitzaileak)



8. irudia. Arratoi helduaren garun-kortexetik abiatuta, nukleo osoen purifikazioaren eskema.

1.4 Garun-Kortexeko Nukleo Osoen Azpifrakzioen Banaketa



9. irudia. Arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleoaren azpifrakzionamendua erakusten duen eskema.

Nukleo osoak sekuentzialki frakzionatzeko, Payrastre eta kolaboratzaileek deskribatutako metodoa eraldaketa txiki batzuekin burutu genuen (Payrastre et al., 1992). 30 arratoiaren garunetatik eratorritako nukleo osoak (~ 15 mg prot.) TM2 0,32 M sakarosa tanpoiaren (0,32 M sakarosa; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM PMSF; 50 µM iodoazetamida; 1 µM mikrozinolina) 15 ml-tan berreski genituen. Behin esekita, 3 ml hartu (~ 3 mg prot.) eta 15 eppendorf hodietan banatu genituen. Soberako 12 ml, ordea, 12 ml-ko bi zentrifuga-hodietan banatu genituen eta ondoren 1500 xg-tara, 4°C-tan eta 5 minutuz (eppendorffen errotorearen kasuan 4000 rpm eta 12 ml-ko hodian errotorearen kasuan 3800 rpm) zentrifugatu genituen. Lortutako gainjalkina baztertu genuen. Zentrifugaziorako erabilitako zentrifugadorea, hoztutako abiadura handiko zentrifugadorea (Centrikon T-42K; Kontron) A-21C errotorearekin eppendorffen kasurako eta A-19C errotorearekin 12 ml-ko hodian kasurako izan zen. 15 eppendorffetan lortutako pelletak (~ 200 µg/eppendorf), N frakzioa alegia, BCA bidezko proteina determinazioa, *Western Blot* entseguak eta aktibitate entzimatikoko entseguak burutzeko -80°C-tara gorde genuen. 12 ml-ko hodian lortutako pelletak bestalde (hasierako nukleo 4/5), CSK 100 + %0,5 TX-100 pH 6.8 (100 mM NaCl; 0,3 M sakarosa; 3 mM MgCl₂; %0,5 TX-100 (b/b); 0,5 mM CaCl₂; 10 mM PIPES; 50 µM iodoazetamida; 1 µM mikrozinolina) tanpoiaren 1400 µl-tan berreski genituen ondoren esekidurak batzeko. Esekidura, pipeta batetik lehenengo eta ondoren 20 G- eta 21 G-tako xiringa-orratzetatik 5 aldiz pasarazi genuen agregatuak desagiteko. Ondoren, 7 minutuz izotzetan inkubatu genuen tritoiak eragin zezan. Inkubatu eta gero, 800 xg-tara zentrifugatu genuen lagina eta lortutako gainjalkinak (TX-100ean solugarriak diren proteinak -S1/TX-100 frakzioa-), bateratu eta gorde genuen. Pelleta, 1400 µl CSK 100 tanpoiarekin berreski eta 7 minutuz izotzetan inkubatu genuen berriro ere. 800 xg-ko bigarren zentrifugazio baten ostean, lortutako gainjalkina, lehen lortutako S1/TX-100 frakzioarekin batu genuen. S1/TX-100 gainjalkin guztia alikuotatu eta gorde egin genuen. Prozedimenduan berreskuratutako pelleta, nukleoideen pelleta (Nu frakzioa), alegia, CSK 50 pH 6.8 tanpoiaren (0,3 M sakarosa; 50 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM PIPES; 0,5 mM PMSF; 50 µM iodoazetamida; 1 µM mikrozinolina) 2800 µl-tan berreski genuen, 20G- eta 21 G-tako xiringa-orratzetatik 5

aldiz pasatu eta bolumen final zehatz batera eramanez (3300 µl). Nukleotide esekiduraren bolumen honetatik, 600 µl (~ 1,9 mg) hartu eta 1500 µl-ko bolumen final batera diluitu genituen CSK 50 tanpoi gehiago erabiliz. Bolumen hau, 15 hoditan banatu eta 10000 xg-tara 5 minutuz eta 4°C-tan zentrifugatu zen. Gainjalkina baztertu eta pelletak (Nu frakzioa) *Western Blot*-erako, BCA bidezko proteina determinaziorako eta aktibitate entzimatikoko entseguetarako gorde genituen. Gelditzen ziren nukleotideak (2730 µl; ~ 8,4 mg), DNasa I 350 UI-ekin (70 µl) 30 minutuz eta 37°C-tan inkubatu genituen. Ondoren, esekidurari, 2 M (NH)₂SO₄ soluzioaren 410 µl tantaka gehitu genizkion (bukaerako kontzentrazioa ~ 0,25 M) eta izotzetan 15 minutuz inkubatu genituen (bolumen totala ~ 3210 µl). Bolumen guztia, 20 eppendorff hoditan banatu (~ 152 µl/hodi) eta 2000 xg-tara, 10 minutuz eta 4°C-tan zentrifugatu genituen. Lortutako gainjalkina (DNaI lotutako proteinen frakzioa, S2/DNasa) berreskuratu, elkartu eta 20 eppendorffetan alikuotatu genituen. Alikuota hauek -80°C-tara gorde ziren. Zentrifugazio honetan lortutako pelletak, Matrize Nuklearra (NM frakzioa; ~ 220 µg/eppendorf), alegia, Masa Espektrometria eta *Western Blot*-erako -80°C-tara biltegitatu genituen ere.

2. PROTEINA KONTZENTRAZIOAREN ESTIMAZIOA GARUNEKO LAGINETAN

2.1 Proteina Kontzentrazioaren Estimazioa: Bradford Metodoa

Frakzionamendu ezberdinen bidez lortutako laginen proteina-kontzentrazioa zehazteko, Bradford Mikrometodoa erabili genuen (Bradford, 1976). Kontzentrazio ezaguneko (2 mg/ml) γ -globulina proteinaren soluzio komertzialetik abiatuta diluzio ezberdinak egin eta patroizuzen bat eraiki genuen. γ -globulinaren soluzio komertziala 80 aldiz diluituz, 25 $\mu\text{g/ml}$ kontzentrazioa daukan ama-soluzio bat lortzen da. Ama-soluzio honetatik, 4 diluzio seriatu (10; 7,5; 5 eta 2,5 $\mu\text{g/ml}$) burutu genituen eta zuria izango den saioidi bat disolbatzailearekin uzten da (2. Taula). Bestalde, lagin esperimentalaren ama-soluzioa estandar zuzenak barne hartzen duen linearitate tartean egon dadin eta beraz, lortutako absorbantzien erlazio lineala konparagarria izan dadin, estandar zuzenaren kontzentrazioetik hurbil egon beharko da. Hau lortzeko, bere hasierako kontzentrazioa estimatu eta 25 $\mu\text{g/ml}$ kontzentrazioa lortzeko diluzioa egin genuen. Ondoren, estandarrarekin bezala, laginaren diluzio seriatuak egin genituen. Absorbantziak neurtu ahal izateko, saioidi guztiei 200 μl Bradford erreaktibo gehitu genizkien eta 5 segundotan zehar bortexatu genituen. Erreaktiboa proteinekin erreakzionatu zezan 10 minutuz ingurune tenperaturan inkubatu genuen. Ondoren, espektrofotometro batekin 595 nm-ko uhin luzeeran saioidien absorbantziak neurtu genituen. Lortutako absorbantzia baloreei zuriaren balorea kentzen zaie eta absorbantzia vs. kontzentrazioa grafiko batean errepresentatu egiten dira. Lortutako puntu esperimentalekin, erregresio lineal zuzen bat eraiki genuen. Laginarekin prozedura berdina errepikatu genuen. Estandarraren eta laginen puntu esperimentalen erlazio lineala azaltzen dituzten ekuazioak lortu genituenean, laginaren kontzentrazioa ondoko formularen bitartez kalkulatu genuen:

$$[\text{Proteina}]_{\text{lagin}} = m'/m \times 80 \times 25 \mu\text{g/ml}$$

Non m' eta m lagina eta estandarraren erregresio linealaren bidez lortutako zuzenen maldak diren hurrenez hurren, 80 zenbakia, γ -globulina soluzio komertzialaren diluzio heina

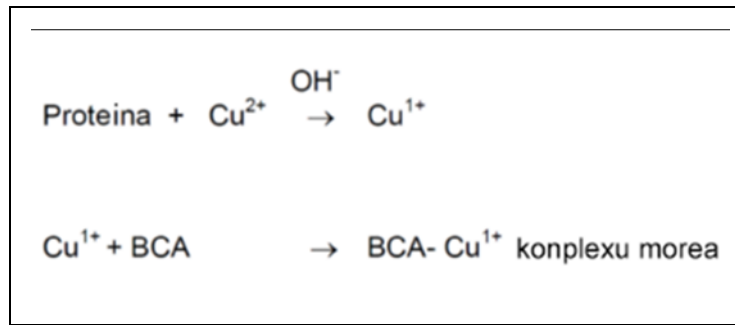
den eta $25 \mu\text{g/ml}$ kontzentrazioa, γ -globulina soluzio komertziala 80 aldiz diluitzearen ondorioz lortutako ama-soluzioaren kontzentrazioa den.

γ -globulina estandarra ($25 \mu\text{g/ml}$)			Lagin esperimentalak	
[γ -globulina]= $\mu\text{g/ml}$	γ -globulina estandarra (μl)	H_2O (μl)	Lagin esperimentalak (μl)	H_2O (μl)
0	0	1000		
2,5	100	900	100	900
5	200	800	200	800
7,5	300	700	300	700
10	400	600	400	600

2. taula. Bradford mikrometodoan erregresio linealen zuzenak eraikitzeke sortu beharreko diluzioen osagaiak. Ezkerreko zutabeetan adierazitako kontzentrazioak X ardatzeko puntuak dira. Kontzentrazio horien Y ardatzeko puntuak lortzeko, diluzioak ondoko zutabeetan adierazi bezala egin behar dira.

2.2 Proteina Kontzentrazioaren Estimazioa: Azido Bizinkoninikoaren Entsegua

Azido bizinkoninikoa (*Bicinchoninic Acid*, BCA), gatz sodiko eran dagoenean, ingurune alkalinoan ioi kuprosoekin (Cu^{1+}) konplexu ubel-bizia eratzeke da. Konplexu honen absorbantzia maximoa 562 nm -tan ematen da. Ingurune alkalinoan baita ere, ioi kuprikoen (Cu^{2+}) eta proteinen arteko erreakzioaren ondorioz (Biuret erreakzioa), Cu^{1+} ioia eratzten da. Ingurune alkalinoan beraz, bi erreakzio hauek emango dira eta ondorioz, proteina kantitatearen arabeko tonalitatea hartuko du soluzioak. Guk, soluzio honen absorbantzia 562 nm -tan neurtu ahal izango dugu. Hau da funtsean metodo analitiko honen oinarria. Erreaktiboaren egonkortasunak eta kromoforoak, proteinen kuantifikaziorako erraza, azkarra eta oso sentikorra den metodo hau ahalbidetzen dute ($0.5\text{-}30 \mu\text{g}$ -ko proteina tartea edo $0.01\text{-}0.6 \text{ mg/ml}$). Gainera, beste kuantifikazio metodoetan eragina duten konposatuekiko tolerantzia erakusten du.



Metodo honen bitartez proteina kantitateak determinatu ahal izateko abcam-en BCA proteina-kuantifikazio *kit*-a (abcam, ab102536) erabili genuen. Kitak dakarren BSA (*Bovine Sero Albumin*, Behi Albumina Serikoa) soluzio komertzial batetik abiatuta “stock soluzio” delakoa eratzen da. Honetatik abiatuta, BSA patroi-zuzena eraiki genuen. Soluzio komertzialaren kontzentrazioa 10 mg/ml da eta “stock soluzioa” lortzeko, 0,64 mg/ml kontzentrazioa arte diluitu genuen. Kontzentrazioa hau, sentikortasun-tartearen disoluziorik kontzentratuena da (8. saiodia) eta honetatik abiatuta, diluzio seriatuak egin genituen. Zuria eta beste 7 diluzio seriatu egiten dira guztira, bakoitzean kontzentrazioa erdira diluitzen delarik (1:2) (ikus 3. taula). Puntu bakoitzerako 2 duplika egiten dira baloreen batezbestekoa lortu ahal izateko. Lagin problemaren kasuan, kontzentrazioaren estimazio bat egin genuen eta 0,6-0,01 mg/ml tartean sartzeko behar haina diluitu genuen. Disoluzio hau abiapuntutzat

Saiodia	Abiatze disoluzioa	Buffer (µl)	Kontzentrazioa (mg/ml)
8	256 µl Stock Sol.	144	0,64
7	8 (200 µl)	200	0,32
6	7 (200 µl)	200	0,16
5	6 (200 µl)	200	0,08
4	5 (200 µl)	200	0,04
3	4 (200 µl)	200	0,02
2	3 (200 µl)	200	0,01
1		200	0

3. taula. BCA metodoaren bitartez BSA (Behi Sero Albumina) estandarraren zuzena eraikitzeke beharrezko puntuak lortzeko egin beharreko diluzioak zehazten dituen taula. Erregresio lineala aztertu beharreko puntuak, diluzio hauek emandako absorbantziak izan ziren.

hartuta, hiru diluzio seriatu egin genituen, bakoitza aurrekoaren erdira diluituz (1:2). Kasu honetan ere, puntu bakoitzeko bi duplika egin genituen. ELISA plaka baten putzu bakoitzean, BSA disoluzio estandarraren edo laginaren 50 µl eta kitak dakartzan agente kupriko eta BCA

(1:50) nahasketa baten 100 µl gehitu genituen. Nahasketa hauek astiro eraginez ordubetez 37°C-tara inkubatu genituen. Ondoren, absorbantziak, mikroplaka-neurgailu (Tecan®, Sunrise) batekin neurtu genituen. Lortutako absorbantzien baloreak (dupliken batazbestekoak) absorbantzia vs. kontzentrazio grafikoa batean irudikatzen dira. Puntuen erregresio linealaren bitartez zuzenak kalkulatu eta laginaren hasierako proteina kantitatea horrela kalkulatu genuen:

$$[\text{Proteina}]_{\text{lagin}} = m'/m \times n \times 0,64 \text{ mg/ml}$$

Non m' eta m laginaren malda eta estandarraren maldak diren hurrenez hurren, n , hasierako laginaren diluzio-heina den eta $0,64 \text{ mg/ml}$ estandar soluzioaren hasierako kontzentrazioa den.

3. IMMUNOHISTOKIMIA ARRATOIAREN GARUN-KORTEXEKO EBAKETA HISTOLOGIKOETAN

Ebaketa histologikoak desiozterakoan DMSO guztiz kentzeko, PBS tanpoian garbitu genituen 30 minutuko bi garbiketa eginez. Ebaketak, flotazio askean eta agitazio arinarekin mantendu behar dira prozesu osoan zehar. Ondoren, izan zezaketen peroxidasa endogeno aktibitatea inhibitzeko, H₂O₂ %1 (b/b) soluzioan 20-30 minutuz inkubatu genituen. Jarraian, antigorputzen lotura-toki inespezifikoak blokeatzeko, ebaketak, ordubetez blokeo tanpoian eta ingurune tenperaturan inkubatu genituen. Blokeo tanpoia, serum normalez %1 (b/b) (antigorputz sekundarioa sortu zeneko espeziearena -Vector Laboratories-) eta BSAz %1 (p/b) osatuta zegoen PBS tanpoian. Jarraian, ebaketak gau osoan zehar 4°C-tan blokeo tanpoian esekitako antigorputz primarioarekin (aurreko esperimenduetan optimizatutako kontzentrazioan) inkubatu genituen. Antigorputz primarioen markaketaren espezifikotasuna ikertu zeneko kasuan, ebaketak hauekin inkubatu aurretik, antigorputz primarioa eta zegokion peptido blokeatzailea (1:5) 2 orduz inkubatu genituen ingurune tenperaturara. Hurrengo egunean, antigorputz primario askeak edo inespezifikoki lotutakoak ezabatzeko, 10 minutuko 3 PBS garbiketa egin genituen. Ondoren, ebaketak biotinilatutako antigorputz

sekundarioarekin (Vector Laboratories) inkubatu genituen (1:200) blokeo tanpoian, Ordubetez eta ingurune tenperaturara. Ordua pasata, ebaketak berriz garbitu genituen 10 minutuko 3 zikloetan zehar eta ABC-rekin (Avidina-biotina konplexua) (1:200) PBS tanpoian ordubetez inkubatu genituen. Errebelatu aurretik, beste 10 minutuko 3 garbiketa egin genituen. Lehenengo biak PBSan eta hirugarrena 0,05 M Tris-HCl; pH 7,4 tanpoian. Erreakzio immunohistokimikoa ikusi ahal izateko, antigorputz sekundarioak buztanean daramaten biotiaz baliatuz kolore arrea hartzen duen erreakzioa bultzatu beharra dago. Horretarako, ebaketak errebelaketa medioan (0,05 M Tris-HCl; pH 7,5; %0,05 DAB (p/b); %0,01 H₂O₂ (b/b)), ingurune tenperaturara eta 5 minututan zehar inkubatu genituen. Azkenik, 10 minutuko 3 PBS garbiketa egin genizkien ebaketei DAB eta H₂O₂ guztia kentzeko eta era horretan erreakzioa gelditzeko. Tindatutako ebaketak, gelatinizatutako portetan muntatu genituen, guztiz sikatu arte utzi eta graduazio gorakorreko alkohol ezberdinekin eta azkenik xilenoarekin deshidratatu genituen. Bukatzeko, erretxina (DPX, Fluka) eta estalkiekin estaldu ziren mikroskopioan behatu ahal izateko.

4. WESTERN BLOT PROTOKOLOA

Lan honetarako burututako *Western blot*-ak alde z aurretik deskribatuta izan den erara (Garro et al., 2001; López de Jesús et al., 2006; Montana et al., 2012) aldaketa txiki batzuekin burutu genituen. Laginak bi modutara tratatu genituen. Alde batetik, lagina eta UREA 4X desnaturalizazio tanpoia (300 mg urea; 50 mg SDS; 120 mg DTT; 500 µl 100 mM Tris-HCl; pH 8,0; 6 µl bromofenol urdina %1 (p/b)) (3:1) proportzioan nahastu genituen eta 5 minutuz 60°C-tara irakin. Bestetik, lagina eta UREA 1X desnaturalizazio tanpoia (500 µl UREA 4X, 200 µl Glizerol, 1300 µl H₂O) (1:1) proportzioan nahastu eta 60°C-tara irakin genuen. Desnaturalizatutako proteinak, elektroforesi bidez poliakrilamida %10 gel batean zehar korritu genituen. Teknika hau, SDS-PAGE izenez ezagutzen da. Horretarako, Mini Protean II (BioRad, Hercules, CA, USA) ekipoa, 100 V-tara, izotzarekin inguratuta hoztua eta proteina frontea gel guztia zeharkatzeko behar haina denbora utziaz erabili genuen. Proteina gelean zehar pisu molekularren arabera banatutakoan, oreka handiagoa lortzeko asmoz, metanol

puruarekin aktibatutako PVDF (*polyvinylidene fluoride*, polibinilideno fluoruroa) mintz batera transferitu genituen. Horretarako, gau osoa 4°C-tan eta 30 V-tara Mini TransBlot (BioRad, Hercules, CA, USA) ekipoa erabili genuen. Hurrengo egunean, mintzak ur distilatuarekin garbitu eta guztiz lehortu genituen. Orduan, metanol puruarekin behidratatu eta azido azetiko %7 (b/b) eta metanol %10 (b/b) zeukan disoluzio batean 15 minutuz, ingurune tenperaturara eta agitazioan inkubatu genituen. Behin inkubatuta, PBS-T garbiketa tanpoiarekin (0,2 M PB; pH 7,5; Tween-20 %0,1 (b/b)) garbitu genituen ingurune tenperaturara. Egon zitezkeen lotura-toki inespespezifikoak blokeo tanpoiarekin (0,2 M PB, pH 7,5; %0,2 Tween-20 (b/b), esne-hauts gaingabetua %5 (p/b), BSA %0,5 (p/b) ordu betez eta ingurune tenperaturara agitazioan inkubatuz blokeatu genituen. Ostean, antigorputz primarioak gau osoan zehar 4°C-tara beharrezko kontzentrazioetan eta agitazio arinean inkubatu genituen esne-hautsik gabeko blokeo tanpoian. Hurrengo goizean, mintz bakoitzari PBS-T tanpoiarekin 10 minutuko 3 garbiketa egin genituen eta ondoren, (1:10000) edo (1:15000) diluitutako errefau-peroxidasarekin (HRP) konjokatutako antigorputz sekundarioak (antigorputz primarioen espeziekiko espezifikokoak) inkubatu genituen, 90 minutuz eta ingurune tenperaturara esne-hautsarekin eginiko blokeo tanpoian. Lortutako immunomarkaketaren erreibelaketarako, Clarity Western ECL sistema (BioRad) fabrikatzailearen argibideen arabera erabili genuen. Sortutako kemiluminiszentzia seinalea X-izpi filmean zuzenean eskuratu edota ImageQuant 350 (GE Healthcare) sistemaren bitartez eskuratu eta digitalizatu genuen.

5. IMMUNOFLUORESZENTZIA ETA MIKROSKOPIA

5.1 Immunofluoreszentzia Arratoien Garun-Kortexeko Nukleo Osoetan

5.1.1 Nukleoan Zenbaketa eta Ereinketa

Nukleoak zenbatu ahal izateko, "Metodoak" kapituluan azaldutako protokoloaren bitartez nukleo osoak lortu genituen. Gordetako azken esekidura horretatik 10 µl hartu eta TM2 tanpoiaren (10 mM Tris-HCl; pH 7,4; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM PMSF; 50 µM iodoacetamida) 90 µl-rekin nahastu genituen, horrela lagina diluituz. Diluzio honen bolumen bat Neubauer

ganberara eraman eta 5 zeldatan kontatutako (ganberaren alde bietan) nukleo kopuruaren batazbestekoa (n) kalkulatu genuen. Mililitroko nukleo kopurua kalkulatzeko, ondorengo formula aplikatu genuen:

$$Nukleo/ml = \left(\frac{Nukleo Kop.}{0,004 * n} \right) x 1000 x 10$$

Non 1000 eta 10 biderketa faktoreak, 1 ml esekidura bolumen batetik abiatu izanagatik eta kontaketa egiteko erabilitako diluzio faktorea izanagatik diren hurrenez hurren.

Nukleo kopurua behin kalkulata, mililitro bateko esekidura bat egin genuen zeinaren kontzentrazioa 2×10^6 zel./ml zen. Hemendik abiatuta, nukleoak gelatinizatutako portetan erein genituen esekiduraren 25 μ l bakoitzean sakabanatuz. Portak ingurune tenperaturaren guztiz lehortzen utzi eta -80°C -tan biltegitatu genituen erabiliak izan arte.

5.1.2 Immunofluoreszentzia Prozedura

Lehenik, nukleoekin ereindako gelatinizatutako portak tarte batez ingurune tenperaturara atera genituen nukleoak desizoztu zitezten. Sakarosa guztia kentzeko, kontu handiz TM2 tanpoian lau aldiz murgildu genituen. Behin sakarosaz garbi egonda, immunofluoreszentzia egiteko eremurik egokiena aukeratu eta laka komertzialarekin mugatu genuen. Sikatutakoan, nukleoak %4 paraformaldehido soluzioarekin inkubatu genituen 5 minutuz eta ingurune tenperaturara. 10 minutuko 3 garbiketa egin genituen garbiketa tanpoiarekin (0.1 M PB, pH 7,4). Ondoren, nukleoek izan zitzaketen lotura-toki inespezifikokoak gelatinazko tanpoi histologiko batekin (%0,22 gelatina (p/b); 0,1 M PBS, pH 7,4; BSA %1 (p/b); animalia serum normala %1 (b/b); espeziea, antigorputz sekundarioak sortu zireneko espeziearen berdinekoa) blokeatu genituen ordubetez eta ingurune tenperaturaren. Antigorputzen diluzioak eta inkubazio osteko garbiketak ere gelatinadun tanpoi histologiko berberarekin egin genituen. Lotura-toki inespezifikokoak blokeatu eta gero, nukleoak gau osoan zehar antigorputz primarioen diluzio egokiekin (ikus 1. taula) eta 4°C -tan inkubatu genituen. Hurrengo goizean, nukleoei, 10 minutuko 3 garbiketa egin eta buztanean fluoroforoa

zeukaten antigorputz sekundarioekin inkubatu genituen (1:400) 90 minututan zehar ingurune tenperaturan. Inkubaketa hau iluntasunean egin genuen florofooroak ahalik eta gutxien kitzikatzeko.

Immunomarkaketa bikoitza era berdinean burutu genuen baina kasu honetan, antigorputzak banaka jarri beharreak, epitopo ezberdinen aurkako antigorputz primarioen nahasketak eta fluoroforoekin konjokatutako antigorputz sekundario espezie-espezifikoaren nahasketak inkubatu genituen.

Nukleo zelular guztiak Hoechst 33342 kromatina markatzailearekin kontratindatu genituen. Azkenik, mikroskopioaren bidez aztertu ahal izateko, Mowiol muntai-medioarekin beirazko portetan muntatu genituen estalkiak.

5.2 Immunofluoreszentzia Arratoien Garun-Kortexeko Ebaketa Histologikoetan

Ebaketak immunotindatzeko lehenengo ingurune tenperaturan desizoztu genituen. Kortex, hipokampo eta zerebeloko eremuetako ebaketak aukeratu ondoren DMSO aztarnak PBS-T tanpoiarekin garbituz kendu genizkien. 10 minutuko 3 garbiketa egin eta gero, ebaketetako lotura-toki inespezifikoak blokeo tanpian (%0,22 gelatina (p/b); 0,1 M PBS, pH 7,4; BSA %1 (p/b); animalia serum normala %1 (b/b)) ordu betez, ingurune tenperaturara eta agitazio arinean inkubatuz estali genituen. Hemendik aurrerako prozedura esperimentala nukleoetako immunofluoreszentzia esperimentuetan erabilitako prozedura berdina izan zen. Kasu honetan, ebaketak emeki eragin ziren uneoro.

5.3 Immunofluoreszentzia Transfektatutako Zeluletan

Zelulak %4 paraformaldehidoan fixatu genituen, 10 minutuz giro tenperaturan. Ondoren, 10 minutuko hiru garbiketa egin genituen garbiketa tanpian (0.1 M PBS pH 7,4; %0.22 gelatina (p/b)). Ostean, mintzen permeabilizazioa eta lotura inespezifikoaren blokeoa lortzeko, zelulak ordubetez inkubatu ziren TX-100 %0.2an, blokeo tanpian (garbiketa tanpoia, ahuntz suero normala % 1 (b/b) -NGS-) disolbatuta. Jarraian, zelulak antigorputz primario bikoteekin (mouse anti-HA/rabbit anti-DAGL α , mouse anti-NPCx/rabbit anti-DAGL α , blokeo tanpian

diluituta, aldez aurretik finkatutako kontzentrazioak erabiliz -ikus 1. taula-) inkubatu genituen gau osoan zehar 4°C-tan. Hurrengo egunean, zelulak 3 aldiz garbitu genituen (10 min bakoitzeko) garbiketa tanpoian. Antigorputz sekundarioekin (anti-mouse Alexa Fluor 488/anti-rabbit Alexa Fluor 568, blokeo tanpoian 1:400 diluituta) ordubetez inkubatu ondoren, zelulak 2 aldiz garbitu genituen. Azkenik, Hoescht 33342 kromatina markatzailearekin inkubatu genituen 10 minutuz eta, bi garbiketa gehiago burutu ondoren, Mowiol medioarekin estali genituen, polimerizazioa gerta zedin.

5.4 Immunofluoreszentzia-Markaketaren Azterketa

Mikroskopia irudi guztiak Carl Zeiss Axio Observer.Z1 epifluoreszentzia mikroskopioarekin lortu genituen. Aparatua, HXP120C haluro metalikoko lanpara eta erresoluzio handiko AxioCam MRm (1388 X 1040 pixel) kamera monokromatikoarekin hornitua dago, biak Carl Zeiss Microimaging, Inc. (Göttingen, Alemania) enpresarenak.

Ohiko epifluoreszentzia-irudiak 20x Plan-Apochromat (NA 0,8) objektiboarekin egin genituen. Erresoluzio handiagokoak aldiz, ApoTome argiztapen estrukturatuko moduluarekin eta XYZ-n motorizatutako plataforma batekin (Carl Zeiss Microimaging, Inc.) 63x Plan-Apocromat (NA 1,4) objektiboarekin egin genituen. Sekzio optikoak (Z ardatzean 0,24 µm-ko tartek) Zeiss ApoTome aparatuarekin lortu genituen. Honetarako, kameraren konfigurazioa, 0,01 µm²-ko pixel tamaina lortzeko prestatu genuen. Erabili genituen argi-filtroak 49 DAPI (Ex G 365/Em 445/50) Hoechst tindaketarako, 38 He eGFP (Ex 470/40. Em 525/50) Alexa Fluor 488 fluoroforoarentzako eta 43 HE Cy3 estatikoa (Ex 550/25, Em 605/70) Alexa Fluor 568 fluoroforoarentzako izan ziren. Lortutako irudiak digitalizatzeko Zeiss Axiovision 4,8 (Carl Zeiss Microimaging, Inc.) softwarea erabili genuen. Kanal bakoitzari pseudokolore bat egokitu genion eta ebaketa optikoen gainjartzea eta irudiaren baloreen egokitzapena ImageJ softwarearekin (NIH, Bethesda, MD, USA) burutu genuen. Ilustraziorako, irudiak TIFF formatura esportatu eta Adobe Photoshop Cs6 (San José, CA, USA) programarekin etiketatu genituen.

6. LC-MS BIDEZKO 2-AG METAKETAREN NEURKETA

6.1 Baldintza Esperimentalak

2-AGaren ekoizpen eta degradazio prozesuetan parte hartzen duten entzimen funtzionaltasuna ikertzeko, honen metaketa arratoi garun kortexeko nukleo osoetan eta matrize nuklearrean neurtu egin genuen. Honetarako, bi prozedura esperimental ezberdin jarraitu genituen. Bi kasuetan, Shoney eta kolaboratzaileek (Shonesy et al., 2013) sagu estriatuko mintz plasmatikoen prestakinetan proposatutako entsegua jarraitu egin genuen aldaketa batzuekin.

Nukleo osoetan DAGLaren menpeko 2-AGaren ekoizpena neurtu genueneko kasuan, entsegu-tanpoi bezala 50 mM Tris-maleato, pH 7,4; 100 mM NaCl eta 0.32 M sakarosa erabili genituen. Medio honetara, hau 37°C-tara epelduta egonik, aldeztatik aukeratutako PLC β eta DAGL α aktibatzaile eta inhibitzaileen kontzentrazio egokiak gehitu genizkion. Erreakzio-produktu zein substratuen adizio inespezifikoa ekiditeko, entseguak silikonatutako eppendorffetan egin genituen. Eppendorff bakoitzeko 200 μ g proteina nuklear gehitu genuen, eta guztira, 500 μ l-ko bolumena lortu zen. Ca²⁺ ioiaren efektuak ikertu genitueneko kasuan, entsegu tanpoira 3 mM EGTA eta Ca²⁺ askea lortzeko behar haina CaCl₂ gehitu genuen. Inkubazioak, 30 minutuz 37°C-tara egin genituen. Erreakzioak gelditzeko, saiiodiak izotzetan murgildu genituen. 50 nM estandar (2-AG-d5) eta beharrezko kontzentrazioa zegoen 2-AGaren forma naturala 20 μ l azetonitrilotan disolbatu egin genituen. Disoluzio hau, saiiodi bakoitzera gehitu genuen. Frakzio nuklearra, TissueLyser II (Qiagen, Valencia, CA, USA) aparatuaren laguntzarekin homogeneousatu genuen. Nukleo osoen homogeneousazioa Etilazetato/hexanotan (9:1, b/b) disolbatu eta 10 segunduz sonikatu genuen (5 mm-tako altzairuzko bolatxoak 30 Hz-etako frekuentzian). Ondoren, saiiodiak 10000 xg-tara 10 minutuz eta 4°C-tan zentrifugatu genituen. Lortutako fase organikoa berreskuratu eta N₂ iturri bat erabilia sikatu egin genuen. Azkenik, sikatutako lagina azetonitrilo 500 μ l-rekin berdisolbatu genuen. Berrito sonikatu eta bortexatu eta gero, analisisa, LC-MS/MS sisteman oinarrituta Schultek deskribatutako (Schulte et al., 2012) erara burutu genuen. Sistema hau,

6410 Triple Quad masa espektrometroak (Agilent Technologies; Wilmington, DE, USA) osatzen du. Triple Quad hau, ioi-positibo eran jarduten duen ionizazio-elektrospray batekin eta "1200-series" ponpa binarioarekin ekipatuta dago. 2-AGa, Phenomenex Luna 2.5 μm C18 (2)-HST (High Speed Technology) 100 9 2 mm-ko zutabearekin banatu genuen. Zutabe hau, Security Guard aurrezutabe bati (C18, 4 9 2 mm; Phenomenex; Torrance, CA, USA) bateratua dago eta berton, A (%0.1 20:80 azetonitrilo/ura, b/b) eta B disolbatzaileak (%0,1 azido formiko azetonitrilotan) gradiente hauetan erabili genituen: %55–90 B (0-2 min), ondoren %90 B (2-7.5 min) eta azkenik %55 B (7.5-10 min). Zutabearen tenperatura 25°C, 0,3 ml/minutuko lagin fluxua eta injekzio bolumena 10 μl izan ziren. Zutabeko orratza, injekzio bat eta hurrengoaren artean, ura/azetonitrilo (80:20) eluente bezala zeukan "flushport"-arekin 60 segunduz garbitu genuen. Elektrospray ionizatzaillearen interfasean, nebulizadore gisa eta gas-disolbatzaile gisa nitrogenoa erabili zen horrela konfiguratuta: 350°C-tako tenperatura, nebulizadorearen presioa 40 psi, eta kapilarraren boltaia +4800 V. Erreakzio anizkunen monitorizazioan (MRM) ondorengo ioi trantsizioak erabili genituen (nukleo osoetako zein NMko kasuetan): 2-AG m/z 379,287tik 287ra (2-AG-d5 m/z 384,2287), AA m/z 305etik 91ra (AA-d8 m/z 313tik 126ra).

DAGLaren aktibitate entzimatikoa NMan aztertu zeneko kasuan, laginaren prestaketari dagokionez, aldaketa txiki batzuk egin genituen eta, LC-MS/MS prozedimendua aldiz, berdin mantendu genuen. Kasu honetan ere, erreakzioen produktu zein substratuen adizio inespezifikoa ekiditeko, entseguak silikonatutako eppendorffetan egin genituen. Tanpoi bezala 20 mM HEPES, pH 7,5; 10 mM DTT erabili genuen eta substratu bezala 1-estearoil-2-arakidonoilglicerol (DAG) beharrezko kontzentrazioan. Bolumen totala 50 μl izan ziren eta gorago azaldutako kasuan bezala erreakzioa 37°C-tan 15 minutuz inkubatu genuen agitazio leunean. Gehitutako NM proteina kantitatea 10 μg izan ziren (ikus "Emaitzak" atala). Erreakzioak 50 μl azido formiko 0,1 M-ekin gelditu genituen eta deuteratutako barne patroien 10 μl (2-AG-d5 25 pikomol eta AA-d8 100 pikomol) gehitu ondoren, izotz erretilu baten gainean jarri genituen. Ondoren, saioldi bakoitzari 1 ml etilazetato:hexano (9:1 b/b) jarri

genion eta aurrerantzean egindako LC-MS/MS prozedura guztia gorago azaldu den bezala burutu genuen.

6.2 Metabolito Lipidikoen Detekzio eta Kuantifikazioa

6.2.1 Diluzio Isotopikoa Adizioarekin

Teknika analitiko honekin, LC/MS teknikaren bitartez neurtutako konposatu baten seinalea konposatu beraren zenbat kantitateri dagokion kalkulatu ahal dugu. Aztergai den sisteman ikertu beharreko metabolitoa hasieratik espresatzen deneko kasuetan erabiltzen da. Hau da, sistema baldintzatu aurretik (entzimen aktibazioa, inhibizioa etab), neurtu behar den metabolitoa naturalki existitzen da.

Gure kasuan, lehenik eta behin, saioidi guztietan 2-AG-d5 barne estandarraren kantitate berdina gehitzen dugu. 2-AGa (forma naturala) aldiz, saioidi-serie bakoitzean (serieetako lehenengo saioidietan izan ezik) kantitate gorakorrean gehitu egiten da (adizio estandarrak) 2-AG eta 2-AG-d5 elementuen arteko diluzio bat eginez (hemendik datorkio "diluzio isotopiko" izena teknikari). Gogora dezagun laginek 2-AG berezko kantitate bat daukatela alde aurretik. Ondoren, masa espektrometroan bi 2-AG formen (naturala eta deuteratua) kantitatea neurtzen da. Espektrometroak, isotopo bakoitzari dagokion piko bezala ematen digu neurtutako kantitateen informazioa. 2-AG eta 2-AG-d5 pikoen azalaren arteko ratioa vs. gehitutako 2-AG kantitatea grafiko batean irudikatzen dira eta erregresio linealaren bidezko azterketa egiten da. Ikertutako sistemaren (nukleo osoak) bi egoeretan (egoera basal eta aktibatutako egoeran) prozedura hau errepikatu egiten da. Erregresio lineal bidez lortutako 2-AG/2-AG-d5 ratioen balioen zuzenak, Y ardatza balore positibo batetik moztuko dute beti, serieen lehenengo saioidietan ez baitugu 2-AG adizionatu, soilik sistemak naturalki espresatutako kantitatea dagoelarik. Beraz, Y ardatzaren puntu honetatik erregresio zuzena pasarazita X ardatza mozten duen lekua, laginaren 2-AG kantitatea seinalatuko du. Gure kasuan, aktibatutako eta aktibatu gabeko nukleo osoetako 2-AG kantitatea.

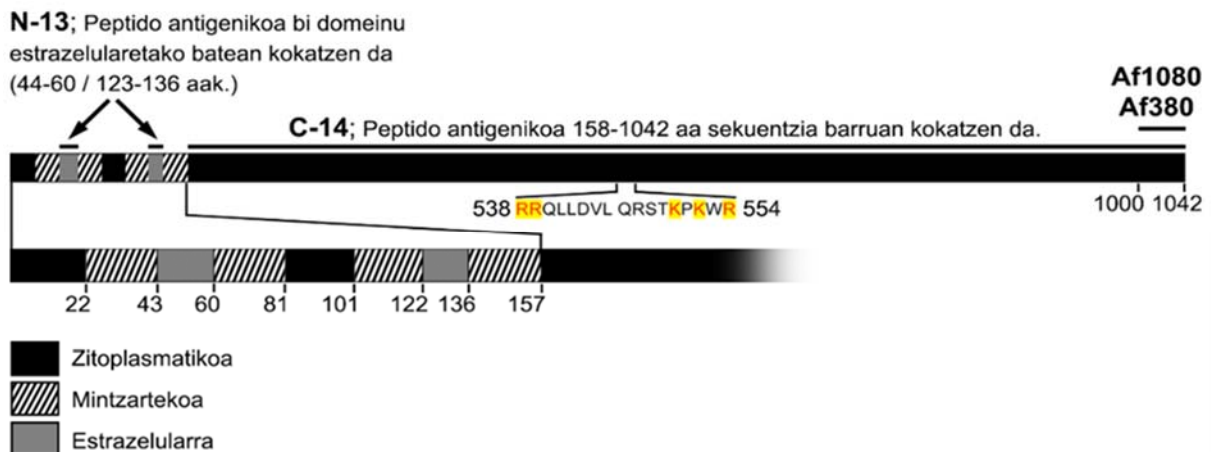
6.2.2 Diluzio Isotopikoa

Teknika honekin, aurrekoarekin bezala, gertakinetan LC/MS bidez lortutako konposatu baten seinalea konposatu beraren zenbat kantitateri dagokion esleitzeko erabili dugu. Izenak adierazten duen bezala, aurreko ataleko teknikaren oso antzekoa da. Ezberdintasun bakarra, analitoaren forma naturala ez gehitzean datza sisteman naturalki ez baita espresatzen. Kasu honetan aztertu genuen sistema arratoi kortexeko nukleo osoetatik eratorritako NM azpifrakzioa izan zen. Lokalizazio honetan gure intereseko analitoak (2-AG eta AA) aurkitzen ez zirenez, prozedura honen bitartez neurtu ziren. Funtsean, forma naturalen eta deuteratuen pikoen azalaren arteko ratioen handipenaren erregresio lineal zuzen bat eratzean datza. Horretarako, 2-AG eta AA forma naturalak eta 2-AG-d5 eta AA-d8 deuteratuak erabili ziren. Lagin guztietan forma deuteratuaren kantitate berdina gehitu zen eta forma naturalen kontzentrazioa gehitzen joan zen adizionatutako kantitatea handituz. Lortutako seinaleen azalaren erratioak kalkulatu eta baloreekin erregresio lineala egin zen. Ondoren, 6.1 atalean azaldutako NMean egindako 2-AG eta AA produkzio esperimenduetan, DAG sustratua gehitu ondoren lortutako gertakinei estandar zuzena lortzeko erabili genituen forma deuteratuen kantitate berdinak gehitu (2-AG-d5 25 pikomol eta AA-d8 100 pikomol) eta lortutako seinaleen arteko ratioa estandar zuzenean ordezkatu genuen 2-AG kantitatea esleitzeko.

V. EMAITZAK

1. DAGL α ISOZIMAREN AURKAKO ANTIGORPUTZEN HAUTAKETA

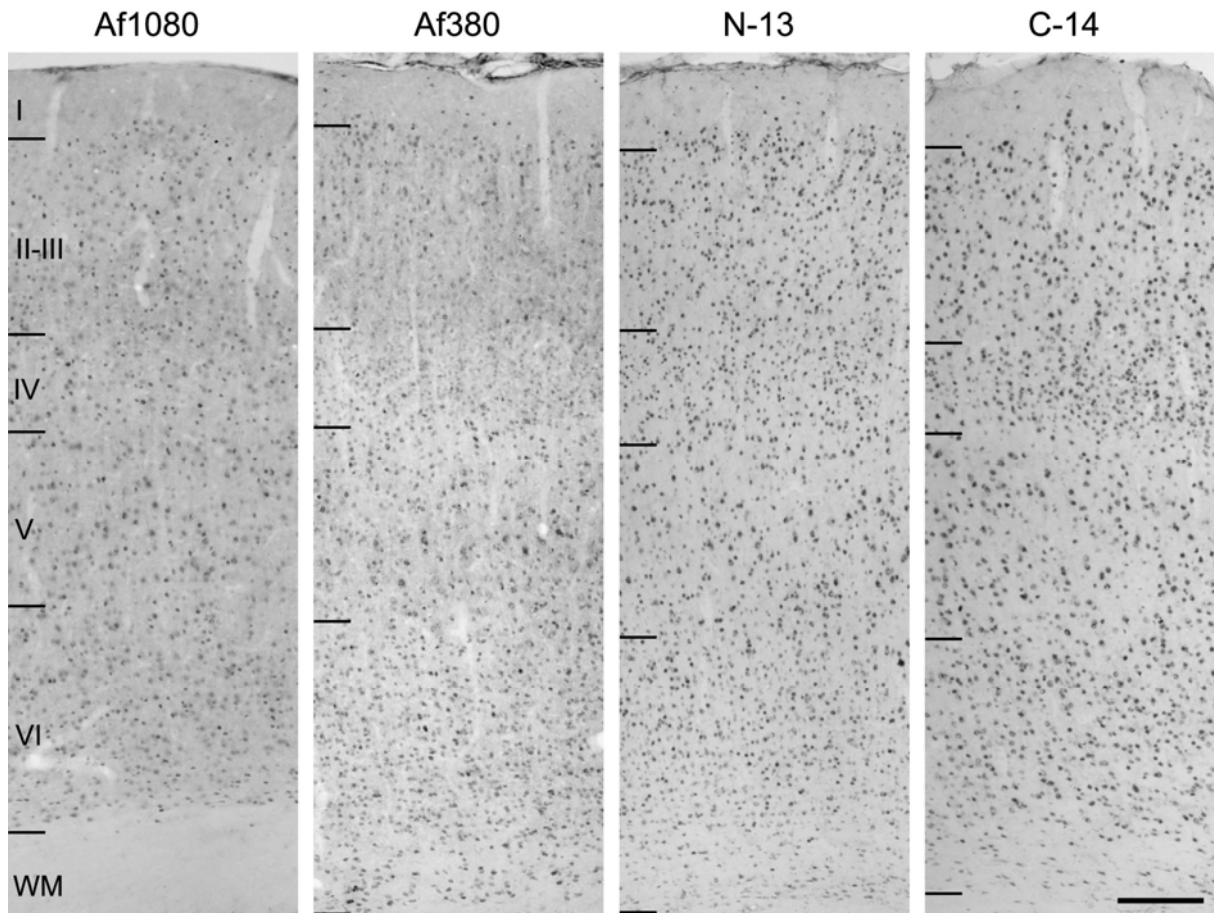
DAGL α proteina garun-ebaketetan detektatzeko antigorputzik egokiena aukeratzeko asmoz, komertzialki eskuragarri zeuden lau antigorputz poliklonal frogatu genituen. Horretarako, arratoi helduaren garun-kortex ebaketetan, immunohistokimia-markaketaren distribuzioa aztertu genuen. Ondoren, immunofluoreszentzia bikoitza bidez, sakonago aztertu genuen antigorputzek emandako seinalearen distribuzioa. Hemaglutinina-etiketadun giza DAGL α (DAGL α -HA) kodetzen duen plasmido batekin transfektatutako HEK293 zelulak lehenengo bahetzetik aukeratutako antigorputzaren espezifikotasuna berresteko tresna gisa erabili genuen. Azkenik, *Western blot* entseguen bitartez, datu gehigarriak lortu genituen antigorputzen espezifikotasunaren inguruan.



10. irudia. Giza DAGL α proteinaren sekuentziaren irudikapen eskematikoa ([Uniprot, ID Q9Y4D2: http://uniprot.org](http://uniprot.org)). Zenbakiak, aminoazido-sekuentziaren aminoazido-hondar ezberdinei dagokien posizioa adierazten dute. 538-554 hondarrek osatzen duten tartean, Motif Scanek (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) balizko nukleora barnerratzeko seinale (NLS) deritzon kontsentsu-sekuentzia erakusten da. Hondar basikoak (horiz nabarmenduak) ikertutako ugaztun espezie guztietan kontserbatuak daude.

1.1 DAGL α -Immunomarkaketaren Distribuzioa Garun-Kortexean

Garun-kortex ebaketetan egindako immunohistokimia-entseguetarako, DAGL α proteinaren epitopo desberdinen aurkako lau antigorputz poliklonal erabili genituen. Horretarako, aldeztik ikusitakoaren arabera (Mitchell et al., 1993; Montana et al., 2012), immunorreaktibitatea hobetzen duen fixapen-prozedura estandarraren aldaera bat erabili genuen. Prozedura estandarrarekiko aldaketa nagusia %0,37 sulfuro tanpoiaren erabileran datza, fixapenaren aurreko garbiketarako erabiltzen dena gatz-fosfato tanpoiaren ordeztu.

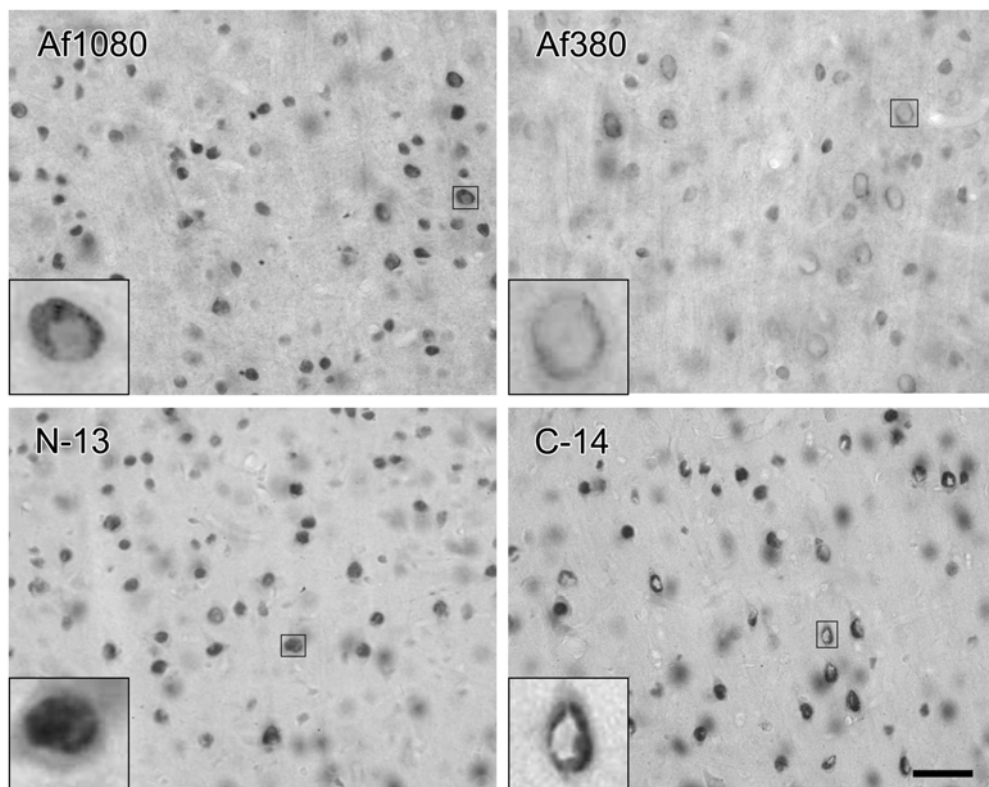


11. irudia. Arratoi kortex somatosensorialean afinitate bidez purifikatutako eta ahuntzan (Af1080) eta untxian (Af380, N-13, C-14) sortutako antigorputz poliklonalekin lortutako immunomarkaketa. Erakutsitako panoramiketan, profil somatikoak ingurune lauso batetik bereizgarriak ziren II-V geruza bitartean. Eskala-barra: 200 μ m.

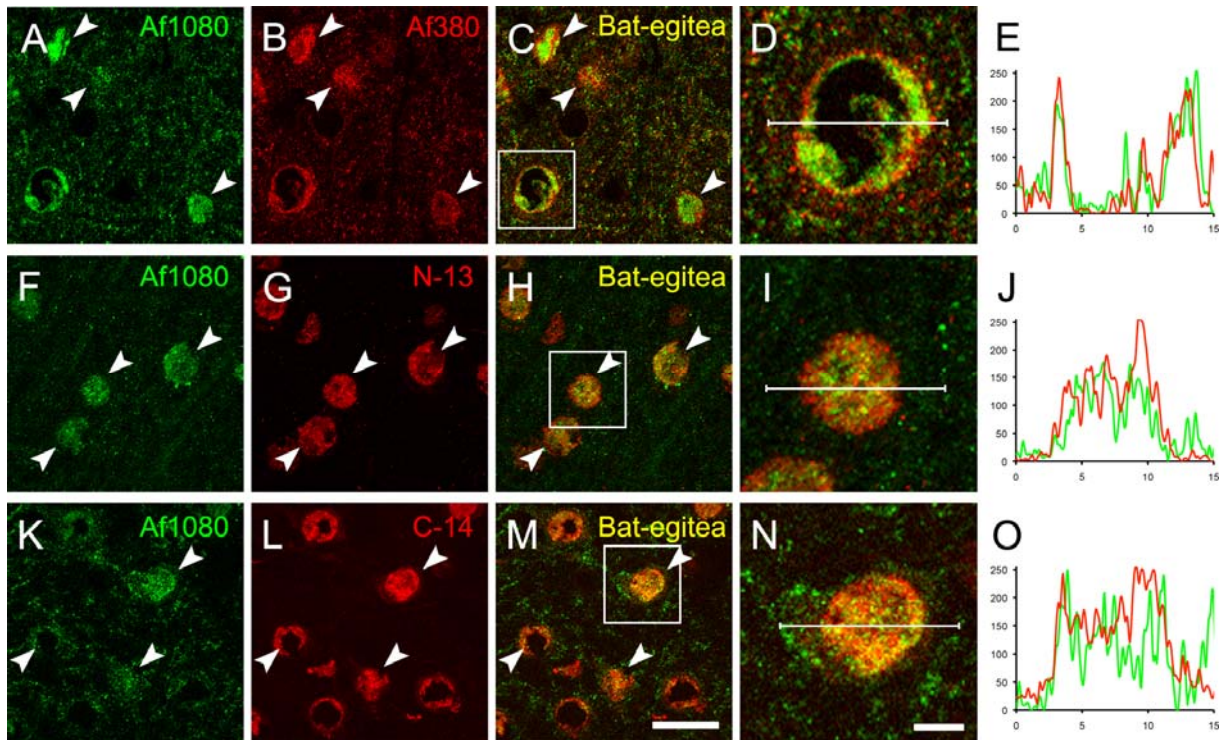
Frogatu genituen lau antigorputzetako hiru untxi-poliklonalak (C-14, N-13 eta Af380) eta bat ahuntz-poliklonala (Af1080) ziren (10. irudia, 1. taula). Epitopoei dagokienez, C-14 eta N-13 sekuentzia antigenikoei buruzko informazio partziala genuen saltzaileek emandako informazioan. Hala, C-14 sortzeko erabilitako antigenoa DAGL α -ren buztan zitosolikoan (158-1042 aminoazidoak) kokatzen den sekuentzia da, saltzaileak zehazten ez duena. N-13 antigorputza sortzeko peptido antigenikoa DAGL α -ren mintz-zeharreko 1-2 edo 3-4 domeinuak lotzen dituzten bi bukle zitosolikoetako batean kokatzen da, baina sekuentzia zehatza ezezaguna da. Ordez, Af380 untxi-antigorputz eta Af1080 ahuntz-antigorputz poliklonalen immunogenoa ezaguna da, DAGL α -ren karboxilo muturraren azken 43 aminoazidoak barne hartzen dituena (10. irudia; 1. taula).

Irudi panoramikoetan, DAGL α proteinaren aurkako lau antigorputzek emandako markaketa immunohistokimikoan, inguruko ehunetik argi eta garbi bereizten ziren profil

biribilak ikus zitezkeen kortexaren II.-VI. geruzetan (11. irudia). Lau antigorputzekin lortutako markaketa profila berdintsua bazen ere, ezberdintasun xumeak antzeman zitezkeen. Horrela, Af1080, N-13 eta C-14 antigorputzekin tindatutako egitura immunopositiboen banaketa nahiko homogenea zen I. geruzatik VI. geruzara, Af1080 antigorputzarekin N-13 eta C-14 antigorputzekin baino zelula gutxiago detektatzen baziren ere (11. irudia). Ordez, Af380-k eragindako immunorreaktibitateak distribuzio irregularragoa zuen, markatutako zelulen dentsitatea txikiago baitzen II.-III. geruzaren beheko herenean eta IV. geruzan gainerako geruzetan baino (11. irudia). Markaketa handiagotze gehiagoko objektiboekin aztertu genuenean, lau antigorputzekin lortutako DAGL α -markaketa nukleo zelularrei zegokiela ikusi genuen arren, zitoplasman eta zenbait profil dendritikoetan seinale ahul bat ikusi bazitekeen ere (12. irudia). Nukleo antzeko partikuletan immunorreaktibitatea bi motakoa zen: erdigune zurbila inguratzen zuen eraztun periferikoa edo egitura osoa inguratzen zuen eraztuna (xehetasun gehiago, 12. irudian).



12. irudia. Arratoi helduaren garun-kortex somatosensorialeko V. geruzaren parean ateratako mikroorgazkiak. Nukleo zelularrak omen ziren egitura biribilak ikus zitezkeen. Neuropiloan, ordea, markaketa lauso eta ahula baino ez zen antzeman. Irudi bakoitzean, laukitxoak mugatutako eremua behe-ezkerrean erakusten da handiagotze goreneko objektiboarekin aterata. Eskala-barra: 100 μ m (25 μ m behe-ezkerreko laukietarako).



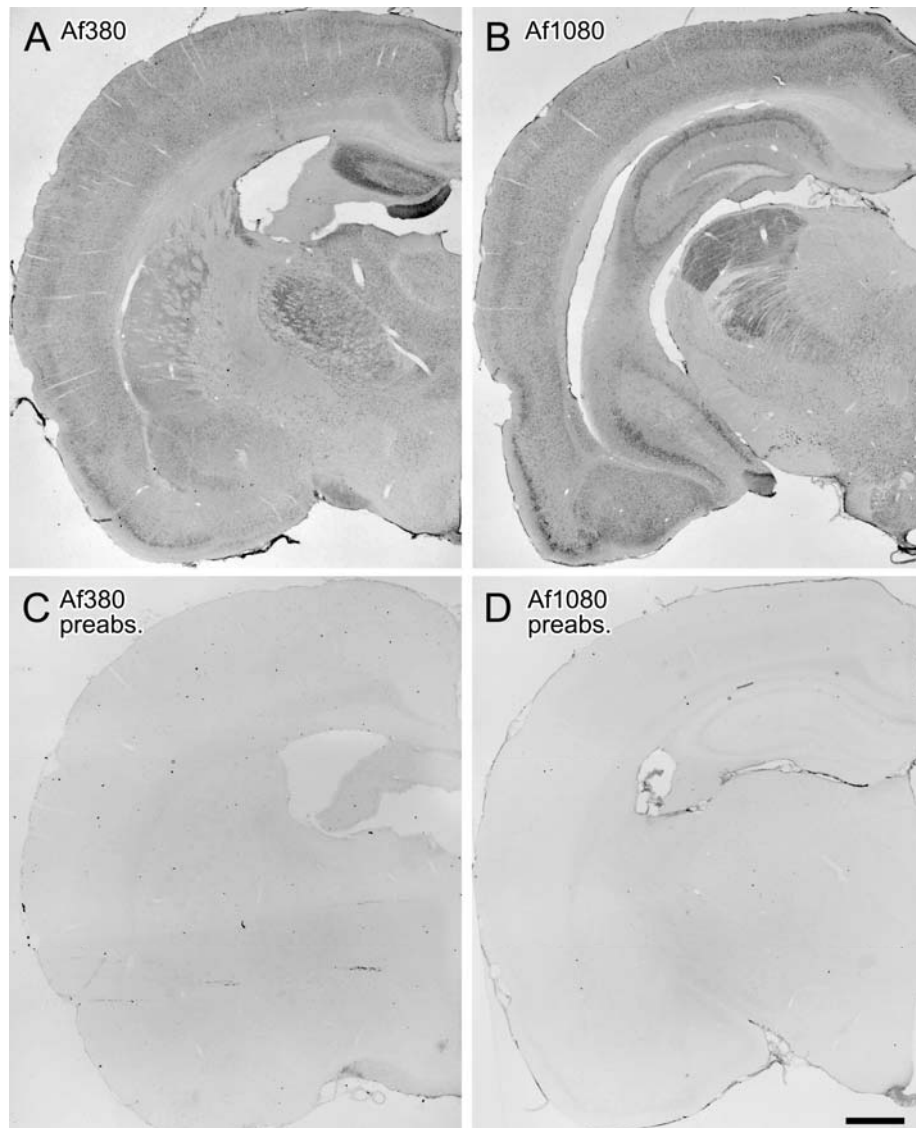
13 irudia. DAGL α aurkako antigorputz-bikote desberdinek eragindako markaketen alderaketa. Bereizmen handiko immfluoreszentzia-mikroskopia irudiak arratoi helduaren garun-kortex somatosensorialeko V. geruzaren parean. Markaketa bikoitzak DAGL α -ren aurkako antigorputz-bikote desberdinak konbinatuz (Af108/Af380, A-D; Af1080/N-13, F-I; Af1080/C-14, K-N) burutu ziren. Fluoreszentzia-intentsitate *plot*-etan (E, J, O), X eta Y ardatzetako balioak distantzia (μ m-tan) eta seinaleen dentsitate optikoa (0-255 eskalan) dira hurrenez hurren. Fluoreszentzia-intentsitatearen kuantifikazio-grafikoa sortzeko ImageJ softwarea (NIH) erabili zen. Mikroargazki guztiak argiztapen egituratuz (ApoTome) hornitutako fluorezentzia-mikroskopia batekin (Carl Zeiss Axio Observer) egin ziren eta 0,24 μ m-ko lau ebaketa optikoren proiektzioak dira. Eskala-barrak: 20 μ m (A-C, F-H eta K-M argazkietarako); 5 μ m (D, I, N argazkietarako).

Espezifikotasunari buruzko lehenengo datuak lortzeko asmoz, DAGL α -ren epitopo desberdinen kontrako antigorputzak bikoteka konbinatu eta immunofluoreszentzia bikoitza entseguak burutu genituen. Garun-kortexeko V. geruzan lortutako seinaleak bereizmen handiko fluorezentzia-mikroskopia bitartez aztertu genituenean nukleo zelular gisako egiturak detektatu genituen lau antigorputzekin, immunohistokimia-tindaketetan bezala. Af1080 antigorputzak markatutako nukleo gehienak Af380, N-13 eta C-14 antigorputzek ere markatu zituzten. Nukleoz kanpo, Af1080 eta Af380 antigorputzek (baina ez N-13 eta C-14) neuropiloan sakabanatutako puntukako seinale argia ere eman zuten, aurretik deskribatutako eta elektro-mikroskopiaz berretsitako (Yoshida et al., 2006; Uchigashima et al., 2007) markaketa postsinaptikoarekin bat datorrena. Immunofluoreszentzia-seinaleen intentsitateen *plot* bidezko azterketetan, Af1080/Af380 eta Af1080/N-13 konbinaketetan eta, neurri txikiago batean, Af1080/C-14 konbinaketan seinaleen arteko gainezarpen handia

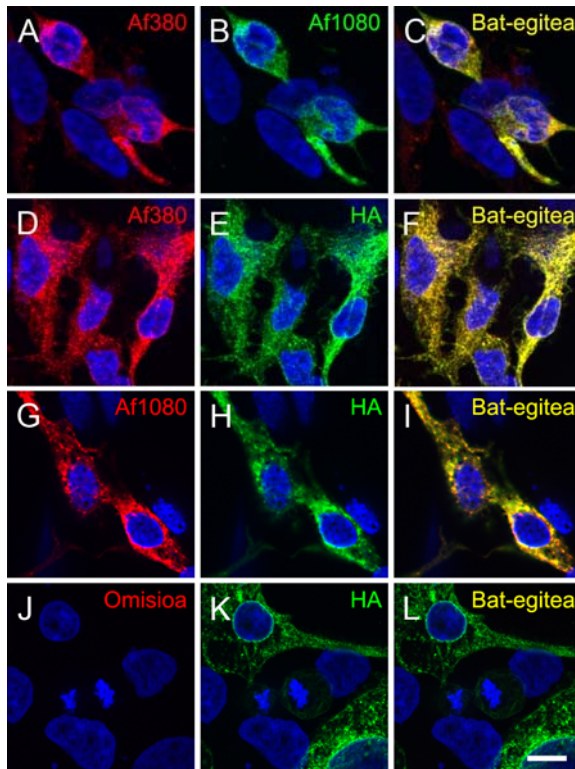
antzeman genuen (13. irudia). Seinaleen arteko gainezarpen eskasa eta neuropilo markaketa eza esklusio-irizpide gisa hartuta, N-13 eta C-14 antigorputzak baztertu genituen.

1.2 DAGL α -ren Aurkako Antigorputzen Espezifikotasun Frogak

Espezifikotasuna aztertzeko, lehenik eta behin, Af380 eta Af1080 antigorputzak immunogenoaz preabsorbatuz emandako seinale immunohistokimikoa ezaba zitekeen aztertu genuen. Antigorputzak peptido immunogenoarekin bi orduz preabsorbatu zirenean, ez zuten batere markaketarik eman arratoiaren garun-ebaketetan (14. irudia), antigorputzak finkatzeliku espezifikoetara lotzen direla iradokitzen duena.



14. irudia. Arratoi helduaren garun-ebaketa koronalen irudi panoramikoak. **A-B.** DAGL α -ren aurkako Af380 eta Af1080 antigorputzek emandako markaketaren. **C-D.** Immunohistokimia-prozedura peptido immunogenoarekin preabsorbatutako Af380 eta Af1080 antigorputzekin burutu zenean, immunomarkaketa erabat desagertu zen. Eskala-barra: 1 mm (A-D argazkietarako).

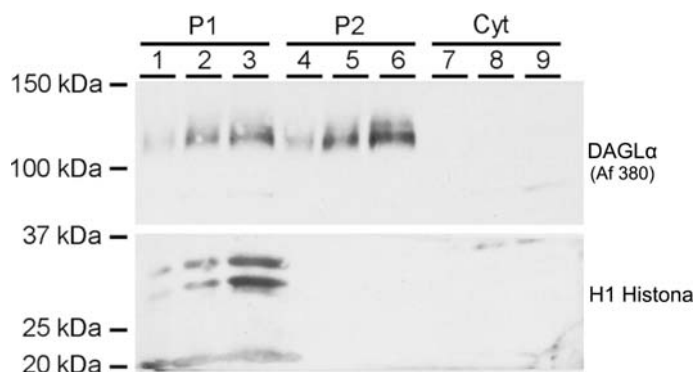


15. irudia. Immunofluoreszentzia bikoitz irudiak Hoescht 33342 kromatina markaketarekin konbinatuta, DAGL α -HA fusio proteina errekonbinantea kodifikatzen duen plasmidoarekin transfektatutako HEK293 zeluletan. Af380 untxi- eta Af1080 ahuntz-antigorputz poliklonalak elkarrekin (A-C) edo anti-HA sagu-antigorputz monoklonalarekin (D-G) konbinatu ziren. Kontrol negatibo gisa, zelulak soilik anti-HA sagu-antigorputzarekin inkubatu ondoren, fluoroforodun untxi, ahuntz eta saguaren aurkako antigorputz sekundarioekin markatu ziren (J-I). Hiru detekzio kanalak banan-banan gris-eskalan hartu ondoren, bakoitzari pseudokolore bat esleitu zitzaion. Immunomarkaketa-profila berdina zen konbinaketa guztietan (A-I) eta, Af380 eta Af1080 antigorputzak omititu zirenean, untxi eta ahuntzaren aurkako fluoroforodun antigorputz sekundarioek ez zuten seinale detektagarririk eman (J-I). Mikroargazki guztiak argizatapen egituratuz (ApoTome) hornitutako fluoreszentzia-mikroskopia batekin (Carl Zeiss Axio Observer) egin ziren eta 0,24 μm -ko bost ebaketa optikoren proiektzioak dira. Eskala-barrak: 10 μm (A-I argazkietarako).

Af380 eta Af1080 antigorputzen bigarren espezifikotasun froga bezala, immunofluoreszentzia bikoitz entseguak burutu genituen DAGL α -HA konstrukzioarekin transfektatutako HEK293 zeluletan. Af380 eta Af1080 untxi-antigorputz poliklonalek emandako seinalea erabat gainezarrita zegoen transfektatutako zeluletan (15. irudia, A-C) eta, halaber, bi antigorputzek sortutako markaketek kolokalizazio birtualki osoa erakutsi zuten HA etiketaren kontrako antigorputzak sortutakoarekin (15. irudia, A-C). Beraz, DAGL α -ren karboxilo muturraren kontra doazen Af380 eta Af1080 antigorputz poliklonalek eta HA etiketaren kontrako antigorputz monoklonalak proteina multzo berdina markatzen dute. Azkenik, ikusitako seinalaren bat antigorputz sekundarioen arteko erreaktibitate gurutzatuaren ondoriozkoa izan litekeen baztertzeko, konbinaketa guztietan antigorputz primarioen entseguak burutu genituen. Entsegu horietan ez genuen sekundarioen seinalerik antzeman (15. irudia, G-I).

Espezifikotasun froga gehigarri gisa, Af380 eta Af1080 antigorputzak *Western blot* entsegutan frogatu genituen. Horretarako, arratoiaren garun-kortexetik isolatutako mintz gordin (P2), nukleo gordin (P1) eta zitosol (Cyt) frakzioetako proteinak SDS-PAGE banatu

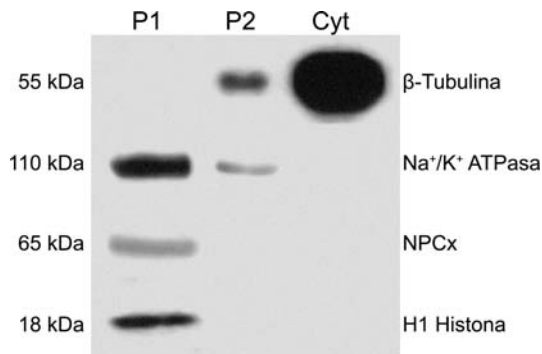
eta immunoblot bidez aztertu genituen. Entsegu horietan, Af380 antigorputzak proteina kargaren menpeko intentsitatea zuen eta DAGL α -ren masa molekular teorikoari (115 kDa) dagokion banda argi bat detektatu zuen mintz gordin (P2) eta nukleo gordin (P1) frakzioetan, baina ez zitoplasman (Cyt). Aldiz, Af1080 antigorputzak ez zuen batere seinalerik eman. Hemen burututako Af380 antigorputzaren balioeste esperimentalaz gainera, antigorputz horren espezifikotasuna DAGL α -KO saguetan berretsi da. (Suárez et al., 2011). Hau guztia kontuan hartuta, afinitate bidez purifikatutako Af380 untxi-antigorputz poliklonala erabili genuen ondorengo entsegu guztietan.



16. irudia. DAGL α aurkako Af380 antigorputza erabiliz, arratoi helduaren garun-kortexeko nukleo gordin (P1, 1-3), mintz gordin (P2, 4-6) eta zitoplasma (Cyt, 7-9) proteinetan aberastutako frakzioetan egindako *immunoblota*. H1 histonaren aurkako antigorputza proteina nuklearren aberaste eta eza egiaztatzen zuten P1 eta P2 frakzioetan hurrenez hurren. Frakzio bakoitzaren proteina kantitate gorakorak (10, 20 eta 40 μ g) kargatu ziren. Ezkerraldean, pisu molekular estandarren migrazioa adierazten da.

Antigorputzen karakterizazioa bideratutako entseguek, zeharka, DAGL α entzima nukleo neuronaletan espresa litekeela iradokitzen dute. Batetik, immunohistoquimia eta immunofluoreszentzia esperimenduak frogatutako antigorputz guztiek seinale argia ematen zuten arratoi helduaren garun-kortexeko nukleo neuronaletan eta antigorputz bikote batzuek emandako seinaleak nabarmen gainezartzen ziren. Bestetik, Af380 antigorputzak DAGL α -ren masa molekularrarekin bat datorren banda argia eman zuen garun-kortexetik isolatutako P1 frakzioan. Dena den, orain arte aurkeztutako ebidentziak ez dira nahikoak DAGL α neuronan nukleoan espresatzen dela zalantzarik gabe baieztatzeko. Hala, garun-kortex ebaketetan aurkitutako seinalea artefakturen baten isla izatea ezin bazter daiteke, fixapenak antigorputzetarako lotura-toki inespezifikoak sor baititzake (Fritschy, 2008). Bestetik, P1 frakzioa proteina nuklearretan aberastuta egonik ere (16.-17. irudiak), nukleoz kanpoko osagaietan kutsatua zegoen. Izan ere, Na⁺/K⁺ ATPasa-ren α 1 subunitatearen seinale indartsua agertu zen P1 frakzioan (17. irudia). Seguruenik, P1 frakzioa isolatzean, nukleoekin batera, erretikulu endoplasmiko eta Golgi-aparatuko mintz astunak hauspeatu

ziren, jariaketa bidean dauden Na^+/K^+ ATPasa gisako mintz-zeharreko proteina ugari dituztenak. Beraz, ezin bazter daiteke P1 frakzioan aurkitutako seinalea aipatutako mintz astunetan dagoen DAGL α proteinaren isla izatea. DAGL α proteina garun-kortexeko nukleo neuronalean espresatzen den zalantzarik gabe zehazteko burututako hurbilketa esperimentalen emaitzak hurrengo atalburuetan deskribatzen dira.



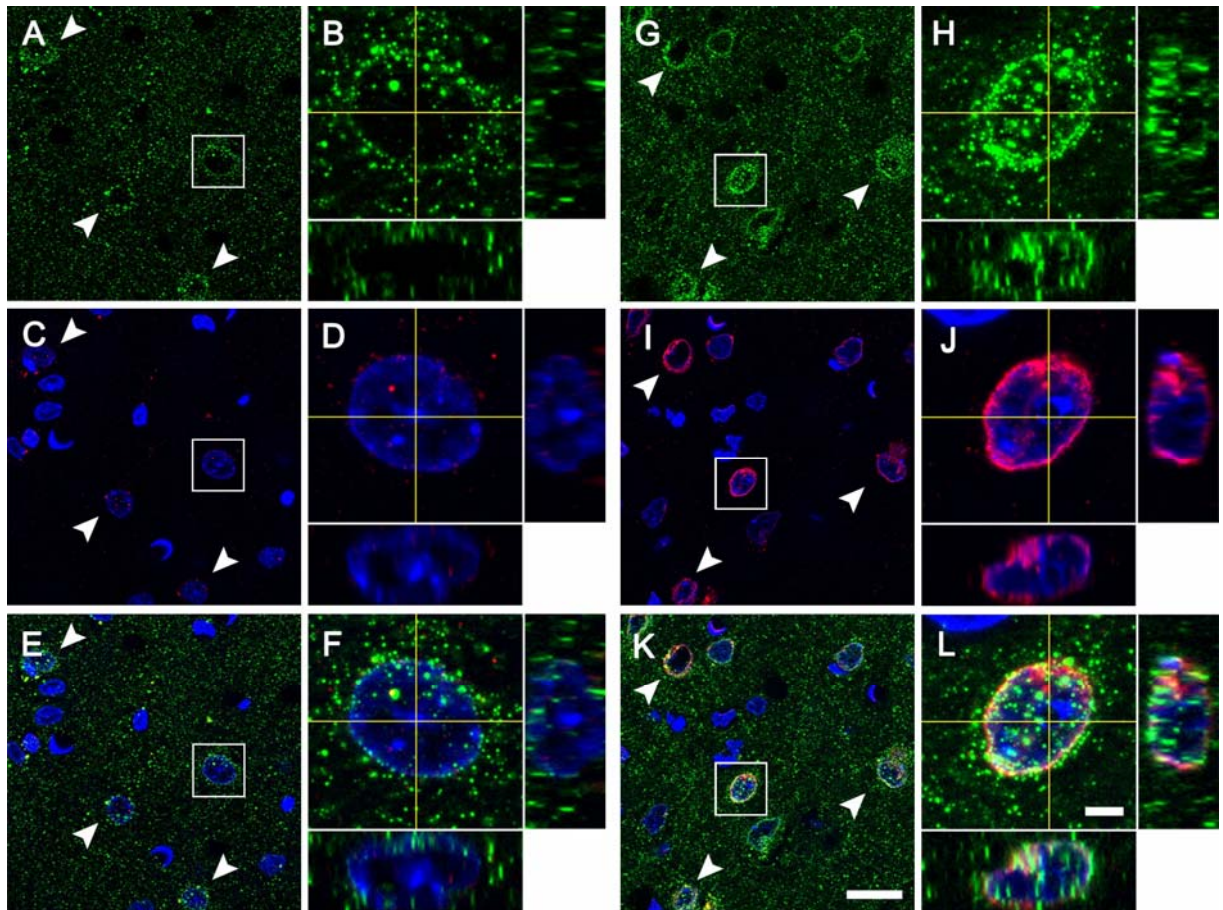
17. irudia. *Western blot* entsegua arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleo gordin (P1), mintz gordin (P2) eta zitoplasma (Cyt) frakzioetan. β -tubulina eta Na^+/K^+ ATPasa-ren α 1 subunitatea (Na^+/K^+ ATPasa) zitoplasmaren eta mintz plasmaticoaren markatzaile gisa erabili ziren hurrenez hurren. Nukleo zelularen markatzaile gisa, poro nuklear konplexua (NPCx) eta H1 histona erabili ziren.

2. DAGL α -REN ESPRESIOAREN AZTERKETA ARRATOI HELDUAREN GARUN-KORTEXEKO MINTZ SINAPTIKOETAN ETA NUKLEO OSOETAN

Aurreko atalburuan deskribatutako emaitzek lan honen lehenengo helburu nagusia betetzea ahalbidetu zuten, hau da, DAGL α -ren aurkako antigorputz espezifiko bat hautatzea. Baitere, aldeaz aurretik deskribatutako kokapen postsinaptikoarekin bat zetorren (Yoshida et al., 2006; Uchigashima et al., 2007) markaketaz aparte, DAGL α -ren kokapen nuklearra iradokitzen duten emaitzak izan genituen. Halere, oso erakargarria izanik ere, aurkikuntza hori zalantzarik gabe berretsi ahal izateko, hurbilketa esperimental gehigarriak beharrezkoak dira. Bigarren atalburu honetan, immunohistokimia, immiunofluoreszentzia eta *Western blot* entseguen bitartez lortutako emaitzei buruz gera litezkeen zalantzak argitzeari ekin genion.

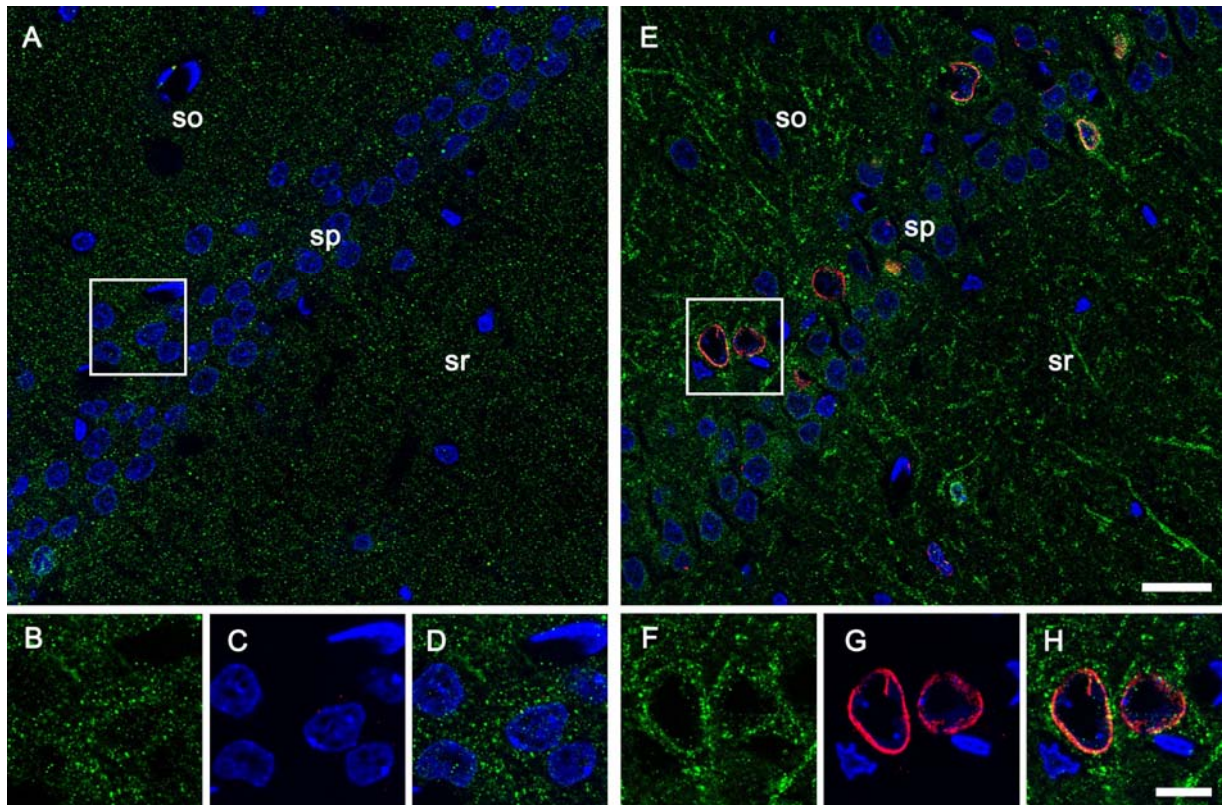
2.1 DAGL α -Immunomarkaketa Arratoiaren Garun-Kortexean

Erabilitako fixapen baldintzen aldaerak DAGL α -ren markaketan artefakturen bat sor lezakeen aztertzeko, DAGL α - eta lamina B1-immunorreaktibitatea baldintza estandarretan eta sodio sulfuro fixapen baldintzetan aztertu genuen bere distribuzioa dagoeneko ondo deskribatuta dagoen hiru garun-eremutan: garun-kortex somatosentsoriala, hipokanpoa eta zerebeloa. Bereizmen handiko fluoreszentzia-mikroskopia bidezko analisiak DAGL α proteinaren puntukako markaketa distiratsua agerian jarri zuen neuropiloan, DAGL α proteinaren kokapen postsinaptikoarekin bat datorrena (Bisogno et al., 2003; Yoshida et al., 2006; Uchigashima et al., 2007). Are gehiago, fixapen estandarrekin alderatuta, neuropiloaren markaketa indartsuagoa zen gure baldintzetan (18. irudia, A-B, H-I). Nukleoaren barneko markaketari dagokionez, profil nuklearrak ondo bereizten ziren inguruko neuropilotik gure baldintzetan baina ez baldintza estandarretan. Gainera, sodio sulfuro fixapen baldintzetan, aurreikus zitekeen bezala, lamina B1 immunorreaktibitatea eraztun perinuklear distiratsu gisa agertzen zen. Ordez, baldintza estandarretan fixatutako ebaketetan, ezin antzeman zitekeen lamina B1-seinalerik (18. irudia, A-F). Nukleoetan, DAGL α -markaketa orban distiratsuek osatzen zuten, gehienbat, nukleoplasman kokatzen zirenak (18. irudia, H-L).



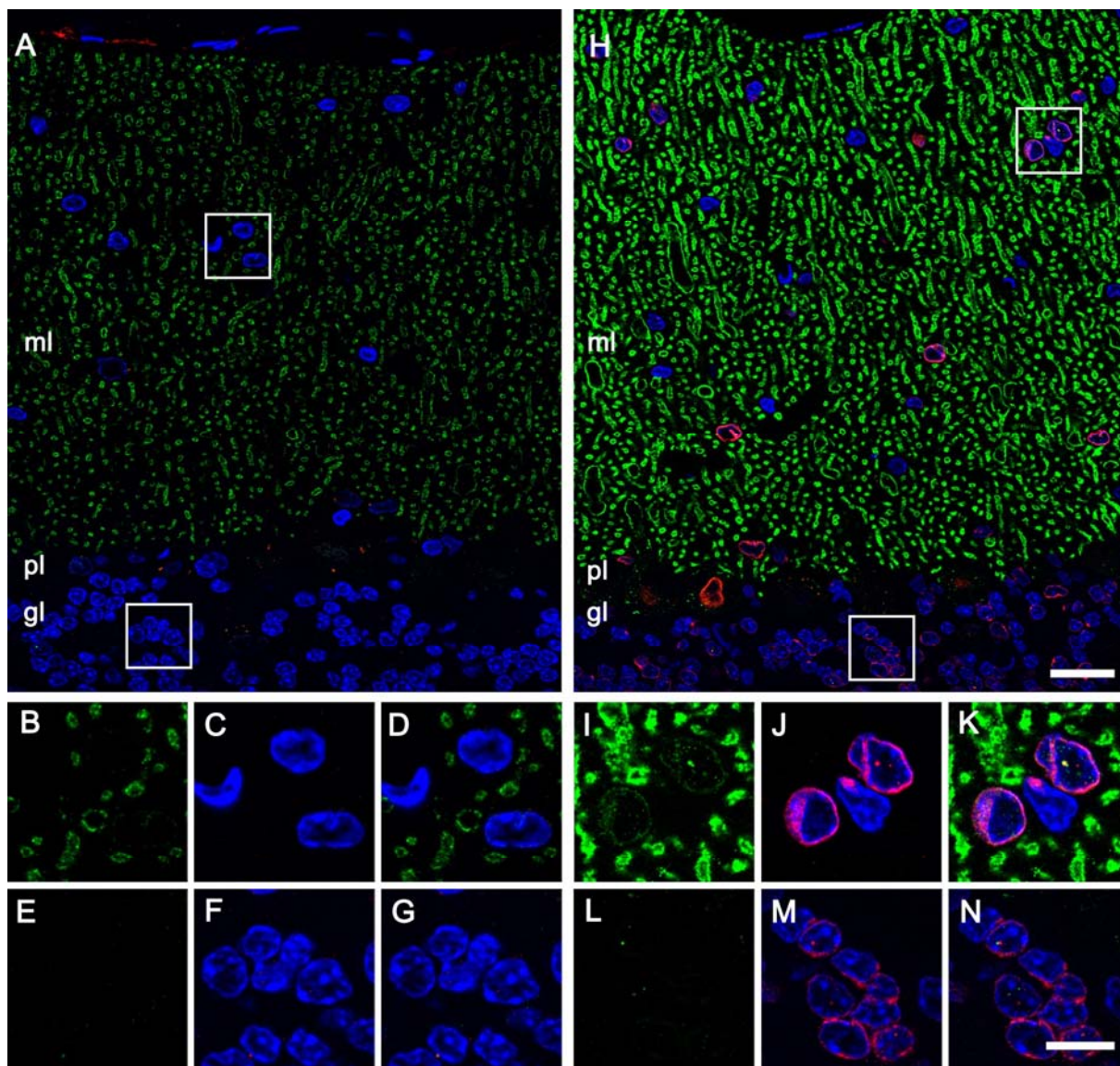
18. irudia. DAGL α (berdez) eta lamina B1 (gorriz) proteinen immunomarketa arratoi helduaren garun-kortex somatosensorialeko V. geruzaren parean. Kromatina Hoechst 33342 konposatuarekin tindatu zen (urdinez). Esperimentua fixapen baldintza estandarretan (A-F) edo sodio sulfuro fixapen baldintzetan (G-L) burutu zen. Gezi-punta zuriek DAGL α -positibo diren profil nuklearrak adierazten dituzte. Ebaketan prozesamendua paraleloan burutu ziren eta argazkiak baldintza berdinetan eskuratu ziren. Mikroargazki guztiak argiztapen egituratuz (ApoTome) hornitutako fluoreszentzia-mikroskopia batekin (Carl Zeiss Axio Observer) egin ziren eta 0,24 μm -ko lau ebaketa optikoren proiektzioak dira. Bereizmen handiagoko nukleoen argazkiak eta dagozkien proiektzio ortogonalak B, D, F, H, J eta L irudietan erakusten dira. Eskala-barrak: 20 μm (A, C, E, G, I, K); 5 μm (B, D, F, H, J, L).

Bi fixapen baldintzetan prozesatutako ebaketetan, DAGL α -immunorreaktibitatearen distribuzioa puntukako marketa gisa agertu zen hipokanpoko CA1 eremuko *strata oriens* (so), piramidal (sp) eta *stratum radiatum* (sr) geruzetan. Era estandarren bidez fixatutako ebaketetan, DAGL α -ren immunomarketaren lokalizazioan, antolaketa arkitektonikoaren aztarnarik ezin antzeman zitekeen bitartean, sulfuro fixapen baldintzetan, CA1-eko neurona piramidalen dendritak argi bereizten ziren so eta sr geruzetan (19. irudia, A, E). Kortexean bezala, sodio sulfuro fixapenak, baina ez fixapen estandarrek, lamina B1 proteinaren detekzioa ahalbidetu zuen (19. irudia, B-D, F-H).



19. irudia. DAGL α (berdez) eta lamina B1 (gorriz) proteinen immunomarkaketa arratoi helduaren hipokanpoko CA1 eremuan. Kromatina Hoechst 33342 konposatuarekin tindatu zen (urdinez). Esperimentua fixapen baldintza estandarretan (A-D) edo sodio sulfuro fixapen baldintzetan (E-H) burutu zen. Era estandarren bidez fixatutako ehunean, DAGL α -ren kontrako antigorputzak puntukako immunomarkaketa lauso bat eman zuen CA1 eremuko *strata oriens* (so), *pyramidal* (sp) eta *stratum radiatum* (sr) geruzetan (A). Sodio sulfuro fixapenaren kasuan, seinalea bereziki bizia agertzen zen so eta sr geruzetara hedatzen ziren dendritetan (E). Soilik sodio sulfuroz fixatutako gertakinetan antzeman zitezkeen nukleoan inguruko perikaria (B eta G alderatu). Halaber, lamina B1 immunorreaktibitatea argi antzeman zitezkeen sodio sulfuroz fixatutako ebaketetan (C-D eta G-H alderatu). Mikroargazki guztiak argiztapen egituratuz (ApoTome) hornitutako fluoreszentsia-mikroskopia batekin (Carl Zeiss Axio Observer) egin ziren eta 0,24 μ m-ko lau ebaketa optikoren proiektzioak dira. Bereizmen handiagoko nukleoan argazkiak B-D eta F-H irudietan erakusten dira. Eskala-barrak: 50 μ m (A, E); 10 μ m (B-D, F-H).

Zerebelo ebaketetan, DAGL α -immunorreaktibitatea, gehienbat, geruza molekularreko Purkinjeren zelulen dendritetara mugatuta zegoen bi fixapen prozeduren bidez prozesatutako ebaketetan (20. irudia, A, H), aurretik egindako deskripzioekin bat datorrena (Bisogno et al., 2003; Yoshida et al., 2006). Kualitatiboki, DAGL α -seinalearen distribuzioa berdina bazen ere, askoz intentsioagoa zen sodio sulfuro fixapen baldintzetan prozesatutako zerebelo ebaketetan (20. irudia, A eta H alderatu) eta, berriro ere, lamina B1 detektagarria zen sodio sulfuro fixapenaz baina ez fixapen estandarraz (20. irudia, B-G eta I-N alderatu). Hipokanpo zein zerebeloko neurona nagusien nukleoetan, DAGL α -immunorreaktibitatea ere aurkitu genuen, baina neuropiloko immunofluoreszentsia-intentsitatea kortexean baino nabarmen handiagoa zenez, argazkiak saturazio azpian hartzeko erabilitako esposizio-denborak laburregiak izan ziren seinale nuklearra agerian jartzeko.



20. irudia. DAGL α (berdez) eta lamina B1 (gorriz) proteinen immunomarkaketa arratoi helduaren zerebeloan. Kromatina Hoechst 33342 konposatuarekin tindatu zen (urdinez). Esperimentua fixapen baldintza estandarretan (A-G) edo sodio sulfuro fixapen baldintzetan (H-N) burutu zen. DAGL α -seinalea, gehienbat, geruza molekularreko (ml) Purkinje zelulen dendritetara mugatuta, baina nabarmen indartsuagoa zen sodio sulfuro fixapen baldintzetan (A, H). Soilik sodio sulfuro fixapen prozedura erabili zenean, Lamina B1-immunorreaktibitatea antzeman zen Purkinje zelulen geruzako (pl), geruza pikortsuko (gl) eta geruza molekularreko (ml) nukleo batzuetan (B-G eta I-N alderatu). Mikroargazki guztiak argiztapen egituratuz (ApoTome) hornitutako fluoreszentsia-mikroskopia batekin (Carl Zeiss Axio Observer) egin ziren eta 0,24 μm -ko lau ebaketa optikoren proiektzioak dira. Bereizmen handiagoko nukleoaren argazkiak B-G eta I-N irudietan erakusten dira. Eskala-barrak: 25 μm (A, H); 10 μm (B-G, I-N).

Orohar, garun-kortex, hipokampo eta zerebelo ebaketa histologikoetan egindako azterketek agerian jartzen du gure fixapen baldintzek DAGL α -immunorreaktibitatea hobetzen dutela. Are gehiago, lamina B1 proteina nuklearrari dagokion seinalea soilik baldintza horietan ahal izan genuen detektatu. Beraz, badirudi sodio sulfuro fixapenez agerian jarri dugun DAGL α -immunomarkaketa nuklearra bestela helezina litzatekeen epitopoa antigorputzarekiko eskuragarri jarri izanaren ondorioa dela.

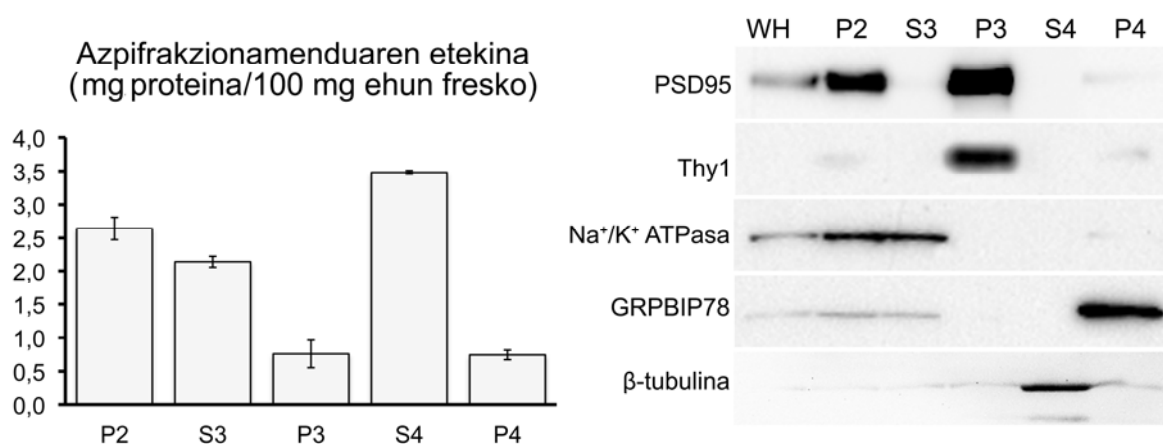
2.2 DAGL α -ren Espresioa Garun-Kortexetik Isolatutako Azpifrakzioetan

Ebaketa histologikoetan ikusitako DAGL α -ren distribuzioaren azterketan sakontzeko asmoz, *Western blot* entseguak burutu genituen arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako frakzioetan. Horretarako bi prozedura desberdin erabili genituen, bata, mintz zelularren domeinu desberdinak isolatzeko eta, bestea, osotasun estrukturala mantentzen duten nukleoak (nukleo osoak) purifikatzeko.

2.2.1 DAGL α -ren Espresioa Garun-Kortexetik Isolatutako Mintzen Azpidomeinuetan

Mintz zelularren azpifrakzioak isolatzeko erabilitako zentrifugazio metodoak dentsitatearen eta TX-100 detergentean disolbagarritasunaren arabera banatzen ditu mintz desberdinak. Metodologian azaltzen den bezala, homogenatu osoaren (WH) zentrifugazio motel baten bidez, zitoplasma eta mintz plasmatikoa barne zituen gainjalkina (S1) eta nukleoez, lisatu gabeko zelulez eta mintz astunez osatutako jalkina (P1) banatu genituen. Bigarren zentrifugazio bizkorrago batez, mintz plasmatico jalkina (P2) eta mintz arinetan aberastutako gainjalkina (S2) banatu genituen. P2 frakzioa TX-100ekin tratatu eta are bizkorrago zentrifugazio ondoren, TX-100 detergentean disolbaezinak diren mintz sinaptikoak jalkinean (P3) geratu ziren eta disolbagarriak direnak gainjalkinean (S3). Azkenik, S2 frakzioaren ultrazentrifugazioaz, mikrosomak (P4) hauspeatu eta zitokol jalkinetik (S4) banatu ziren. Frakzio desberdinetan berreskuratutako proteinen erdia zitosolera (S4) banatu zen eta beste erdia mintz plasmaticoaren (P2; \approx %40) eta mikrosomen (P4; \approx %10) artean. Nabarmenki, mintz plasmaticoetako proteina gehien-gehienak (\approx %74) TX-100ean disolbagarri frakziora (S3) banatu ziren eta soilik portzentaje txiki bat (\approx %26) hauspeatu zen TX-100ean disolbaezin frakziora (P3) (21. irudia, barra-grafikoa). Konpartimentu zelular desberdinen markatzaileak erabiliz, frakzionamenduaren egokitasuna balioetsi genuen. Hala, mintz plasmatico frakzioa (P2) TX-100 detergentearekin tratatu ondoren, PSD95 markatzaile postsinaptikoa mintz sinaptiko jalkinean (P3) agertu zen, baina ez TX-100ean mintz disolbagarrietan (S3). Nabarmenki, baltsa lipidikoen Thy1 markatzaileak portaera berdina erakutsi zuen, baltsa lipidikoetako proteinak P3 frakziora banatzen direla

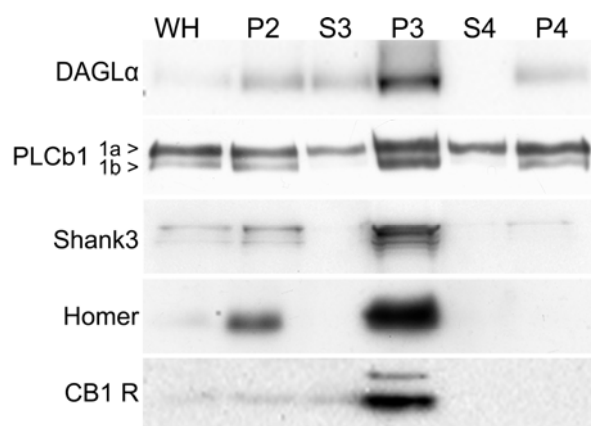
erakusten duena. Na^+/K^+ ATPasa mintz gordinetan (P2) eta bertatik erauzitako TX-100ean disolbagarriak diren mintzetan (S3) besterik ez agertzea TX-100 tratamenduaren efizientziaren adierazle da. Azkenik, GRP78/BiP eta β -tubulina markatzaileen seinale argiak soilik mikrosoma (P4) eta zitosol (S4) frakzioetan agertu ziren eta, beraz, mintz plasmatikoa (P2) eta bere azpifrakzioetan (S3 eta P3) erretikulu endoplasmiko eta zitosol kutsadura oso urria zen (21. irudia, *immunoblotak*).



21. irudia. Ezkerreko barra-grafikoan, arratoi helduaren garun-kortexeko azpifrakzionamenduaren etekina adierazten da. WH, homogenatu osoa; P2, mintz plasmatikoa; S3, TX-100ean mintz disolbagarriak; P3, TX-100ean mintz sinaptiko disolbaezinak; S4, mintz arinak; P4, zitosola. WH, 14.61 ± 0.17 ; P2, 2.64 ± 0.08 ; S3, 2.14 ± 0.21 ; P3, 0.76 ± 0.03 ; S4 3.48 ± 0.07 ; P4 0.74 ± 0.12 mg/100 mg ehun (batezbestekoa \pm SEM; n=4). Eskuineko panelean, frakzio-markatzaile espezifikoak erabiliz, frakzionamenduaren egokitasuna aztertzeko egindako *Western blot* entseguen emaitzen adibidea erakusten da. Erabilitako markatzaileak honako hauek izan ziren: mintz postsinaptikoak (95 kDa-eko dentsitate postsinaptikoaren proteina -PSD95-); mintz plasmatikoa (Na^+/K^+ ATPasa-ren $\alpha 1$ azpiunitatea - Na^+/K^+ ATPasa-); baltsa lipidikoak (timozito-diferentziazio 1 antigenoa -Thy1/CD90-); erretikulu endoplasmikoa (glukosak erregulatutako 78 kDa-eko proteina -GRP78/BiP-); zitosola (β -tubulina). Markatzaileek detektatutako proteinen migrazioa bat zetorren beren masa molekular teorikoekin (PSD95, 80 kDa; Thy1 18 kDa; Na^+/K^+ ATPasa, 113 kDa; GRP78/BiP, 78 kDa; β -tubulina, 50 kDa). PSD95 100 kDa baino pixka bat beherago, Thy1 20 kDa baino pixka bat beherago, Na^+/K^+ ATPasa 100 kDa baino apur bat gorago, GRP78/BiP 75 kDa baino pixka bat gorago eta β -tubulina 50 kDa mailan.

Markatzaile espezifiko bidez ondo karakterizatuko frakzioetan, DAGL α -ren banaketa *Western blot* bidez aztertu genuen (22. irudia). DAGL α -seinalea argi antzeman zen mintz plasmatikoa (P2) frakzioan. P2 mintzak TX-100ekin tratatu eta zentrifugazioz banatu ondoren, DAGL α -seinalea apur bat ahuldu eta nabarmen indartu zen TX-100ean disolbagarri (S3) eta disolbaezin (P3) frakzioetan, DAGL α batez ere mintz sinaptikoetan kokatzen dela adierazten duena. Hala ere, proteina osoaren banaketa kontuan izanik (21. irudia, barra-grafikoa), DAGL α osoaren zati handi samarra TX-100ean disolbagarri frakzioan (S3) kokatzen dela esan dezakegu. DAGL α -seinalea erretikulu endoplasmikoan aberastuta dauden mikrosometan (P4) ahulagoa zen P2-an baino, trafikoan dagoen DAGL α populazioa urria

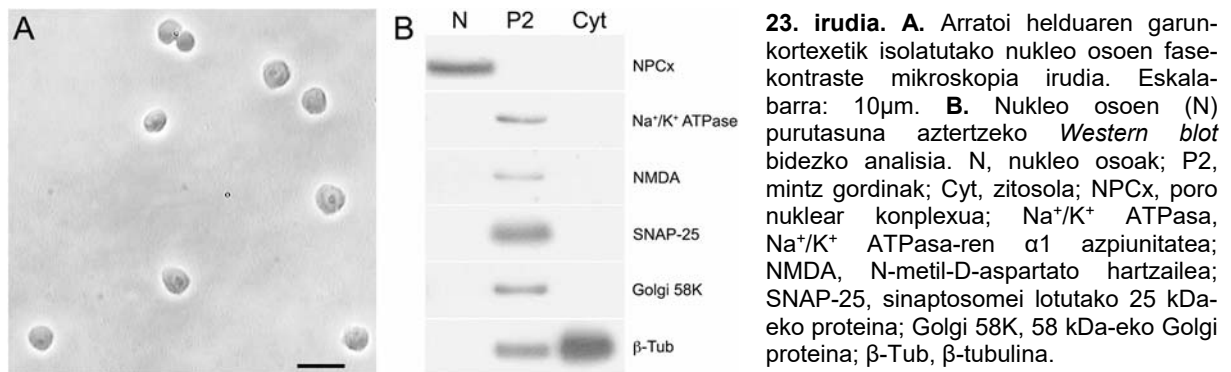
dela iradokitzen duena. DAGL α aztertzeaz gainera, seinaleztapen kannabinoide endogenoan parte hartzen duen elementu nagusietako batzuk aztertu genituen: PLC β 1 entzima, Homer eta Shank3 euskarri-proteinak eta CB1 hartzaillea. PLC β 1 frakzio guztietan aurkitu bagenuen ere, seinalearen indarra eta PLC β 1a/b *splicing* aldaerei zegozkien seinaleen arteko erlazioa nabarmen aldakorrek ziren. Hala, mintz sinaptikoetan (P3), seinalerik indartsuena agertu zen eta PLC β 1a- eta PLC β 1b-immunorreaktibitatea berdintsua zen, beste frakzioetan PLC β 1b aldaeraren seinalea nabarmen handiagoa (WH, P2, P4) ala ia detektaezina (S3, S4) zen bitartean. Ikusitako PLC β 1ren banaketa lokalizazio postsinaptikoan atzera-seinaleztapen endokannabinoidean esleitu zaion rolaekin bat dator (Katona eta Freund, 2008). PLC β 1b nagusiki P3 frakziora banatzea *splicing* aldaera horrek euskarri-proteina postsinaptikoekin dituen loturen isla izan liteke. Izan ere, PLC β 1b aldaeraren karboxilo muturrean dagoen TPPN sekuentziak Shank3 proteinaren SH3 domeinura lotzea ahalbidetzen du (Grubb et al., 2011). Nabarmenki, mintz sinaptiko (P3) frakzioa Shank3 proteinan oso aberastuta zegoen. Espero litekeen bezala, Homer DAGL α -ren euskarri proteinaren (Jung et al., 2007; Katona eta Freund, 2008) seinalea mintz sinaptikoetan (P3), baina ez TX-100ean disolbagarri mintzetan, agertu zen (22. irudia). Azkenik, kokapen presinaptikoa (Katona eta Freund, 2008) duen CB1 hartzailaren immunorreaktibitatea P3 frakzioan nagusitu zen. Crac sekuentziaren bidez, CB1 hartzailak kolesterolarekiko duen lotura horren azpian egon liteke (Maccarrone et al., 2011). Izan ere, P3 frakziora, mintz postsinaptikoez gainera, baltsa lipidikoak banatzen dira (21. irudia).



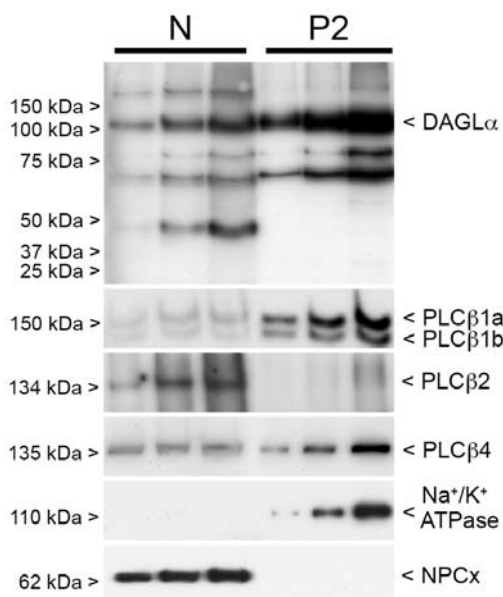
22. irudia. Frakzio azpizelular desberdinetan DAGL α -ren eta seinaleztapen kannabinoide endogenoan parte hartzen duen PLC β 1 entzimaren, Homer eta Shank3 euskarri-proteinen eta CB1 hartzailaren *Western blot* bidezko azterketa. WH, homogenatu osoa; P2, mintz plasmaticoa; S3, TX-100ean mintz disolbagarriak; P3, TX-100ean mintz sinaptiko disolbaezinak; S4, mintz arinak; P4, zitosola. Proteinen migrazioa bat zetorren beren masa molekular teorikoekin (DAGL α , 115 kDa; PLC β 1a, 139 kDa; PLC β 1b, 134; Shank3, 186 kDa; Homer 1b, 40 kDa).

2.2.2 DAGL α -ren Espresioa Garun-Kortexetik Isolatutako Nukleo Osoetan

DAGL α entzima garun-kortexeko nukleoetan espresatzen den zalantzarik gabe zehazteko, purutasun handiko frakzio nuklearra (N frakzioa) isolatzeko prozedura ezagun bat erabili genuen (Thompson, 1973; Dent et al., 2010). Prozedura horrek osotasun estrukturala mantentzen duten nukleoak (nukleo osoak) isolatzea ahalbidetzen du garun-kortexeko homogenatuetatik.



Isolatutako nukleoen egitura-osotasuna egiaztatzeko, laginak fase-kontraste mikroskopiaz aztertu genituen. Prozedurak nukleoen osotasuna mantentzeaz aparte, laginak ezpurutasunez libre zeuden (23. irudia, A). Laginaren purutasuna biokimikoki egiaztatzeko, nukleo oso (N), mintz gordin (P2) eta zitosol (Cyt) frakzioetako proteinak SDS-PAGE bitartez banatu eta, frakzio-markatzaile espezifikoak erabiliz, *immunoblot* bitartez aztertu genituen. Azterketa honetan zalantzarik gabe geratu zen isolatutako nukleo osoen laginaren purutasuna. Hala, frogatutako markatzaile guztietatik, NPCx-seinalea besterik ez genuen aurkitu N frakzioan. Ordez, P2 frakzioan seinale argia eman zuten mintz plasmatico (Na⁺/K⁺ ATPasa), mintz postsinaptiko (NMDA), mintz presinaptiko (SNAP-25), Golgi-aparatu (Golgi 58K) eta zitosol (β -tubulina) markatzaileak detektaezinak ziren N frakzioan. Cyt frakzioan β -tubulina-seinalea besterik ez genuen detektatu, frakzio horren garbitasuna adierazten duena (23. irudia, B).



24. irudia. Arratoi helduaren garun-kortexeko homogenatuetatik isolatutako mintz gordinen (P2) eta nukleo osoen (N) frakzioetan egindako *Western blot* entseguaren emaitzak. N eta P2 frakzioen proteina kantitate gorakorrak (10, 20 eta 30 µg N frakzioan eta 5, 10 eta 20 µg P2 frakzioan) kargatu ziren. N frakzioan, DAGLα eta hiru PLCβ isoforma (PLCβ 1, 2 eta 4) detektatu ziren. Frakzio markatzaile gisa, Na⁺/K⁺ ATPasa-ren α1 azpiunitatearen (Na⁺/K⁺ ATPasa) eta poro nuklear konplexuaren (NPCx) kontrako antigorputzak erabili ziren

Morfologikoki eta biokimikoki ondo karakterizatutako nukleo osoetan (N), DAGLα-ren espresioa *Western blot* bidez aztertu genuen, mintz gordinen frakzioa (P2) kontrol positibo gisa hartuta. Horretarako, ondo karakterizatutako Af380 untxi-antigorputz poliklonala erabili genuen. Aldi berean, PLCβ isoformen aurkako antigorputz espezifikoak erabiliz, PLCβ1-4 isozimen espresioaren analisia ere burutu genuen, mintzean 2-AG emaria ahalbidetzen duten osagaiak nukleoan ere kokatzen diren aztertzeko. DAGLα-ren aurkako antigorputzak entzima horren masa molekular teorikoarekin koherentea den banda espezifiko bat detektatu zuen N zein P2 frakzioetan (24. irudia). DAGLα-z gainera PLCβ1, 2 eta 4 isozimak detektatu ziren N frakzioan, PLCβ3 isozimaren aurkako antigorputzak seinale espezifikorik eman ez zuen bitartean. PLCβ1 eta PLCβ4 isozimen seinalea nabarmen intentsoagoa zen P2 frakzioan N frakzioan baino. Aldiz, PLCβ2-immunorreaktibitatea nukleo osoetan argi detektatu zen eta seinale ahula eman zuen mintz gordinetan (24. irudia).

Oro har, atalburu honetan erakutsitako emaitzek zalantzarik gabe frogatzen dute DAGLα garun-kortexeko nukleoetan espresatzen dela. Are gehiago, PLCβ familiako entzimak ere nukleoan espresatzen direla egiaztatu dugu, kateatutako PLCβ eta DAGL aktibitateen menpeko 2-AG emarirako makineria nukleoan egon litekeela proposatzeko bide ematen duena.

3. 2-ARAKIDONIL GLIZEROLAREN SINTESI-MAKINERIAREN KONPARTIMENTAZIOA ETA FUNTZIONALITATEA GARUN-KORTEXEKO NEURONEN NUKLEOAN

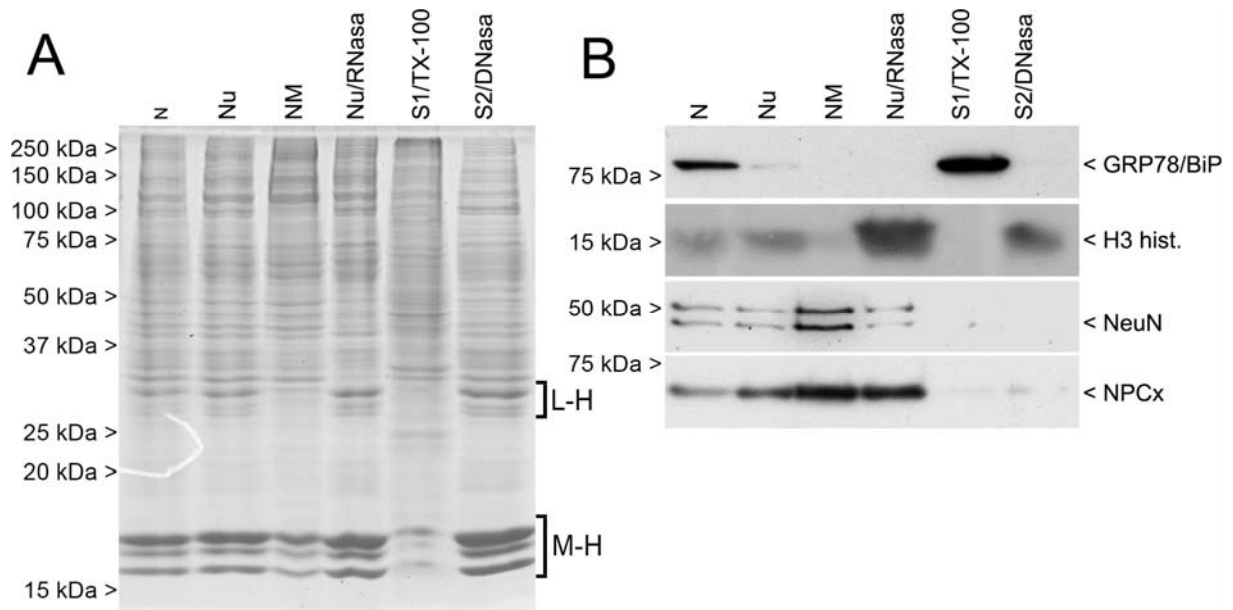
DAGL α eta PLC β 1, 2 eta 4 isoformak arratoi helduaren garun-kortexeko nukleoetan espresatzen direla behin egiaztaturik, elementu horiek 2-AG ekoizpen nuklearra ahalbidetzen duen seinaleztapen-ardatz baten parte diren aztertu genuen. Horretarako, lehenik eta behin, DAGL α eta PLC β 1, 2 eta 4 isozimen konpartimentazio azpinuklearra *Western blot* eta immunofluoreszentzia bikoitza bidez aztertu genuen. Ondoren, kromatografia likido eta masa-espektrometria (LC-MS) bidez 2-AGren metaketa basala eta PLC β /DAGL α aktibitatearekiko menpekotasuna aztertu genuen nukleo osoen laginetan.

3.1 DAGL α -ren Konpartimentazio Azpinuklearra

3.1.1 Immunoblot Analisiak

DAGL α konpartimentazioa karakterizatzeko, garun-kortexetik isolatutako nukleo osoak zatikatu genituen. Horretarako, lehenik, N frakzioa TX-100 detergente ez ionikoarekin tratatuz, nukleo-estaldurako TX-100ean erauzgarri proteinak (nukleo-estaldurari asoziatuak eta nukleoplasmako proteinak) zentrifugazio-gainjalkinera (S1/TX-100) eta nukleoideak (Nu) jalkinera erauzi genituen. Ondoren, nukleoideetatik RNArri edo DNArri lotutako proteinak erauzi genituen. Nukleoideak RNasa A entzimarekin tratatuz, RNArri lotutako proteinik gabeko nukleoideak (Nu/RNasa) hauspeatu genituen. Nukleoideak, sekuentzialki DNasa I entzimarekin eta 0.25 M (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ gatzarekin tratatuz, DNArri lotutako proteinak zentrifugazio-gainjalkinera (S2/DNasa) eta DNArri lotutako proteinik gabeko nukleoideak (NM, matrize nuklearra) jalkinera erauzi genituen. N frakzioa TX-100 detergentearekin tratatu ondoren, nukleo-proteina kantitate totalaren %85a berreskuratu genuen Nu jalkinean. Jarraian, Nu frakzioa DNasa I-ekin eta 0.25 M (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ gatzarekin tratatuz, nukleoideetako proteinen %50 inguru erauzi genuen. Beraz, proteina nuklear osoaren %58 inguru erauzi genuen TX-100 eta DNasa I tratamendu sekuentzialaren ondorioz. Bere aldetik, RNasa A bidezko digestioak Nu frakzioko proteinen %55 eraman zuen eta, beraz, TX-100 eta RNasa

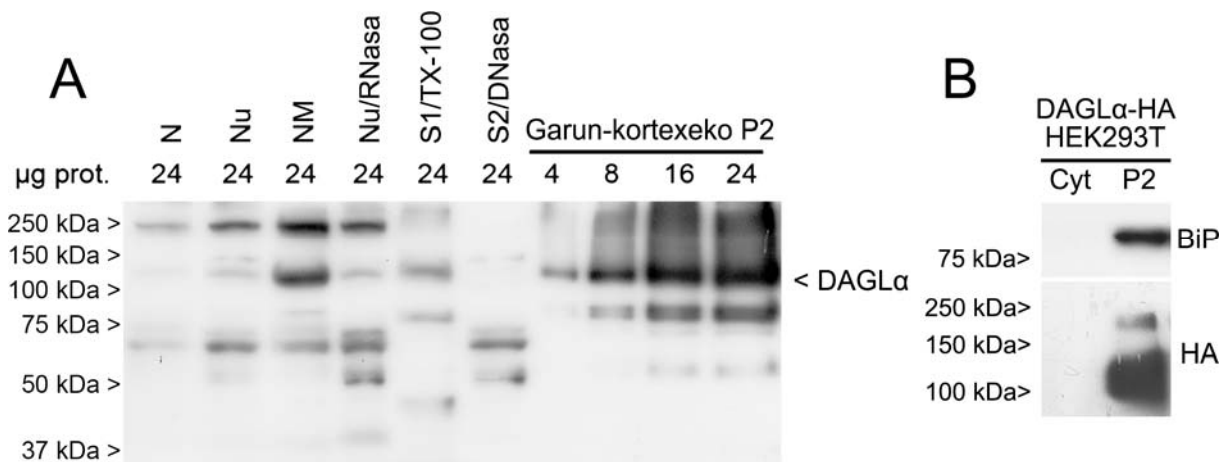
A tratamenduen konbinaketaren ondorioz proteina nuklear osoaren %64 inguru erauzi genuen.



25. irudia. A. Nukleo osoen zatikatze sekuentzialaz banatutako azpifrakzioen SDS-PAGE eta Coomassie urdin tindaketaren bidezko azterketa. N, nukleo osoak; Nu, nukleoideak; NM, matrize nuklearra; Nu/RNasa, RNArri lotutako proteinarik gabeko nukleoideak; S1/TX-100, TX-100ean erauzgarri proteinak; S2/DNasa, DNArri lotutako proteinak. **B.** Azpifrakzio markatzaile espezifikoak erabiliz, lagin berberetan burututako *immunoblot* bidezko azterketaren emaitzak. Erabilitako markatzaileak honako hauek izan ziren: nukleo-estaldura (glukosak erregulatutako 78 kDa-eko proteina, GRP78/BiP); DNArri lotutako proteinak, (H3 histona, H3 hist), matrize neuronala (matrize neuronaleko osagai intrintsekoa den NeuN/Fox-3, NeuN); nukleoideen egitura-osotasuna (poro nuklear konplexuko Nup62 osagaia, NPCx).

Zatikatzeko azpinuklearraren egokitasuna aztertzeko asmoz, frakzio desberdinetako proteinak SDS-PAGE bidez erresolbitu genituen eta *Coomassie* urdin tindatzailearekin markatu genituen. Hala tindatutako poliakrilamida-gelean, frakzio guztien proteina karga berdintsua zela argi ikus zitezkeen (25. irudia, A). Horrez gainera, pisu molekular desberdinetara migratzen zuten banden banaketa profilean desberdintasun nabarmenak antzeman zitezkeen frakzioen artean. Hala, lotze-histonei (H1) eta muin-histonei (H2A, H2B eta H3) dagozkien banden (32-34 kDa eta 15-17 kDa hurrenez hurren; (Belgrader et al., 1991; Ren et al., 2001) intentsitatea nabarmen galdu zen NM frakzioan (25. irudia, A) eta, horrekin bat, histonen markaketa S2/DNasa frakzioan berreskuratu zen. Baitere, espero zitezkeen bezala, Nu/RNasa frakzioa aberatsagoa zen histonetan Nu frakzioa baino (26. irudia, A). Frakzio azpinuklearren purutasuna sakonago aztertzeko, frakzio azpinuklearrak *Western blot* bidez aztertu genituen azpidomeinu nuklear desberdinen markatzaileez baliatuz (25. irudia, B). Honako osagai nuklear hauen kontrako antigorputzak erabili genituen:

erretikulu endoplasmatikoko GRP87/BiP txaperona, poro nuklear konplexuko Nup62 osagaia (NPCx), H3 histona eta matrize neuronaleko osagai intrintsekoa den NeuN/Fox-3 (Dent et al., 2010). Entsegu hauek TX-100 tratamenduak estaldura nuklearra ondo solubilizatu zuela erakutsi zuten. Hala, GRP78/BiP-seinalea ia detektaezina zen Nu frakzioan, S1/TX-100 gainjalkinean berreskuratu zen bitartean (25. irudia, B). H3 histona-seinalea oso ahula zen matrize nuklearrean eta S2/DNasa frakzioan berreskuratu zen, DNasa I/0.25 M (NH₄)₂SO₄ gatz tratamenduak DNari lotutako proteinak ondo erauzi zituela erakusten duena. Aldi berean, barne erribonukleotido sareari lotuta (Dent et al., 2010) dagoen NeuN/Fox-3 *splicing* faktorearen seinalea nabarmen indartu zen NM frakzioan, DNasa I bidezko digestioaren espezifikotasuna adierazten duena (25. irudia, B). RNasa A tratamendua ere oso espezifikoa izan zen erribosa azido nukleikoak digeritzeko. Izan ere, DNari lotutako H3 histona eta erribonukleotidoei lotutako NeuN/Fox-3 proteinen seinaleak nabarmen indartu eta ahuldu ziren Nu/RNasa frakzioan hurrenez hurren. Egitura-osotasunaren adierazle gisa, NPCx-seinalea TX-100 tratamenduari eta nukleasa digestioei eutsi egin zien (25. irudia, B), poro nuklear konplexuak detergente ez ionikoekiko eta nukleasekiko duen erresistentziarekin bat datorrena (Davis eta Blobel, 1986).



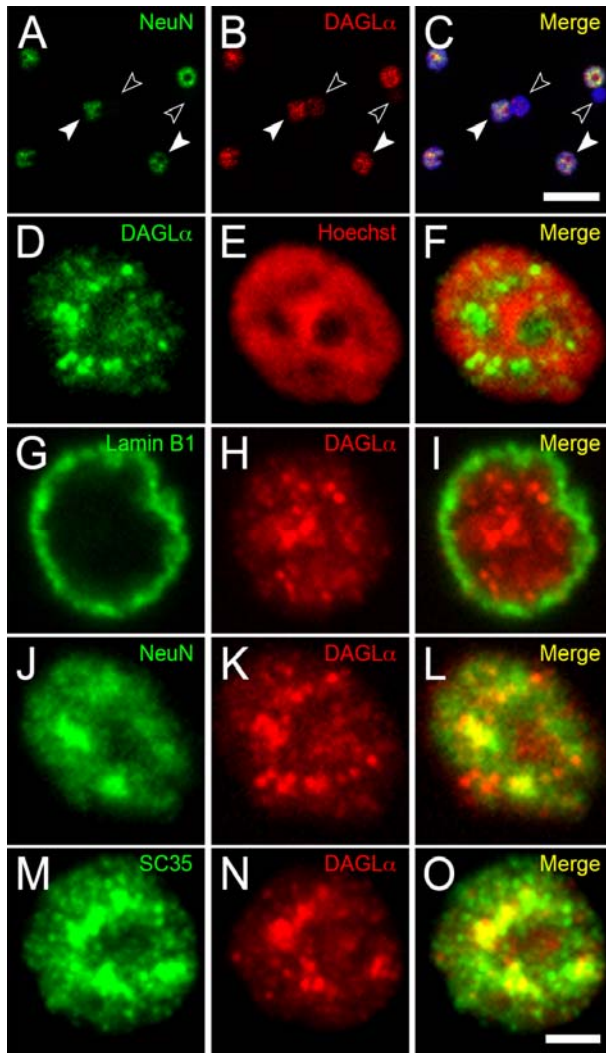
26. irudia. A. DAGLα-ren espresioaren azterketa arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleoan azpifrakzioetan. P2 frakzioa kontrol positibo gisa erabili zen. N, nukleo osoak; Nu, nukleoideak; NM, matrize nuklearra; Nu/RNasa; RNari lotutako proteinarik gabeko nukleoideak; S1/TX-100, TX-100ean erauzgarri proteinak; S2/DNasa, DNari lotutako proteinak. P2, mintz plasmatikoa. **B.** DAGLα-HA fusio proteina kodetzen duen plasmido batekin transfektatutako HEK293T zelulen zitosol (Cyt) eta mintz plasmatiko (P2) laginetan burututako *Western blot* azterketa.

Behin zatikatze prozedura balioetsi genuela, DAGLα-ren konpartimentazioa frakzio azpinuklearretan aztertu genuen. Gorago azaldu denarekin bat, DAGLα-ren aurkako Af380

untxi-antigorputz poliklonalak 115 kDa inguruko banda nagusi bat eman zuen garun-kortexeko mintzetan. Nukleo osoetan (N) ere, berdin migratzen zuen banda bat detektatu zen, askoz ahulagoa bazen ere. Horrekin batera, 250 kDa-eko estandarra baino pixkat beherago seinale indartsuago bat argi ikus zitekeen N frakzioan, eta banda hori P2 frakzioan ere aurkitu genuen, kasu honetan banda nagusia baino ahulago markatuta agertzen zena (26. irudia, A). Nabarmenki, HA-etiketaren aurkako antigorputzak erabiliz, pisu bereko banda bat hemaglutinina etiketadun DAGL α (DAGL α -HA) gainespresatzen zuten HEK293T zeluletatik isolatutako P2 mintzetan ere detektatu zen, seinale hori espezifikoa dela iradokitzen duena. Nukleo-estaldura TX-100 detergente ez-ionikoarekin erauztean, aipatutako bi banden seinalea indartu zen, baina 115 kDa-ekoaren zati bat berreskuratu zen S1/TX-110 frakzioan. Gainjalkin horretan 115 kDa-eko bandaren seinalea nukleoidetan (Nu) baino indartsuagoa bazen ere, DAGL α gehiena Nu frakzioan mantendu zela ondoriozta daiteke kontuan hartzen badugu, *immunoblot* analisirako, frakzio guztien proteina kantitate berdina kargatu zela eta nukleoiden pelletean S1/TX-100 gainjalkinean baino 5,7 aldiz proteina gehiago berreskuratu zela. Nukleoiden DNAr lotutako proteinak erauzi ondoren, bi DAGL α -seinaleak bizi indartu ziren matrize nuklearrean, DAGL α sare erribonukleoproteikoari asoziatu dagoela iradokitzen duena. Zentzu berean, nukleoidak RNasa A entzimarekin tratatu ondoren, seinaleak bere horretan mantendu ziren. RNaren digestioak nukleoidetako proteinaren %55 eramaten duela kontuan hartzen badugu, RNaren digestioak DAGL α -ren zati handi baten erauzketa eragin zuen. 75 kDa azpitik frakzio nuklearretan agertu ziren seinaleen espezifikotasuna balioetsi ezin izan bagenuen ere, beren esangura DAGL α -k nukleo zelularrean kokatzeko izan ditzakeen mekanismoen testuinguruan eztabaidatuko da (ikus eztabaida).

3.1.2 Immunofluoreszentzia Bikoitza eta Bereizmen Handiko Mikroskopia Analsiak

Western blot bidezko azterketaren ondoren, immunofluoreszentzia bikoitza eta bereizmen handiko mikroskopia bidez hurbildu ginen DAGL α -ren konpartimentazio azpinuklearraren analisisira. Lehenik eta behin, DAGL α eta NeuN/Fox-3 (neurona postmitotikoen markatzailea)



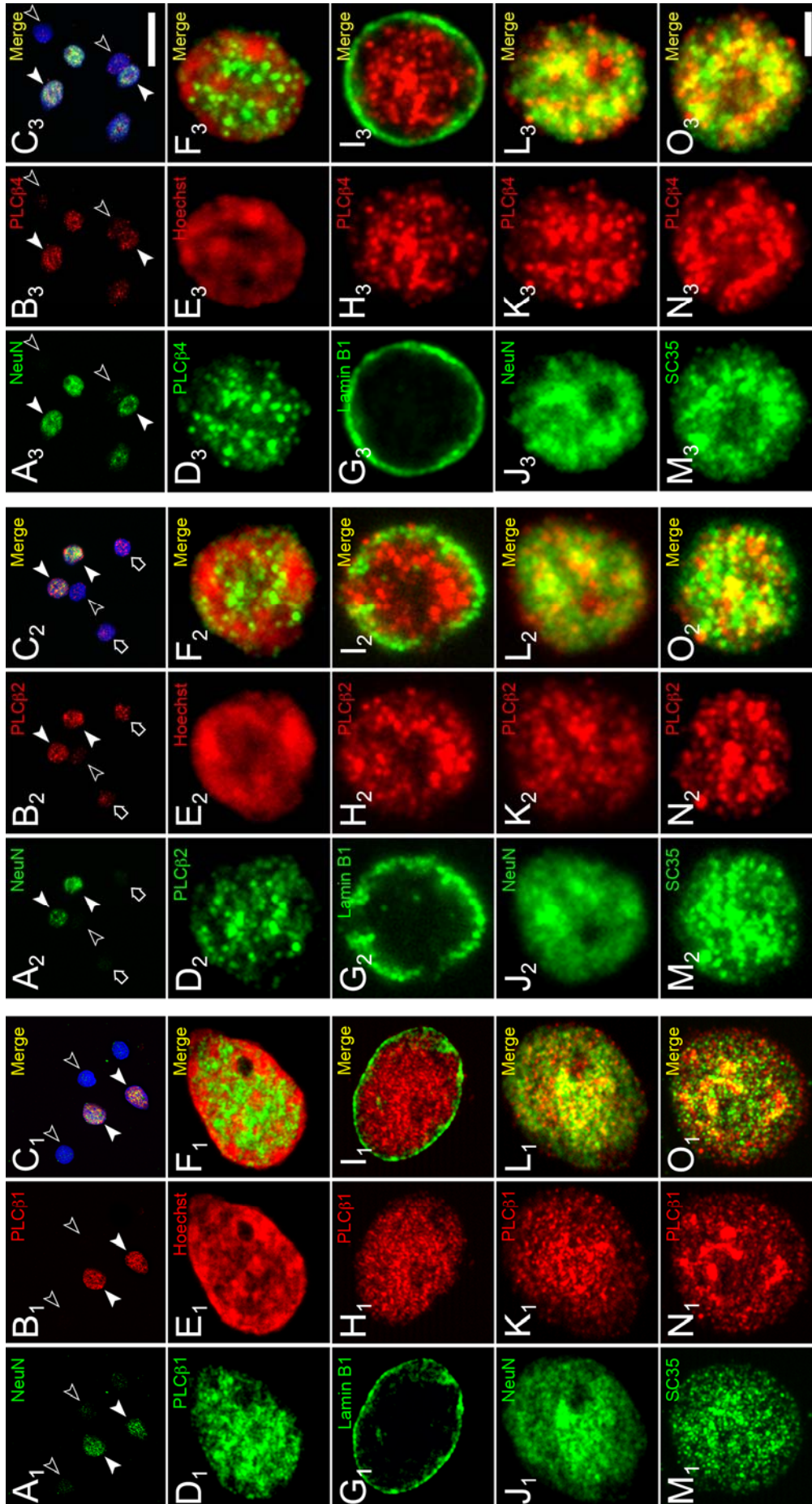
27. irudia. A-C. DAGL α - (gorriz) eta NeuN- (berdez) immunofluoreszentzia bikoitza Hoechst (urdinez) tindaketarekin konbinatuta arratoi helduen garunkortexetik isolatutako nukleo osoetan. Nukleo NeuN-positibo guztiek DAGL α -immunoerreaktibitate sendoa erakutsi zuten bitartean (gezi-punta beteak), NeuN-negatiboetan ez zen DAGL α -markaketarik antzeman (gezi-punta hutsak). D-F. DAGL α -immunomarkaketa (berdez) Hoechst tindaketarekin (gorriz) konbinatuta. G-O. DAGL α -immunomarkaketa (G, J, M, gorriz) Lamina B1 (G-I; berdez), NeuN (J-L, berdez) eta SC35 (M-O, berdez) markatzaileekin konbinatuta. Mikroargazki guztiak argiztapen egituratuz (ApoTome) hornitutako fluoreszentzia-mikroskopia batekin (Carl Zeiss Axio Observer) egin ziren eta 0,24 μ m-ko hiru ebaketa optikoren proiektzioak dira. Eskala-barrak: 20 μ m (A-C argazkietarako); 2,5 μ m. (D-O argazkietarako).

aurkako antigorputzak erabiliz, nukleo osoak immunofluoreszentzia bikoitzaz markatu genituen Hoechst kromatina tindaketarekin konbinatuta. Horrek, soilik jatorri neuronaleko nukleoak (NeuN/Fox-3 positiboak) DAGL α -positibo zirela ikustea ahalbidetu zuen (27. irudia, A-C). Bereizmen handiagoko azterketan, DAGL α -markaketa bizia antzeman zitekeen kromatina tindaketa ahuleko nukleoplasma eremuetan (27. irudia, D-F). Ondoren, DAGL α -immunomarkaketa lamina nuklearraren eta *nuclear speckle* deritzen osagai desberdinen immunomarkaketarekin konbinatuz, DAGL α -ren kokapena zehazkiago aztertu genuen. DAGL α - eta lamina B1-seinaleen arteko gainezarpen ezak, DAGL α xafla nuklearra baino barnerago kokatuta dagoela iradoki zuen (27. irudia, G-I). Bestalde, DAGL α eta NeuN/Fox-3 matrize nuklearreko osagaiaren arteko gainezarpen handia ikusi genuen eta antzeko emaitzak lortu genituen DAGL α -ren eta SC35 *splicing* faktorearen markaketak konbinatu zirenean. Aurkikuntza hauek eta aurreko atalean deskribatutako emaitzek DAGL α arratoi

helduaren garun-kortexeko nukleo neuronalen *nuclear speckle*-en osagaia dela pentsatzeko bidea ematen dute.

3.2 PLC β Isozimen Konpartimentazio Azpinuklearra

Aurreko ikerketa batean, gure laborategian PLC β 1 entzimak neurona kortikalen nukleoetan DAGL α -k duen banaketa berdintsua duela frogatu zen (Montana et al., 2012). Bestalde, PLC β 2 eta PLC β 4 isozimak ere garun-kortexetik isolatutako nukleo osoetan espresatzen dira, lan honen bigarren atalburuan deskribatu dugunez (24. irudia). Horrenbestez, PLC β 2 eta PLC β 4 isoformen kokapen azpinuklearra aztertu genuen. PLC β isozima espezifikoen eta NeuN/Fox-3 *splicing* faktorearen immunomarkaketan konbinaketetan, PLC β 1, PLC β 2 eta PLC β 4 nukleo neuronalean espresatzen direla ikus zitekeen (28. irudia; A_{1,3}-C_{1,3}). Hala ere, PLC β 1 eta 4 isoformak nukleo ez neuronaletan detektagaitzak ziren bitartean (28. irudia; A_{1,3}-C_{1,3}), PLC β 2-immunorreaktibitatea argi antzeman zitekeen NeuN/Fox-3 nukleo negatibo batzuetan (28. irudia; A₂-C₂). PLC β isoformen banaketa azpinuklearra sakonago aztertzeko, konpartimentu nuklearren markatzaile espezifikoak erabiliz, immunofluoreszentzia bikoitza entseguak burutu genituen. Esperimentu hauetan, PLC β isoforma guztiek antzeko kokapen nuklearra zutela ikusi zen. Hau da, PLC β 1, 2 eta 4 antigorputzekin lortutako markaketaren distribuzioa kromatina tindaketa ahuleko nukleoplasma eremuetan (28. irudia; D_{1,3}- F_{1,3}) kokatu zen lamina nuklearraren azpian (28. irudia; G_{1,3}- I_{1,3}), non NeuN/Fox-3 eta SC35-seinaleekin gainezarpen maila altua zuen (28. irudia; J_{1,3}- L_{1,3}, M_{1,3}- O_{1,3}).



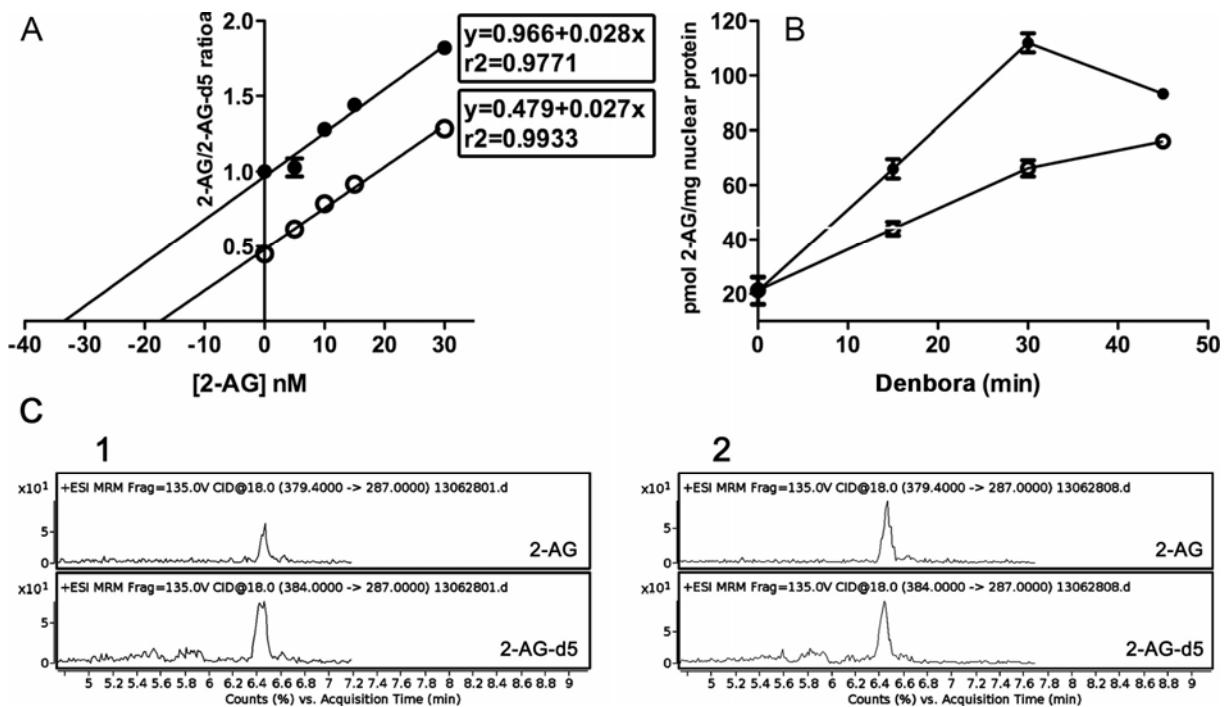
28. irudia. A₁₋₃-C₁₋₃. PLCβ1,2,4 isozimen (gorriz) eta NeuN-immunofluoreszentzia (berdez) bikoitza Hoechst (urdinez) tindaketarekin konbinatuta arratoi helduen garun-kortextetik isolatutako nukleo osoetan. PLCβ1 eta PLCβ4 isozimak soilik nukleo neuroaletan espresatzen zen eta PLCβ isozima nukleo neuronal guztietan eta ez neuronal batzuetan. D₁₋₃-F₁₋₃. PLCβ1,2,4 isozimen (gorriz) immunomarketa Hoechst tindaketarekin konbinatuta. G₁₋₃-O₁₋₃. PLCβ1,2,4 isozimen immunofluoreszentzia lamina B1 (G₁₋₃-I₁₋₃; berdez), NeuN (J₁₋₃-L₁₋₃; berdez) eta SC35 (M₁₋₃-O₁₋₃; berdez) markatzaileekin konbinatuta. Mikroorgazki guztiak argiztapen egituratuz (ApoTome) homitutako fluoreszentzia-mikroskopia batekin (Carl Zeiss Axio Observer) egin ziren eta 0,24 μm-ko hiru ebaketa optikoren proiektzioak dira. Eskala-barrak: 20 μm (A-C argazkietarako); 2,5 μm. (D-O argazkietarako).

3.3 PLC β eta DAGL α Menpeko 2-AG Ekoizpen Endogenoa Nukleo Osoetan

Hainbat taldek fosfoinositidoen zikloa (biosintesi- eta degradazio-makineria) zelularen nukleoan espresatzen dela frogatu dute (Payraastre et al., 1992; Boronenkov et al., 1998; Osborne et al., 2001; Tabellini et al., 2003). Autore horiek DAG ekoizpena deskribatu dute nukleo isolatuetan, eta ekoizpen hori fosfatidilinositol (PtdIns) espezifikoa den PLC aktibitate baten menpekoa dela erakutsi dute (Sun et al., 1997; D'Santos et al., 1999). Ebidentzia horiek eta nukleo neuronaletan ikusi dugun PLC β eta DAGL α proteinen konpartimentazioak 2-AG ekoizpen nuklear endogenoa proposatzera eramán gintuen. Horrenbestez, 2-AG ekoizpena kromatografia likido eta masa espektrometria (LC-MS) bitartez neurtu genuen nukleo isolatuetan. Ekoizpen hori PLC β /DAGL α seinaleztapen-ardatz baten menpekoa izan litekeen aztertzeko, egoera basalean zein PLC β aktibitatearen estimulaziopean neurtu genuen. Egoera basalean eta estimulatutako baldintzetan 2-AG endogenoaren maila optimizatzeko, eta degradaziotik babesteko, esperimentu guztiak honako inhibitzaile hauen presentzian burutu ziren: 10 μ M D-609, fosfatidilkolina-PLC (PtdCho-PLC) aktibitatearen inhibitzailea; 10 μ M R59949, DAG kinasa (DAGK) aktibitatearen inhibitzailea; eta 10 μ M NAM, monoazilglicerol lipasa (MAGL) aktibitatearen inhibitzailea (ikus eztabaida).

2-AG maila endogenoa LC/MS bitartez zehatz neurtzeko, diluzio isotopiko eta estandarren adizio teknikak konbinatu ziren (29. irudia, A). PLC β isozimen menpeko 2-AG ekoizpena aztertzeko, m-3M3FBS konposatua (PtdIns-PLC familiko aktibatzailea) edo kaltzio ioiak erabili ziren. Egoera basalean metatutako 2-AG mailak (60 pmol/mg proteina inguru) ia bikoiztu ziren m-3M3FBS bidezko estimulaziopean (30. irudia, A). Egoera basalean zein estimulaziopean (10 μ M m-3M3FBS), 2-AG metaketak erlazio lineala erakutsi zuen denborarekiko eta proteina nuklear kontzentrazioarekiko (29. irudia, B). 2-AG metaketa m-3M3FBS kontzentrazioaren menpekoa izanik, 2-AG metaketa bultzatzeko aktibatzaile horrek duen EC₅₀ balioa (5 μ M) kalkulatu ahal izan genuen (30. irudia, A). Nabarmenki, o-3M3FBS

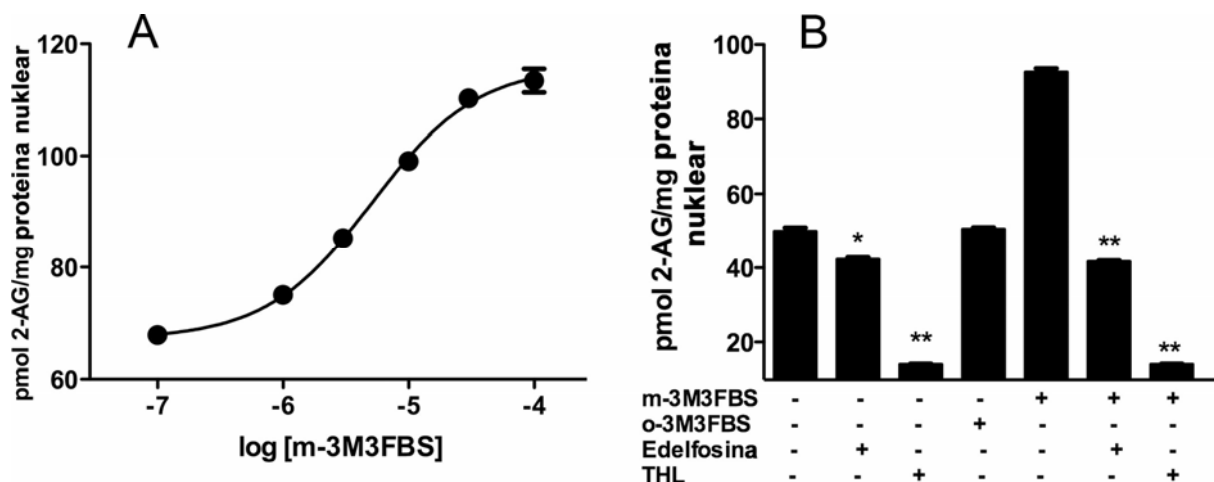
konposatuak (m-3M3FBS aktibatzailearen analogo inaktiboa) ez zituen 2-AG maila basalak aldatu (31. irudia, B).



29. irudia. A. Egoera basalean eta estimulaziopean (10 μ M m-3M3FBS), arratoi helduaren garun-kortexeko nukleo osoetan 2-AG endogeno mailak neurtzeko erabilitako metodoa (diluzio isotopikoa eta estandarren adizio tekniken konbinaketa) erakusten duen irudia. Hiru aldiz errepikatutako hiru esperimentu burutu ziren eta bakoitzean 10 azpilagin (5/baldintza) erabili ziren. Metilazetato/hexano bidez erauzi aurretik, azpilagin bakoitzari 50 nM 2-AG-d5 eta 2-AG estandarren kantitate gorakorak (5, 10, 15 eta 30 nM) gehitu zitzaizkion eta laginaren 200 μ g proteinan 30 minutuz metatutako 2-AGa neurtu zen. Egoera basal (o) eta m-3M3FBS (10 μ M) estimulazio baldintzetan (*) lortutako 2-AG/2-AG-d5 ratioei zegozkien seinaleak normalizatu ziren eta, "hobekien-egokitutako" zuzenak kalkulatu ondoren, grafikoki adierazi ziren. Funtsean, lortutako zuzenak paraleloak ziren, baina puntu desberdinetan moztzen zituzten y eta x ardatzak. **B.** 2-AG metaketaren analisisia denboran zehar estimulatu gabeko (o) eta 10 μ M m-3M3FBS bidez estimulatutako (*) nukleo osoen laginetan. Hiru aldiz errepikatutako hiru esperimentu independenteen emaitzak erakusten dira. **C** 2-AG maila endogenoaren MRM kromatograma adierazgarriak. Horrelako puntu bakoitza kalkulatzeko, 2-AG-d5 estandarri (50 nM) estimulatu gabeko (D1) edo 10 μ M m-3M3-FBS bidez estimulatutako (D2) nukleo osoaren laginaren kantitate konstante eta ezaguna gehitu zitzaion.

Geroago, kaltzio askearen kontzentrazio gorakorak erabiliz, kaltzioak 2-AG metaketan duen eragina aztertu genuen. Kaltzio askearen kontzentrazioak CaCl_2 eta EGTA kelatzailearen proportzioak aldatuz doitu ziren. Entsegu hauetan, kaltzioa 2-AG metaketa estimulatzeko gai zela argi ikusi genuen (31. irudia, A), eta efektu hori kaltzio kontzentrazioaren menpekoa zen. Hala, 2-AG metaketaren estimulazioa esangura estatistikora eta maximora heldu zen 100 nM eta 3 μ M kaltzio kontzentrazioekin hurrenez hurren. Aldi berean, 2-AG metaketa asko murrizten zen baldintza basaletan (3mM EGTA dagoenean, CaCl_2 gehitu barik) (31. irudia, A). Kaltzioak eragindako 2-AG metaketa

erregresio ez-lineala bidez aztertuz, eragin maximoaren erdia lortzeko behar den kaltzio kontzentrazioa 350 nM ingurukoa dela kalkulatu genuen (31. irudia, A).

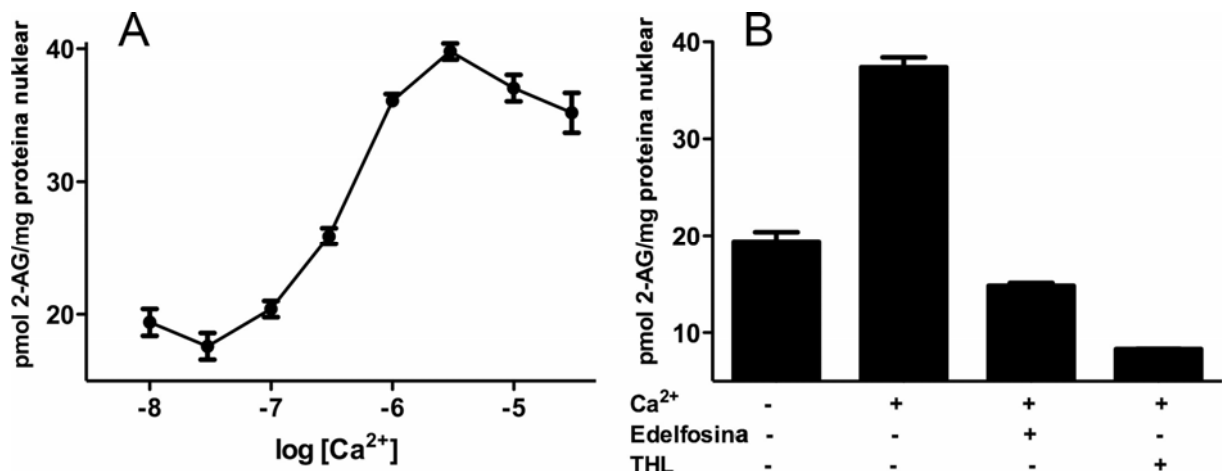


30. irudia. A. Arratoi kortexeko nukleo osoetan 30 minutuz neurtutako m-3M3FBS-ren kontzentrazioarekiko 2-arakidonil-glicerolaren (2-AG) metaketaren menpeketasuna. Baldintza basaletan, 2-AGren metaketaren balioa, 67.1 ± 0.7 pmol proteina nuklear totalen mg bakoitzek zen. 2-AG metaketa, m-3M3FBS konposatuarekiko kontzentrazio-menpekorra suertatu zen: $E_{max} = 116.1 \pm 1.0$ pmol proteina nuklear totalaren mg bakoitzeko eta $EC_{50} = 5.09 \pm 0.3$ μ M. **B.** Arratoi helduen kortexeko nukleo osoetan egoera basalean edo hurrengo konposatuen 10 μ M-ekin 30 minututan zehar lortutako 2-AGaren metaketa: m-3M3FBS, o-3M3FBS, edelfosina, eta THL. Balio guztiak bi aldiz egindako hiru esperimentu independenteen batazbestekoa \pm SEM dira. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ bersus dagokien balore basal edo m-3M3FBS balioak. (ANOVA adierazgarriaren ostean desparekatutako bi buztaneko Studenten t-testa).

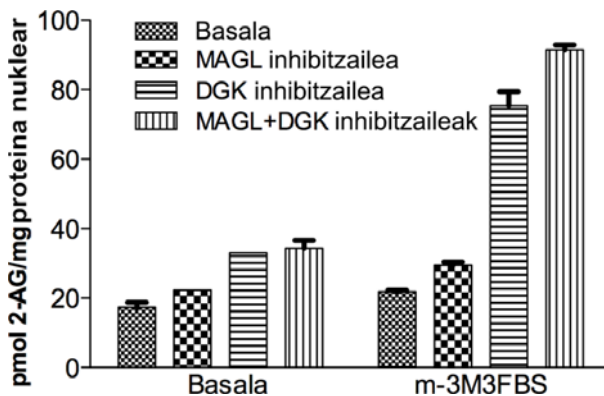
2-AG metaketa PLC β eta DAGL aktibitate entzimatiakoen menpekoa zen egiaztatzeko edelfosina eta tetrahidrolipstatina (THL) inhibitzaileak erabili genituen hurrenez hurren. Edelfosinak (10 μ M) %20-25 murriztu zuen 2-AG metaketa basala (31 irudia, B). Gainera, 10 μ M edelfosinak erabat inhibititu zuen m-3M3FBS konposatuak eta kaltzio ioiak eragindako 2-AG metaketa, maila basalaren azpitik ere jaitsi zena (30. irudia, B; 31. irudia, B). Bere aldetik, THL (10 μ M) inhibitzaileak 2-AG metaketa basala zein m-3M3FBS eta kaltzio bidezko estimulatutakoa erabat indargabetu zituen (30. irudia, B; 31. irudia, B). DAGK inhibitzaileak era berean, egoera basaleko eta m-3M3FBS bidez estimulatutako sistemaren 2-AG metaketa areagotu zituen (32. irudia).

Nukleo osoen laginetan, MAGL eta DAGK aktibitate entzimatiakoen 2-AG metaketa endogenoan izan zezaketen eragina aztertzeko asmoz, esperimentu gehigarriak burutu genituen. Horretarako, 2-AG metaketa entseguetan, MAGL eta DAGK aktibitateen inhibitzaileak diren NAM eta R59949 konposatuetako bat ala biak omititu ziren. Nabarmenki, MAGL inhibitzaileak soilik DAGK inhibitzailearekin konbinatu zenean izan zuen eragin

esanguratsua. Aitzitik, DAGK inhibitzaileak bai 2-AG metaketa basala eta baita m-3M3FBS bidez estimulatutakoa ere handitu zituen (32. irudia)



31. irudia. A. 2-AG metaketaren kaltzio kontzentrazioarekiko menpekotasuna arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleo osoetan. Egoera basalean (3 nM EGTA, CaCl₂ gehitu gabe) inkubatutako nukleo osoetan, 18,8 ± 0,7 pmol 2-AG metatu ziren proteina miligramoko. Kaltzioak suspertutako 2-AG metaketa kontzentrazio-menpekoa zen: Emax = 37,4 ± 0,7 pmol/mg proteina nuklear, EC₅₀ = 0,357 ± 0,08 μM. **B.** Kaltzio-menpeko 2-AG metaketaren inhibizioa PLCβ eta DAGL aktibitateen inhibitzaileen eraginez. Nukleo osoak kaltziorik gabe (egoera basala), 10 μM edelfosinarekin (PLCβ inhibitzailea) edo 10 μM tetrahidrolipstatinarekin (THL, DAGL inhibitzailea) inkubatu ziren. Balio denak bikoiztuta egindako hiru esperimentu independenteren batezbestekoak ± SEM dira. **p<0,001 balio bakoitzaren egoera basala versus zegokion 10 μM kaltzio bidezko estimulazioa. (ANOVA esanguratsua ondoan, pareatu gabeko bi buztaneko *Student t*-test).



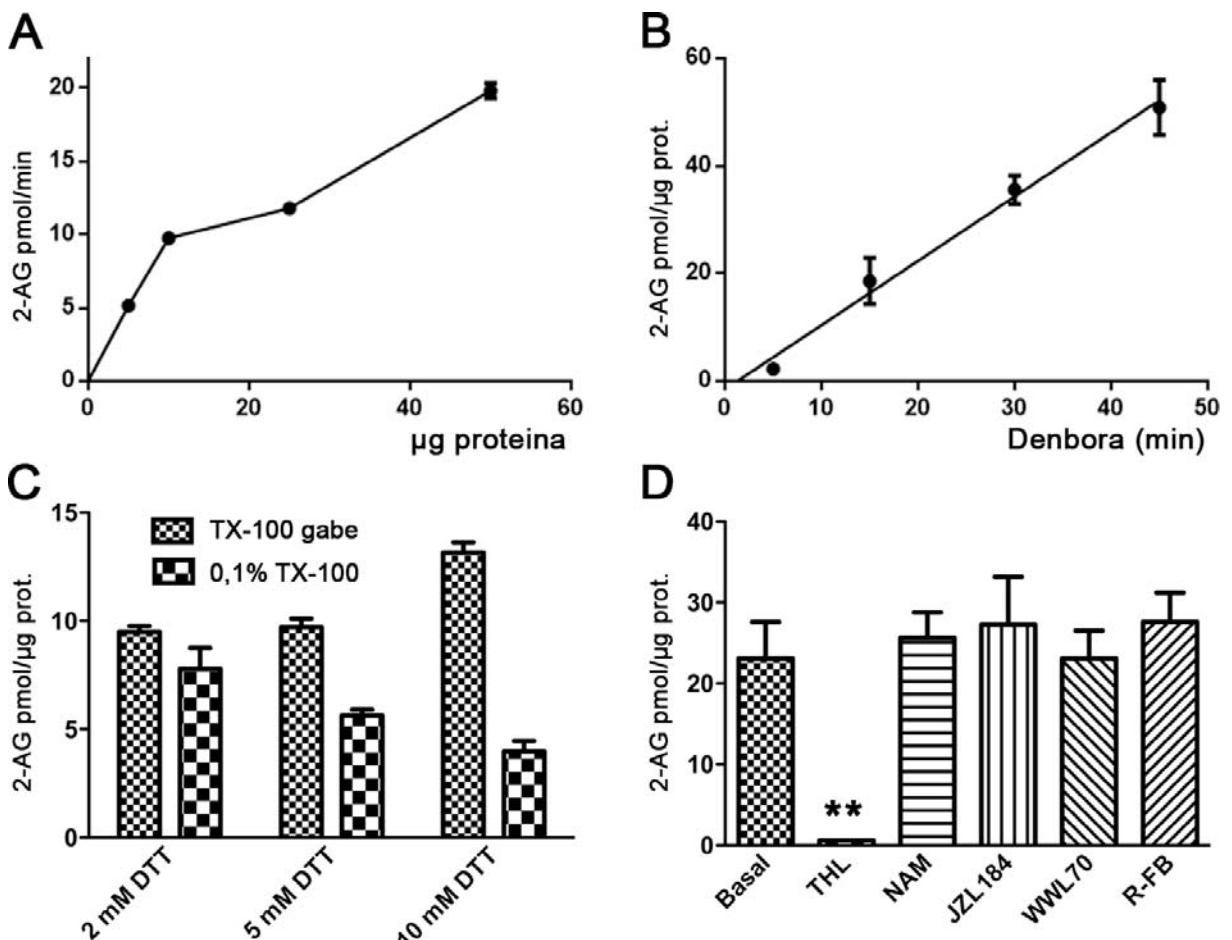
32. irudia. 2-AG metaketa (pmol/mg proteina) arratoiaren garun-kortexeko nukleo osoetan, egoera basalean edo m-3M3FBS bidez estimulatutakoan. Esperimentuak inhibitzailearik gabe edo MAGL, DGK edo MAGL + DGK inhibitzaileen presentzian burutu ziren. Inhibitzaile guztiak 10 μM kontzentrazioan erabili ziren.

4. DIAZILGLIZEROL LIPASAREN AKTIBITATE ENTZIMATIKOA ETA 2-AG HIDROLISIA MATRIZE NUKLEARREAN

4.1 DAGL Aktibitate Entzimatikoa Matrize Nuklearrean

DAGL aktibitate entzimatikoa arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleoetan neurtzeko matrize nuklear (NM) azpifrakzioa aukeratu genuen, aldez aurreko emaitzek aktibitate entzimatikorik altueneko frakzioa dela iradoki baitzuten. Esperimentu guztietan, 1-estearoil-2-arakidonil-sn-glizerol (SAG) DAG espeziea erabili genuen DAGLren substratu gisa. DAGL α isozimaren K_M aparentea $158 \pm 24 \mu\text{M}$ izanik (Shonesy et al., 2013), baldintza esperimental optimoak ezartzera bideratutako hasierako esperimentuetan, SAG kontzentrazioa $200 \mu\text{M}$ -ean finkatu genuen, Shonesy eta kolaboratzaileek (2013) kalkulaturako K_M baliotik hurbil hain zuzen ere. 2-AG ekoizpenak joera lineala zuen matrize nuklearreko proteina kantitatearekiko 5 eta $10 \mu\text{g}$ bitartean (33. irudia, A) eta, denboran zehar ere, linealtasuna mantendu zen 5 eta 45 minutu bitartean (33. irudia, B). DAGL aktibitatea kontzentrazio-menpekotasuna erakutsi zuen ditiotreitol (DTT) agente erreduktorearekiko 2 eta 10 mM tartean, kontzentrazio optimoa 10 mM izan zela (34. irudia, C). TX-100 (%0,1) detergente ez-ionikoaren eragina aztertu genuenean DTT kontzentrazio gorakorretan, DAGL aktibitatearen menpeko 2-AG emaria nabarmen inhibitzen zuela ikusi genuen (33. irudia, C). Erreakzio-baldintza optimoetan ($10 \mu\text{g}$ proteina, 15 min, 10 mM DTT), $200 \mu\text{M}$ SAG substratua emanda, THL ($10 \mu\text{M}$) inhibitzaileak 2-AG ekoizpena erabat indargabetu zuen (33. irudia D). Batere AA metaketarik ikusi ez bagenuen ere, aktibitate hidrolitikoek 2-AG metaketan eraginen bat izan zezaketen baztertzeko, entseguak MAGL eta ABHD6 entzimen inhibitzaile selektiboen presentzian ere burutu genituen. Entsegu horietan, MAGL entzimaren NAM ($10 \mu\text{M}$) eta JZL184 ($10 \mu\text{M}$) inhibitzaileek batere eraginik ez zutela ikusi genuen eta ezta ere WWL70 ($10 \mu\text{M}$) ABHD6 entzimaren inhibitzaileak (33. irudia, D). Bestalde, aktibitate ziklooxigenasak 2-AG metaketan izan zezakeen eragina baztertzeko, R-flurbiprofeno (R-FB) inhibitzailea erabili genuen. Berriro ere, ziklooxigenasa-2 (COX2) entzimaren inhibitzaile selektibo horrek ez zuen inolako eraginik izan 2-AG metaketan (33.

irudia, D). Serina-hidrolasen eta COX2 entzimaren inhibitzaile selektiboak aukeratzeko, alde zuzenetik argitaratutako datuetan oinarritu ginen (Saario et al., 2005; Li et al., 2007; Blankman et al., 2007; Bin Pan et al., 2009; Navia-Paldanius et al., 2012). Matrize nuklear laginetan finkatutako baldintza esperimentaletan, DAGL aktibitatearen ondorioz sortutako 2-AGa degradatzen ez zenez, 2-AG metaketaren neurketa DAGL aktibitatearen zinetika entzimatikoa aztertzeko egokia zela ondorioztatu genuen.

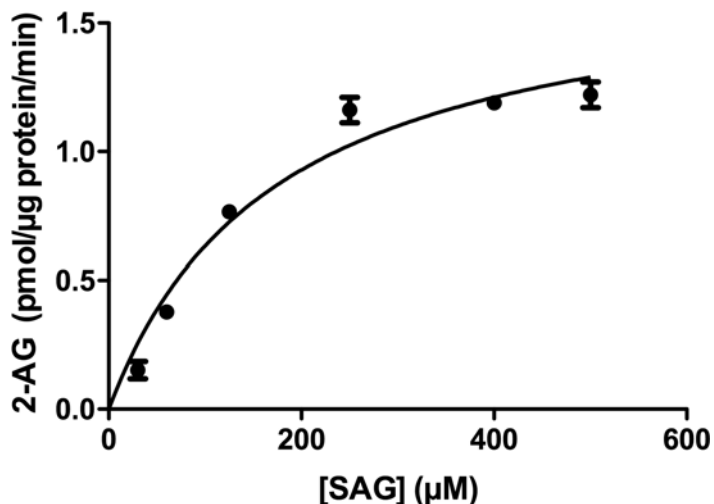


33. irudia. Garun-kortexeko nukleo osoen matrize nuklear (NM) laginetan, DAGL aktibitatearen menpeko 2-AG emaria neurtzeko optimizazio entseguak. Substratu gisa 200 µM 1-estearoil-2-arakidonil-sn-glicerol (SAG) erabili zen. **A.** 2-AG metaketaren linealtasunaren azterketa NM proteina kantitatearekiko. **B.** 2-AG metaketaren linealtasunaren azterketa denborarekiko. **C.** Ditiotreitol (DTT) agente erreduktorearen eta TX-100 detergentearen eragina DAGL aktibitatearen menpeko 2-AG emarian. **D.** MAGL eta ABHD6 serina-hidrolasen eta COX2 ziklooxigenasaren inhibitzaileen eragina DAGL aktibitatearen menpeko 2-AG metaketan. NM laginetan, 2-AG emaria DAGL aktibitatearen menpekora dela egiaztatzeko, tetrahidrolipstatina (THL) inhibitzaile ez-selektiboa erabili genuen. Serina-hidrolasen eta COX2 inhibitzaile selektiboak honako hauek izan ziren: □MAGL (10 µM N-arakidonilmaleimida -NAM- eta 10 µM JZL184); ABHD6 (10 µM WWL70), COX2 (10 µM R-flurbiprofeno, R-FB).

DAGL aktibitatearen menpeko 2-AG emaria neurtzeko baldintzak behin optimizatuta, DAGL aktibitate entzimatiakoaren konstanteak zehazteko entseguak burutu genituen NM laginetan. Horretarako, SAG substratuaren kontzentrazio gorakorrek erabili genituen 30-500

μM tartean, eta sortutako 2-AGaren garapen-kurbak Michaelis-Menten ekuaziora egokitu genituen (34. irudia). Horrela, Michaelis-Menten konstantea (K_M) eta erreakzio entzimatiakoaren abiadura maximoa (V_{max}) kalkulatu genituen. Lortutako balioak honako hauek izan ziren: $K_M = 179,8 \pm 15,8 \mu\text{M}$ eta $V_{max} = 1,3 \pm 0,22 \text{ pmol}/\mu\text{g}$ proteina/min (batezbestekoak \pm SEM). Kalkulatutako K_M balioa bat dator alde zurririk DAGL α gainespresatzen duten zelulen mintzetan aurkitutakoarekin (Shonesy et al., 2013), 2-AG emariaren erantzulea DAGL α isozima dela iradokitzen duena. Ordez, espero litekeen bezala, nukleo matrizean guk kalkulatuak V_{max} balioa Shonesy eta kolaboratzaileek (2013) aipatuak sistema zelularren mintzetan ikusitakoa baino nabarmen txikiagoa da ($1,3 \pm 0,22$ vs. $9.8 \pm 1,1 \text{ pmol}/\mu\text{g}$ proteina/min).

34. irudia. 2-AG emariaren zinetika entzimatiakoaren azterketa garun-kortexetik isolatutako nukleo osoen NM frakzioan. SAG substratua 30-500 μM tartean zeuden sei kontzentrazio gorakorretan eman zen eta sortutako 2-AGa LC/MS bitartez neurtu zen. Ondoren, Michaelis-Menten zinetikara egokitzen ziren garapen-kurbetarik Michaelis-Menten konstantea (K_M) eta erreakzio entzimatiakoaren abiadura maximoa (V_{max}) kalkulatu ziren. Irudian, entsegu adierazgarri batetik ateratako kurba erakusten da. Hiru neurketen batezbestekoa \pm SEM kalkulatu zen puntu bakoitzeko. 2-AG emaria $\text{pmol}/\mu\text{g}$ proteina/minutu unitateetan espresatzen da. Erakutsitakoa bezalako hiru entsegu independente burutu ziren.

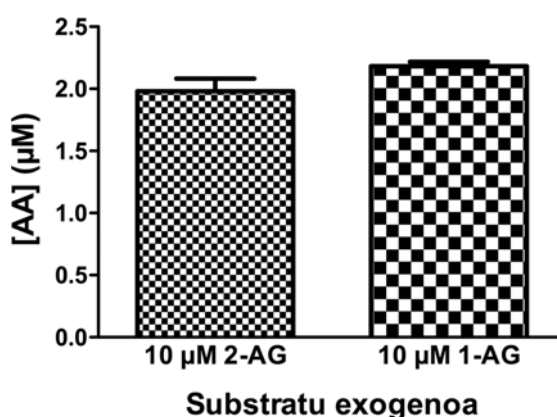


4.2 Serina-Hidrolasa Aktibitatearen Menpeko 2-AG Degradazioa Matrize

Nuklearrean

Matrize nuklearrean, ez dirudi DAGL bidezko hidrolisiaz ekoiztutako 2-AGa serina-hidrolasen eraso jasotzen duenik. DAG exogenotik ekoiztutakoko 2-AG maila neurtu genuenean, batetik, ez genuen AA ekoizpenik antzeman eta, bestetik, serina-hidrolasen inhibitzaile selektiboek ez zuten batere eraginik 2-AG metaketan (33. irudia). Dena den, ikusitakoa gure entsegu-baldintzetan sortutako 2-AGa monoazilglicerol lipasa (MAGL) aktibitatearen eskura ez egotearen ondorioa izan liteke. Baitere, lortutako 2-AG kontzentrazioak ($2 \mu\text{M}$ inguru) txikiak izan litezke MAGL aktibitatea pizteko. Beraz,

matrize nuklearrean serina-hidrolasa aktibitatea dagoen ala ez zalantzarik gabe zehazteko, NM laginari gehitutako 2-AG exogenoaren hidrolisia aztertu genuen. Horretarako, 2-AG (10 μM) eta bere 1-AG (10 μM) isomeroa substratu exogeno gisa erabili genituen, eta AA emaria LC/MS bidez neurtu genuen. Esperimentuak DAGL aktibitatea neurtzeko erabilitako baldintza esperimental berdinetan burutu ziren, inkubazio denbora salbu, oraingoan 30 minutura luzatu genuena. Entseguen emaitzek 2-AG eta 1-AG substratu exogenoetatik ekoiztutako AA emaria nabarmena zela erakutsi zuten, gehitutako substratuaren %20 ingurura heldu baitzen (35. irudia).



35. irudia. Arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleo osoen matrize nuklearrean metatutako AA. 10 μg proteina barne zuten NM laginak 30 minutuz inkubatu ziren eta 2-AG (10 μM) eta 1-AG (10 μM) substratu exogeno gisa erabili ziren. Gainerako baldintzak DAGL aktibitatearen neurketetan erabilitako berdina izan ziren. Ekoiztutako AA produktua LC/MS bidez neurtu zen. Barra bakoitzak hiru entsegu independenteetatik ateratako balioen batezbestekoa \pm SEM adierazten du.

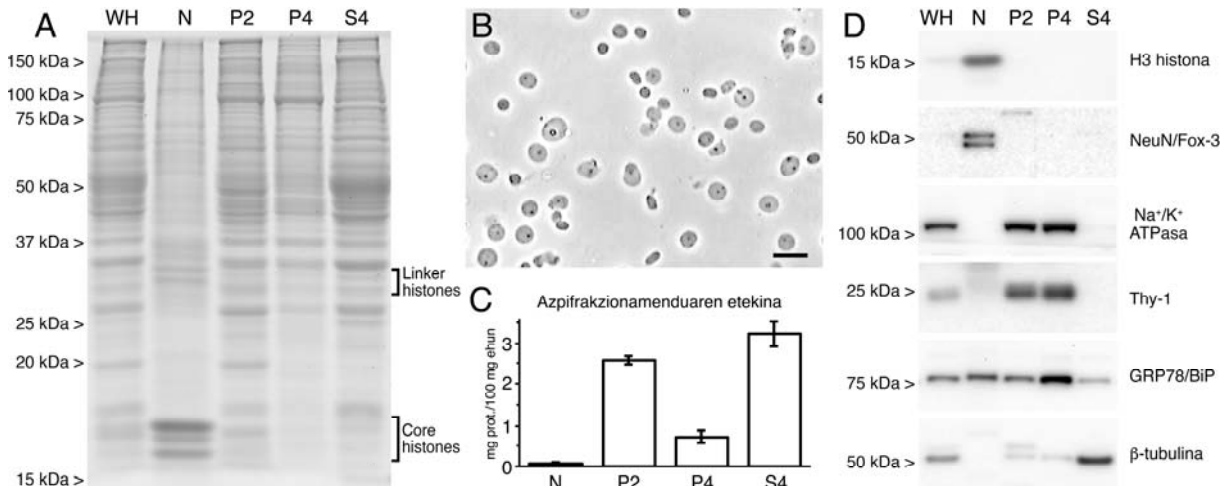
4.3 2-AG Degradazio-Entzimen Espresioa Garun-Kortexetik Isolatutako

Azpifrakzioetan

Gorago azaldu den bezala, matrize nuklearrean DAGL aktibitatearen menpeko 2-AG ekoizpenaren K_M balioa bat dator mintzean aztertutako DAGL α isozimaren ezaugarri zinetikoekin (Bisogno et al., 2003; Pedicord et al., 2011; Shonesy et al., 2013; van der Wel et al., 2015). Aldi berean, MAGL aktibitate nabarmena aurkitu genuen garun-kortexeko matrize nuklear laginetan. Matrize nuklear laginetan egindako entseguetan, aktibitate horrek DAGL menpeko 2-AG metaketan eraginik ez duela ikusi badugu ere, garrantzitsua izan liteke baldintza fisiologikoetan. Ideia hau abiapuntu hartuta, matrize nuklear laginetan AA ekoizpenaren erantzule izan litezkeen entzimen espresioa arratoiaren garun-kortexetik isolatutako nukleo osoetan aztertu genuen, eta espresio hori beste frakzio azpizelularretan dagoenarekin alderatu genuen. Horretarako, FAAH, monoazilglizerol lipasa (MAGL) eta α/β hidrolasa domeinudun proteina 12 (ABHD12) *immunoblot* bidez aztertu ziren arratoi

helduaren garun-kortexetik isolatutako frakzioetan: homogenatua (WH), nukleo osoak (N), mintz plasmatikoa (P2), mikrosomak (P4) eta zitosola (S4). Frakzio berdinetan, ziklooxigenasa-2 (COX2) entzimaren espresioa ere aztertu genuen, 2-AG endokannabinoida prostaglandina glizerol esterrak (PGG₂-G) emateko bihur dezakeen entzima izanik (Straiker et al., 2011), garrantzi handia izan baitezake baldintza fisiologikoetan. Garun-kortexeko homogenatuaren zatikatzearen egokitasuna aztertzeko asmoz, frakzio desberdinetako proteinak SDS-PAGE bidez erresolbitu genituen eta *Coomassie* urdin tindatzailearekin markatu genituen. Hala tindatutako poliakrilamida-gelean, frakzio guztien proteina karga berdintsua zela argi ikus zitezkeen. Aitzitik, desberdintasun nabarmenak ikus zitezkeen polipeptido-profiletan (36. irudia, A). Argi ikusi daitekenez, histonei dagozkien banden aberaste nabarmena zegoen N frakzioan. Fase-contraste mikroskopiaz, nukleoen egitura-osotasuna eta N laginaren purutasuna egiaztatu genuen (36. irudia, B). Frakzio bakoitzean, berreskuratutako proteina kantitatearen azterketak homogenatua, gehienbat, zitosolera ($3,22 \pm 0,30$ mg/100 mg ehun) eta mintz plasmatikora ($2,58 \pm 0,11$ mg/100 mg ehun) zatikatzen zela erakutsi zuen. Mikrosometara ($0,72 \pm 0,15$ mg/100 mg ehun) eta, bereziki, nukleo osoetara ($0,08 \pm 0,02$ mg/100 mg ehun) nabarmen proteina gutxiago zatikatu zen (36. irudia, C). Ondoren, frakzio markatzaile espezifikoak erabiliz, laginak *Western blot* bidez aztertu genituen eta prozeduraren egokitasuna zalantzarik gabe balioetsi genuen (36. irudia, D). Hala H3 histona eta NeuN/Fox-3 proteina nuklearrei zegozkien bandak N frakzioan besterik ez ziren agertu. Berriz, mintz zelularren markatzaileen (Na⁺/K⁺ ATPasa eta Thy-1) seinale biziak antzeman zitezkeen P2 eta P4 mintzetan. Erretikulu endoplasmikoaren argian kokatzen den GRP78/BiP txaperonaren aurkako antigorputzak seinale indartsua eman zuen P4 frakzioan eta, neurri txikiago batean, N frakzioan. GRP78/BiP-seinalearen zatiketa espero zitekeenarekin bat dator, gorago azaldu dugun bezala, P4 mikrosomak erretikulu endoplasmikoan aberastuta baitaude eta, nukleo-estaldura erretikulu endoplasmikoaren hedapena besterik ez baita. Halere, mintz plasmatikokoetan ere GRP78/BiP-seinale argia ikus zitezkeen, neurri batean, P2 frakzioa erretikulu endoplasmiko mintzetan kutsatuta dagoela iradokitzen duena. S4 frakzioan agertu

zen GRP78/BiP-seinale ahula, seguruenik, homogeneousazio mekanikoak eragindako erretikulu endoplasmiko mintzen apurketa eta proteina solugarrien (GRP78/BiP barne) askapenaren isla da. Azkenik, β -tubulina-immunoerreaktitate oso bizia zen S4 frakzio zitosoikoan, P3 eta P4 mintzetan oso ahula zen bitartean (36. irudia, D).

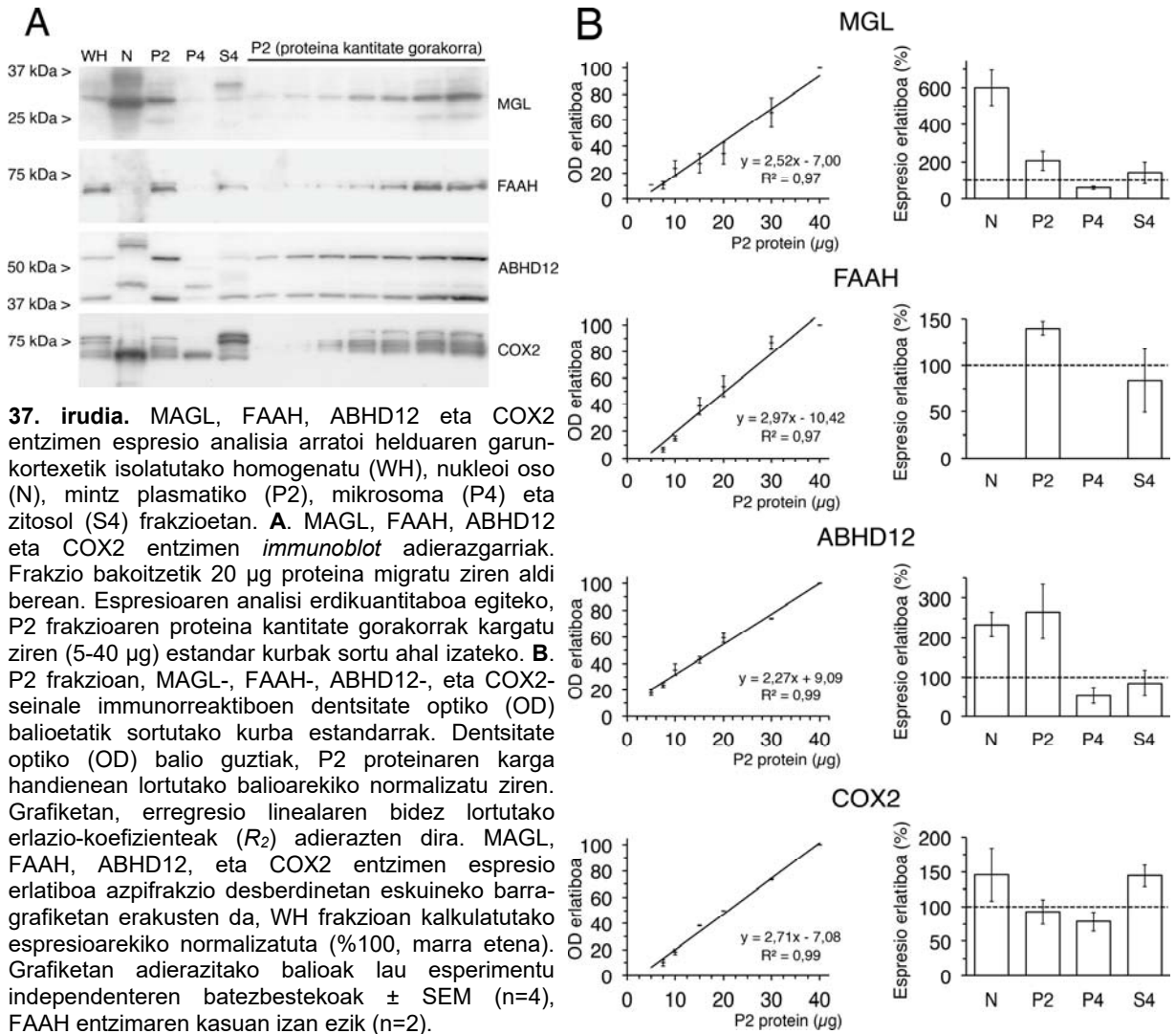


36. irudia. Arratoi helduaren garun-kortexetik lortutako azpifrakzioen karakterizazioa. **A.** Coomassie-urdina tindatzailearekin tindatutako SDS-PAGE. Homogenatu oso (WH), nukleo oso (N), mintz plasmatico (P2), mikrosoma (P4) eta zitosa (S4) azpifrakzioen proteina kantitate berdina kargatu zen kale guztietan. **B.** Nukleo osoen azterketa Fase-kontraste mikroskopia bidez. Eskala-barra: 20 μ m. **C.** Arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako N, P2, P3 eta S3 frakzioetara zatikatutako proteina kantitateak erakusten duen barra-grafikoa. Y-ardatzean 100 mg kortexetik berreskuratutako proteina kantitatea (mg) adierazten da. Balioek batezbestekoa \pm SEM adierazten dute (n=3). **D.** Frakzionamendua balioesteko, WH, N, P2, P4 eta S4 laginen *immunoblot* analisia. Frakzioen proteina kantitate berdina migratu ziren eta domeinu azpizelular desberdinetako proteinen kontrako antigorputzak erabili ziren markatzaile gisa: nukleoa, H3 Histona eta NeuN/Fox-3, mintz plasmaticoa, Na⁺/K⁺ ATPasa eta Thy-1; erretikulu endoplasmaticoa, GRP78/BiP; zitosa, β -tubulina.

MAGL, FAAH, ABHD12 eta COX-2 degradazio entzimen aurkako antigorputzek proteina horien masa molekular teorikoarekin (35,5; 63,6; 41,4-45,1 eta 69,2 kDa hurrenez hurren) bat zetozen bandak detektatu zituzten WH laginetan (37. irudia, A). ABHD12ren karboxi muturreko azken 13 aminoazidoen aurkako ahuntz-antigorputz poliklonalak bi banda immunorreaktibo indartsu detektatu zituen, beharbada ABHD12 entzimaren 1 eta 3 *splice* aldaerei dagozkienak. Beheko bandaren migrazioa ABHD12-3 aldaeraren masa molekularrekin (41,4 kDa) bat zetorren bitartean, goiko bandak 50 kDa-eko estandarren apur bat gaitetik migratu zuen, hau da, nabarmen gorago ABHD12-1 aldaerari dagokion masa molekular teorikoa (45,6 kDa) baino. Beste sekuentzia immunogeniko baten aurka sortutako bi unxi-antigorputz monoklonalak (abcam ab182011 eta ab182011; Cambridge, UK; BD Transduction Laboratories, San Diego) banda bikote berdintsua ematen dutenez, guk erabilitako antigorputzak detektatu zituen bi bandak espezifikotzat jo genituen (37. irudia,

A). COX2 entzimaren markaketa banda multzo bat eman zuen. Bandarik baxuenaren migrazioa bat zetorren COX2 entzimaren masa molekular teorikoarekin, eta pixka bat gorago zeudenak COX2 sekuentzian dauden glikosilazio leku anitzen presentzia adieraz zezaketen (37. irudia, A). Nabarmenki, MAGL-, ABHD12- eta COX2-seinale indartsuak detektatu ziren nukleo osoen N frakzioan. Berriz, WH laginetan aurkitutakoarekin alderatuta, ABHD12 eta COX2 banden migrazioa apur bat desberdina zen N frakzioan. Hala, N frakzioan, ABHD12 bandak WH laginetan eta P2 mintzetan baino 5 kDa inguru gorago migratu zuen, beharbada nukleoan gerta litezkeen proteinaren itzulpen osteko eraldaketaren ondorioz. Nukleo osoen laginetan, WH eta P2 laginetan ez bezala, COX2 entzimaren masa molekular teorikoarekin bat zetorren banda argi bakarria antzeman zitekeen (37. irudia, A).

MAGL, FAAH, ABHD12 eta COX2 entzimen zatiketa azpizelularraren analisi erdikuantitatiboa frakzio dentsitometriaz burutu zen (37. irudia, B) Horretarako, P2 laginen kantitate gorakorrez kargatutako kaleetan detektatutako banda immunorreaktiboaren dentsitate optikoa (OD) neurtu ondoren, kurba estandarrek sortu genituen erregresio lineal bidez. Aztertutako lau entzimen kasuan, kurba estandarren analisiak P2 proteina kantitatea eta lortutako OD balioen arteko erlazio lineala erakutsi zuen ($R^2 = 0,98 \pm 0,006$ SEM) eta, beraz, maldek entzimen espresioa azpifrakzioetan kalkulatzeko balio zuten (37. irudia, B). Azpifrakzioetako banda erreaktiboaren OD balioak kurba estandarretan intersektatu genituen eta, P2 laginarekiko espresio erlatiboa kalkulatu genuen WH, N, P2, P4 eta S4 laginetan. Azkenik, balio guztiak homogenatuetan (WH) kalkulaturako espresioarekiko normalizatu genituen (37. irudia, B). Analisi hau burutu ondoren, MAGL, ABHD12 eta COX2 nukleo osoetan espresatzen direla ondorioztatu genuen. Are gehiago, homogenatuak erreferentzia hartuta, nukleo osoak MAGL entziman oso aberastuta zeuden eta, neurri txikiago batean, ABHD12 eta COX entzimetan (37. irudia, B).

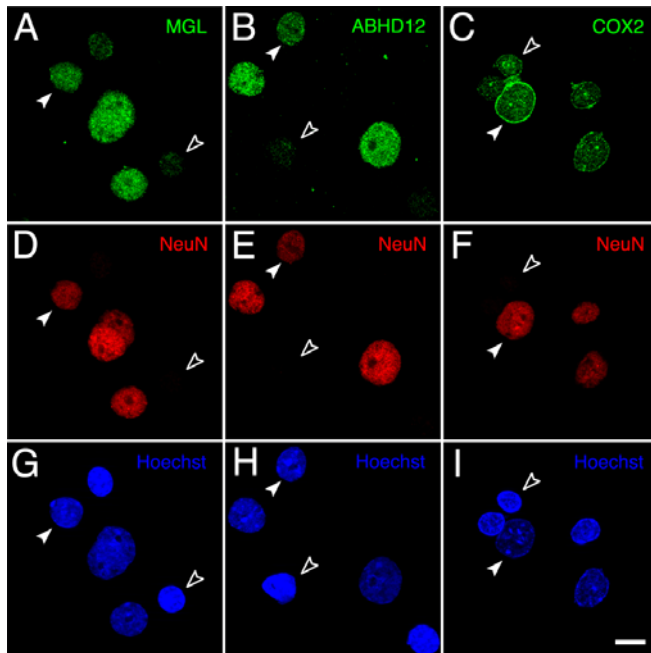


4.4 2-AG Degradazio-Entzimen Konpartimentazio Azpinuklearra

4.4.1 Immunofluoreszentzia Bikoitza eta Bereizmen Handiko Mikroskopia Analsiak

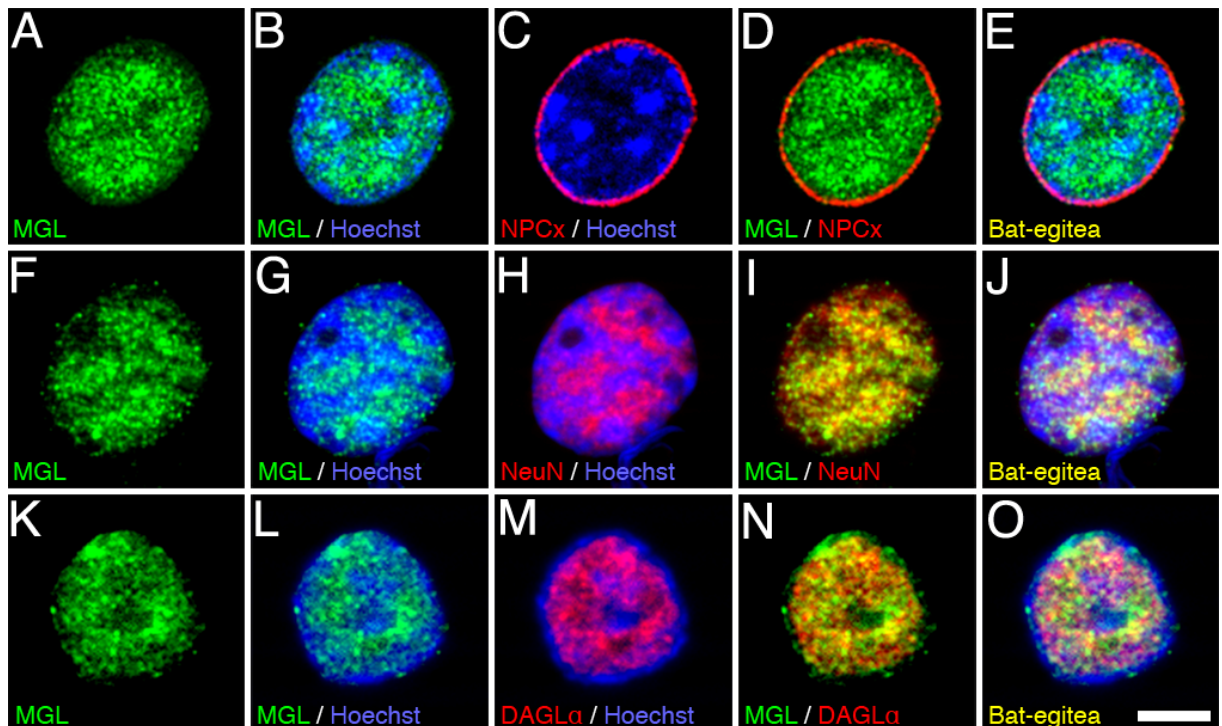
MAGL, ABHD12 eta COX2 arratoi helduaren garun-kortexeko nukleo osoetan espresatzen direla behin ikusita, immunofluoreszentzia eta bereizmen handiko mikroskopia bidez, entzima horiek neuronen edo/eta glia zelulen nukleoetan espresatzen diren aztertu genuen. Horretarako, immunofluoreszentzia bikoitza entseguetan, MAGL, ABHD12 edo COX2 entzimen aurkako antigorputzak NeuN/Fox-3 aurkako antigorputzekin konbinatu genituen. Hiru entzimen aurkako antigorputzek seinale bizia eman zuten NeuN/Fox-3 positibo ziren nukleo ertain eta handietan. Osera, NeuN/Fox-3 negatiboak ziren tamaina txikiagoko nukleoetan, MAGL- eta ABHD12-immunorreaktibitatea ezin bereiz zitekeen hondo-zaratatik. COX2-immunomarkaketa indartsua ikusi genuen tamaina handiko nukleo NeuN/Fox-3

positiboetan. Tamaina txikiagoko nukleo NeuN/Fox-3 positiboetan eta nukleo NeuN/Fox-3 negatiboetan COX2-seinalea ahulagoa bazen ere, argi antzeman zitekeen (38. irudia).

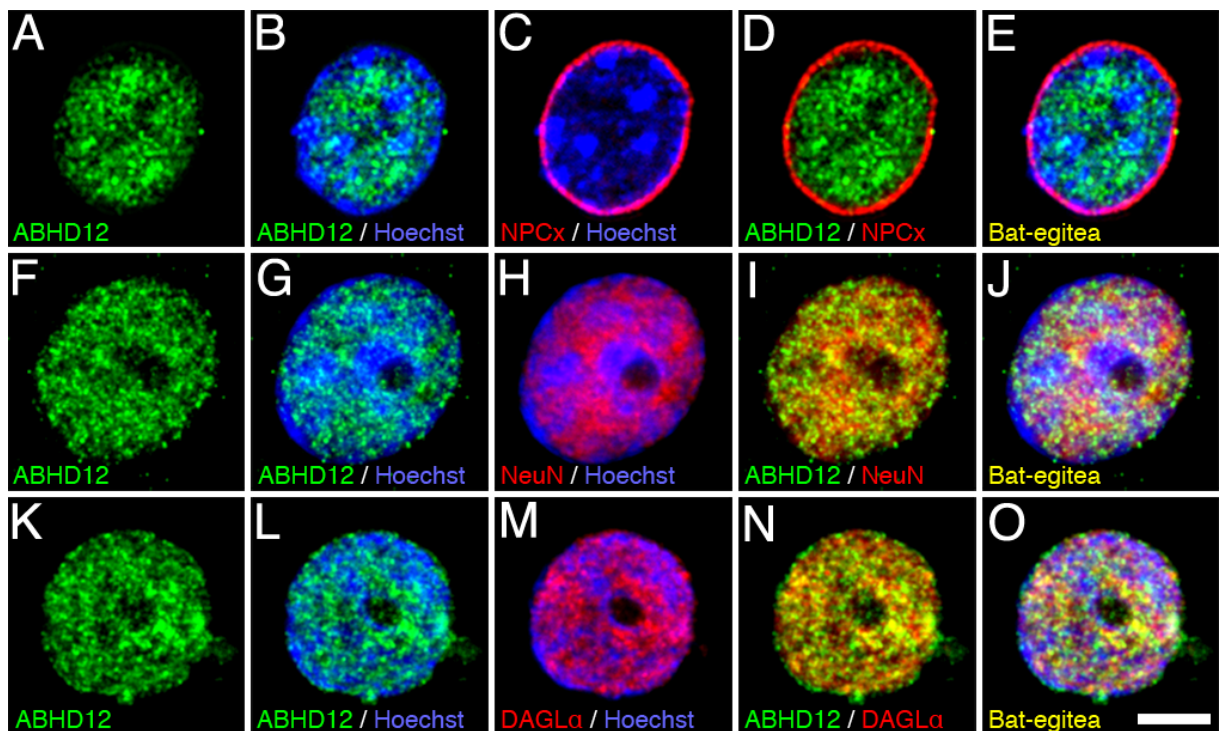


38. irudia. Arratoi helduaren garun-kortextetik isolatutako nukleo osoen mikroargazkiak. MAGL, ABHD12 eta COX2 entzimen (A-C) eta NeuN/Fox-3 *splicing* faktorearen (D-F) immunomarkaketa kromatina-tindaketarekin (G-I) konbinatuta. Nukleo NeuN/Fox-3 positibo guztiek MAGL, ABHD12 eta COX2 espresatzen zuten (gezi-punta beteak). Nukleo NeuN/Fox-3 negatiboetan (gezi-punta hutsak), soilik COX2-seinalea aurkitu zen. Eskala-barra: 20 μ m.

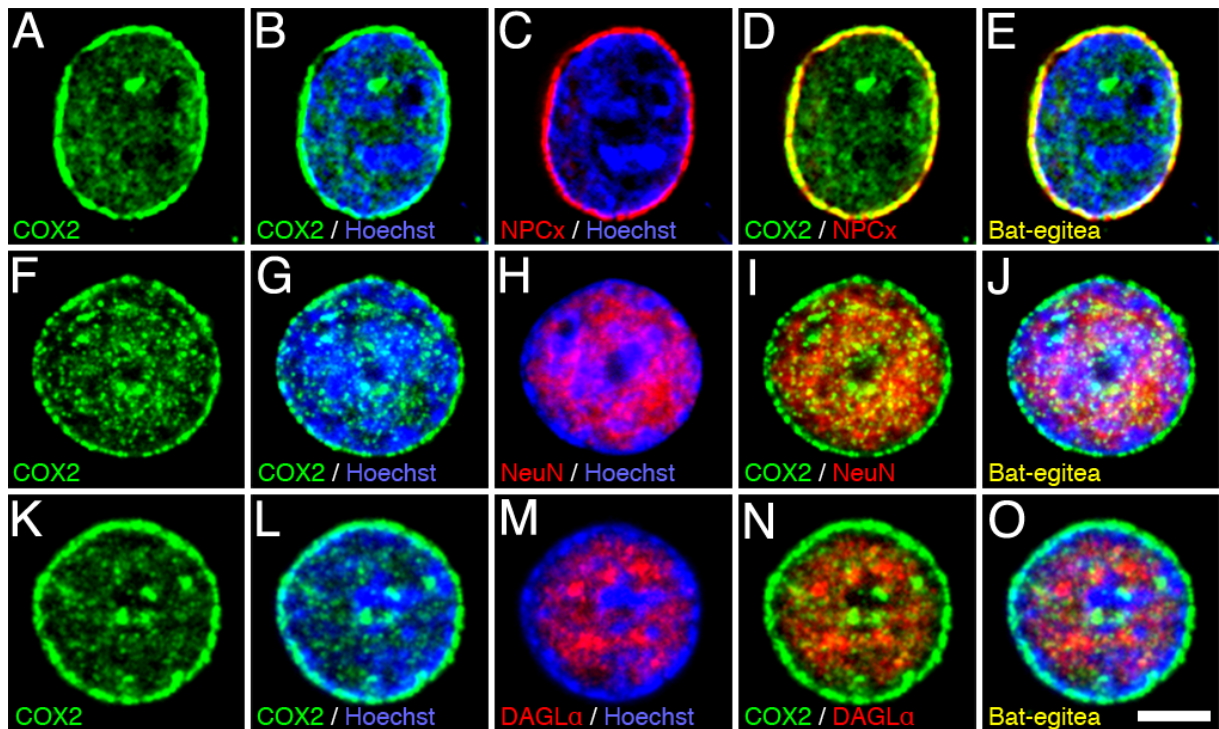
Jarraian, MAGL, ABHD12 eta COX2 entzimen banaketa azpinuklearra eta DAGL α -rekiko kokapena aztertu genuen. Horretarako, MAGL-, ABHD12- eta COX2-immunomarkaketaren banaketa eta NPCx, NeuN/Fox-3 eta DAGL α aurkako antigorputzek sortutako seinalearen arteko erlazioa bereizmen handiko fluoreszentsia-mikroskopiak aztertu genuen (39.-41. irudiak). MAGL eta ABHD12 entzimen markaketaren banaketa-profilak nahiko antzekoak ziren. Bien seinaleak nukleo-estalduraren azpitik eta nukleoplasman barreiatutako orban distiratsu gisa agertzen ziren, betiere kromatina tindaketa ahuleko eremuetan. MAGL- eta ABHD12-seinaleak nabarmen baina ez osorik gainezartzen ziren DAGL α -seinalearekin (39.-40. irudiak). COX2-immunomarkaketa, gehien bat, nukleo osoaren inguruko eraztun modura antolatzen zen, tamaina handiko nukleo neuronaletan bereziki indartsu markatuta eta NPCx-seinalearekin gainezarrita agertzen zena. Horrez gainera, markaketa ahulagoa eta lausoagoa ikus zitekeen nukleoplasman barrena (41. irudia).



39. irudia. MAGL (berdez) eta NPCx, NeuN/Fox-3 edo DAGLa aurkako (gorriz) immunofluoreszentzia bikoitza arratoiaren garun-kortexeko nukleoetan. Immunomarkaketa Hoechst kromatina tindaketarekin (urdinez) konbinatu zen. Mikroargazki guztiak argiztapen egituratuz (ApoTome) hornitutako fluoreszentzia-mikroskopia batekin (Carl Zeiss Axio Observer) egin ziren eta 0,24 μm -ko hiru ebaketa optikoren proiektzioak dira. Eskala-barra: 5 μm .



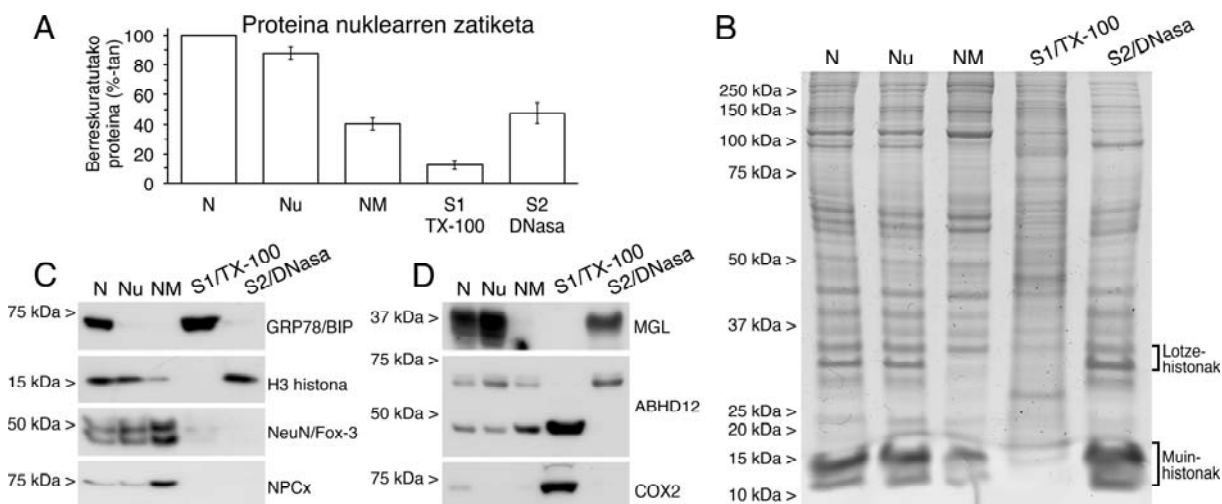
40. irudia. ABHD12 (berdez) eta NPCx, NeuN/Fox-3 edo DAGLa aurkako (gorriz) immunofluoreszentzia bikoitza arratoiaren garun-kortexeko nukleoetan. Immunomarkaketa Hoechst kromatina tindaketarekin (urdinez) konbinatu zen. Mikroargazki guztiak argiztapen egituratuz (ApoTome) hornitutako fluoreszentzia-mikroskopia batekin (Carl Zeiss Axio Observer) egin ziren eta 0,24 μm -ko hiru ebaketa optikoren proiektzioak dira. Eskala-barra: 5 μm .



41. irudia. COX2 (berdez) eta NPCx, NeuN/Fox-3 edo DAGLa aurkako (gorriz) immunofluoreszentzia bikoitza arratoiaren garun-kortexeko nukleoetan. Immunomarkaketa Hoechst kromatina tindaketarekin (urdinez) konbinatu zen. Mikroargazki guztiak argiztapen egituratuz (ApoTome) hornitutako fluoresentzia-mikroskopio batekin (Carl Zeiss Axio Observer) egin ziren eta 0,24 μm -ko hiru ebaketa optikoren proiektzioak dira. Eskala-barra: 5 μm .

4.4.2 Immunoblot Analsiak

MAGL, ABHD12 eta COX2 entzimen konpartimentazio azpinuklearra sakonago aztertzeko asmoz, *Western blot* bidezko analisia burutu genuen. Horretarako, Nu/RNasa frakzioa izan ezik, 3.1.1 atalean deskribatutako frakzio azpinuklearrak isolatu genituen arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleo osoetatik. Hala, honako azpifrakzio hauek lortu genituen: nukleo osoak (N), nukleideak (Nu); matrize nuklearra (NM), TX-100ean erauzgarri proteinak (S1/TX-100) eta DNArri lotutako proteinak (S2/DNasa). Proteina nuklear osotik, azpifrakzio bakoitzean berreskuratutako proteina portzentajea honela zatitu zen: Nu (%87,8 \pm 3,9 SD); NM (%40,3 \pm 3,9 SD); ; S1/TX-100 (%12,2 \pm 3,1 SD); S2/DNasa (%47,5 \pm 7,1 SD). SDS-PAGE bidez erresolbitutako proteinen *Coomassie* urdin tindaketan ikus daitekeen moduan, lotze-histonei (H1) eta muin-histonei (H2A, H2B eta H3) dagozkien banden intentsitatea nabarmen galdu zen NM frakzioan eta S2/DNasa frakzioan berreskuratu ziren, S1/TX-100 frakzioan ezin ikuz zitezkeen bitartean. Erauzketa sekuentzialaren bidez isolatutako frakzio azpinuklearrak *Western blot* bidez aztertu genituenean, espero zitezkeen konpartimentu nuklearren markatzaileetan aberastuta zeudela ikusi genuen (42. irudia, C; ikus 3.1.1 atala).



42. irudia. MAGL, ABHD12 eta COX-2 entzimen konpartimentazio azpinuklearren azterketa. **A.** Proteina nuklearren zatiketa erakusten duen barra-grafikoa. N, nukleo osoak; Nu, nukleioideak, NM, matrice nuklearra, S1/TX-100, TX-100ean erauzgarri proteinak; S2/DNasa, DNari lotutako proteinak. Emaizak frakzio bakoitzean proteina nuklear osotik berreskuratutako portzentajeak dira. Balioak batzbestekoa \pm SD adierazten dute ($n=2$). **B.** SDS-PAGE bidez erresolbitutako frakzioetako proteinen *Coomassie* urdin tindaketa (20 μ g proteina/kale). **C.** *Western blot* analisia frakzio azpinuklearren purutasuna aztertzeko (12 μ g proteina/kale). Honako frakzio-markatzaile hauek erabili ziren: nukleo-estaldura, GRP78/BiP; DNari lotutako proteinak, H3 histona; matrice neuronal, NeuN/Fox-3; nukleioideen egitura-osotasuna, NPCx. **D.** MAGL, ABHD12 eta COX2 entzimen aurkako antigorputzak erabiliz, frakzio azpinuklearretan burututako *Western blot* analisia (12 μ g proteina/kale).

Frakzionamenduaren egokitasuna behin frogatuta, MAGL, ABHD12 eta COX2 entzimen konpartimentazio azpinuklearra aztertu genuen (42. irudia, D). MAGL eta COX2, ia osorik, S2/DNasa eta S1/TX-100 proteinen gainjalkinetara zatitu ziren hurrenez hurren. Emaizta hauek, immunofluoreszentzia bidez lortutakoekin batera, MAGL eta COX2 DNari lotutako eta nukleo-estaldurako proteinak direla adierazten du. ABHD12 entzimari zegokien bi seinaleen zatitzea desberdina izan zen. Gorago migratu zuen bandak TX-100 detergente erauzketari eutsi egin zion. Ordez, nukleioideek DNasa 1/0.25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gatz tratamendua jasan ondoren, seinalea S2/DNasa gainjalkinera zatikatu zen hein handi batean, matrice nuklearrean (NM) oraindik argi ikus bazitekeen ere. Beraz, goiko ABHD12 seinaleari dagokion proteina, gehien bat, DNari asoziatuta dago eta, hein txikiago batean, matrice nuklearrari. Ordez, 45kDa inguruko masa aparentea zuen ABHD12 banda, TX-100ekiko sentikorra zen, hari zegokion seinale indartsua S1/TX-100 gainjalkinean berreskuratutako baikenuen. Halere, proteinaren zati garrantzitsu bat TX-100ekiko erresistentea zen, immunorreaktibitatearen jaitziera eskasa antzeman baitzen nukleioideetan, DNari lotutako proteinak solubilizatu ondoren nabarmen areagotu zen bitartean (42. irudia, D). Nabarmenki, *immunoblot* analisirako Nu eta S1/TX-100 frakzioen proteina kantitate berdinak kargatu

zirenez, baina Nu jalkinean ~ 9.6 aldiz proteina gehiago berreskuratu zen S1/TX-100 gainjalkinean baino, gure emaitzek beheko ABHD12 banda immunorreaktiboa TX-100ekiko hein handi batean erresistentea dela adierazten dute. Beraz, beheko ABHD12 banda NM eta S1/TX-100 frakzioen artean zatikatzen dela ondoriozta daiteke.

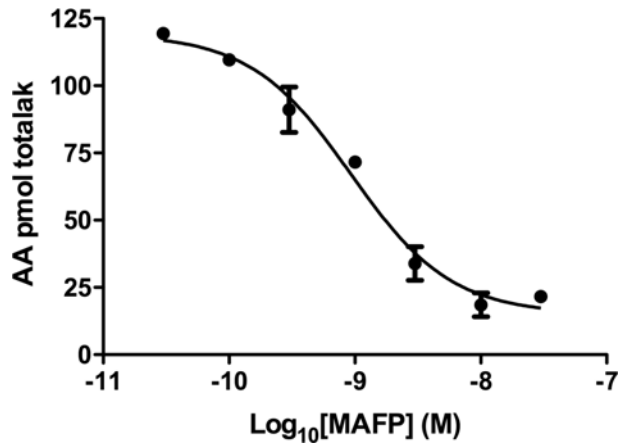
Hurbilketa esperimental desberdinak erabiliz, 2-AG degradazio entzimen konpartimentazio azpinuklearraren azterketaren emaitzek NM laginetan ikusitako 2-AG hidrolisiaren erantzulea ABHD12 entzima izan litekeela iradokitzen dute.

4.5 Serina-Hidrolasa Aktibitate Entzimatiakoaren Azterketa Matrize Nuklearrean

Gorago deskribatu den bezala, 2-AG degradaziora eramaten duen aktibitate hidrolitiko garrantzitsua aurkitu genuen arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleo osoen matrize nuklearrean (ikus 4.2 atala). Ustezko ABHD12-menpeko aktibitate entzimatiiko hori karakterizatzeko asmoz, entzima horren inhibitzaile selektiborik ezean, metil-arakidonil fluorofosfonato (MAFP) konposatua erabili genuen. MAFPk ABHD12 aktibitatea potentzia handiz inhibitzen du baina, horrez gain, ABHD6 eta FAAH entzimen aktibitatea ere indargabetzen du (Deutsch et al., 1997; Saario et al., 2004; Navia-Paldanius et al., 2012). MAFP oso eraginkorra izan zen AA emaria indargabetzeko. Hala, $10 \mu\text{M}$ 2-AG exogenotik 30 minututan metatutako AA nabarmen jaitzi zen MAFP konposatuaren kontzentrazio gorakorrek gehitu ahala (AA kontzentrazio balioak egoera basalean eta 30 nM MAFP gehituta $2,39 \mu\text{M} \pm 0,01$ eta $0,43 \mu\text{M} \pm 0,04$ izan ziren hurrenez hurren). Inhibizioak kontzentrazio-menpekotasun argia erakutsi zuen eta kalkulaturako potentzia ($\text{IC}_{50} = 1\text{nM}$) MAFP eta ABHD12 entzimaren arteko interakzioaren ezaugarriekin bat dator (43. irudia).

Laburbilduz, atalburu honetan deskribatutako ebidentzia esperimentalek, matrize nuklearrean, 2-AG hidrolisiaren erantzule nagusia ABHD12 dela adierazten dute: [i] konpartimentazio azpinuklearraren azterketaren emaitzetan ABHD12 baino ez zen aurkitu matrize nuklearrean, [ii] MAFP inhibitzaileak AA emaria potentzia handiz indargabetzen du

eta [iii] AA ekoizpena ez da sentikorra MAGL eta ABHD6 entzimen inhibitzaile selektiboekiko.



43. irudia. AA metaketaren inhibizio-kurba arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleo osoen matrize nuklearrean. 10 µg proteina barne zuten NM laginak 30 minutuz inkubatu ziren eta 2-AG (10 µM) substratu exogeno gisa erabili zen. Gainerako baldintzak DAGL aktibitatearen neurketetan erabilitako berdinak izan ziren. Inhibitzaile gisa MAFP kontzentrazio gorakorak (0,03-30 nM) erabili ziren. Ekoiztutako AA produktua LC/MS bidez neurtu zen. Puntu bakoitzak bi erreplikatik ateratako balioen batezbestekoa ± SD adierazten du.

VI. EZTABAIDA

Ikerketa lan honetan, 2-AG endokannabinoidaren ekoizpen-makineriaren banaketa azpizelularra aztertu dugu arratoi helduaren garun kortexean, makineria hori neurona helduen nukleoan ere espresatzen dela agerian jarri dugula. Hala, bereizmen handiko fluoreszentsia mikroskopia, frakzionamendu azpizelular eta *Western blot* teknikak erabiliz, DAGL α entzima nukleo neuronalen matrizean kokatzen dela frogatu dugu. Are gehiago, LC/MS bidez, zalantzarik gabe frogatu dugu 2-AG ekoizpen endogenoa dagoela arratoiaren garun kortexetik isolatutako nukleo osoetan, ekoizpen hori PLC β 1 isozimak eta DAGL α -k osatzen duten seinaleztapen-ardatz baten menpekoa dela. Aurkikuntza hori oinarri hartuta, nukleo osoetatik erauzitako matrize gertakinetan, entsegu entzimatiakoak burutu ditugu DAGL aktibitatearen konstanteak kalkulatzeko: Michaelis-Menten konstantea (K_M) eta erreazio entzimatiokoaren abiadura maximoa (V_{max}). Halaber, 2-AG degradazioaren aktibitate nagusien presentzia aztertu dugu eta 2-AG degradazio-entzima nagusien lokalizazioa eta konpartimentazioa deskribatu dugu; hots, monoazilglizerol lipasa (MAGL), gantz-azidoen amida hidrolasa (FAAH), α/β hidrolasa domeinudun proteina 12 (ABHD12) eta ziklooxygenasa-2 (COX2). Horien artean, ABHD12 baino ez genuen aurkitu nukleoan matrizean, eta soilik ABHD familiako isozimen inhibitzaileek (baina ez MAGL inhibitzaileek) saihesten zuten 2-AG hidrolisia. Hala ere, ABHD aktibitate hidrolitikoak ez zuen eraginik DAGLk bultzatutako 2-AG emarian. Oro har, gure emaitzek DAGL α neuronalaren banaketa azpizelularri buruzko ezagutza zabaltzen dute, eta ebidentzia biokimiko eta morfologikoak eskaintzen dituzte zalantzarik gabe ziurtatzeko 2-AG nukleo neuronalaren matrizean ekoizten dela. Hala, lan honek bidea ematen du nukleo neuronaletan ekoiztutako 2-AGaren zereginaren inguruko lan-hipotesiak proposatzeko.

1. DAGL α ARRATOI HELDUAREN GARUN-KORTEXEKO NUKLEOETAN ESPRESATZEN DA

DAGL α -ren banaketaren azterketari ekin aurretik, antigorputzen espezifikotasuna finkatzeko entseguak burutu genituen. Frogatutako lau antigorputz komertzialetatik, bik besterik ez zuten eman ondo deskribatutako kokapen postsinaptikoarekin (Katona et al., 2006;

Uchigashima et al., 2007) bat zetorren neuropilo markaketa. Garun-kortexeko mintz gordinetan egindako *Western blot* entseguetan, bietako bakarrak (DAGL α -Rb-Af380-1; Frontier Science Co. Ltd, Hokkaido, Japan) eman zuen DAGL α -ren masa molekular teorikoarekin bat zetorren banda argi bat. Are gehiago, garun-kortexeko frakzio azpizelularretan egindako *Western blot* entseguetan, DAGL α seinalea bere kokapen postsinaptikoarekin bat datorren frakzioan agertu zen gehien bat, dentsitate postsinaptiko markatzaileekin (PSD95 eta Shank3) eta 2-AG ekoizpen konplexuko beste osagai batzuekin (Homer eta PLC β 1) batera. Azkenik, giza DAGL α kodetzen duen plasmido batekin transfektatutako HEK293 zeluletan egindako immunofluoreszentzia eta *Western blot* entseguek DAGL α -Rb-Af380-1 untxi-antigorputz poliklonalaren espezifikotasuna berretsi zuten.

Kokapen postsinaptikoarekin bat zetorren neuropilo-markaketaz gainera, aldez aurreko ikerketetan ez-bezala (Yoshida et al., 2006; Uchigashima et al., 2007; Shimizu et al., 2013; Costa et al., 2014), immunofluoreszentzia-seinale argia aurkitu genuen garun-kortexeko eta hipokanpoko neuronan nukleoetan ere. Aurkitutako markaketa nuklearraren oinarrian, erabilitako sodio sulfuro fixapenak eragindako antigeno-askatzea dagoela dirudi. Izan ere, baldintza horiek antigeno desberdinen kontrako antigorputzen erreaktibitatea hobetzen dutela ikusi da, immunomarkaketaren banaketa profila mantentzen den bitartean (Mitchell et al., 1993). Era berean, fixapen baldintza berdinek PLC β 1 detektatzea ahalbidetu digu garun-kortexeko nukleo neuronalean, hainbat antigenoren (GFAP, NeuN, PSD95, neurona GABAergikoen markatzaileak eta lamina B1) markaketan artefakturik eragin gabe (Montana et al., 2012). Azkenik, kortexean, hipokanpoan eta zerebeloan, gure fixapen baldintzek ematen duten DAGL α -markaketa profila aztertu eta baldintza arruntek ematen dutenarekin alderatu genuen. Aipatutako hiru egituretan, markaketaren banaketa bat dator baldintza arruntetan lortutakoarekin, salbu eta markaketaren intentsitatea nabarmen handiagoa dela eta markaketa nuklearra argi antzeman zitekeela. Emaitza hauek, garun-ebaketetan, sodio sulfuro fixapenak antigeno-askatze efektua duela iradokitzen dute.

DAGL α -ren kokapen nuklearra berresteko, *Western blot* entseguak burutu genituen garun-kortextetik erauzitako nukleoen gertakin gordinetan (P1 frakzioa) eta DAGL α -ri dagokion banda espezifikoa aurkitu genuen. Hala ere, erabilitako gertakina nukleoz kanpoko osagaietan nabarmen kutsatuta zegoela ikusi genuen. Izan ere, mintz plasmaticoaren markatzaile gisa, Na⁺/K⁺ ATPasa-ren α 1 azpiunitatearen aurkako antigorputz bat erabili genuenean, seinale indartsua agertu zen P1 frakzioan ere. Seguruenik, P1 frakzio nuklearra isolatzeko erabili genuen prozeduraz, nukleoez gainera, mintzik astunenak ere hauspeatu ziren. Mintz horien artean, erretikulu endoplasmiko eta Golgi-aparatuko mintzak daude, mintz plasmaticorako jariaketa bidean dauden Na⁺/K⁺ ATPasa gisako mintz-zeharreko proteina ugari dituztenak. Hori dela eta, purutasun handiko lagin nuklearra lortzea (N frakzioa) ahalbidetzen duen prozedura ezagun bat (Thompson, 1973; Dent et al., 2010; Montana et al., 2012; García del Caño et al., 2015) erabili genuen. Garun-homogenatuaren ultrazentrifugazio urrats bakar batean nukleoak isolatzea ahalbidetzen duen prozedura horrek nukleoen osotasun estrukturala mantentzen du. Hori dela eta, horrela isolatutako nukleoei, "nukleo oso" izena eman ohi zaie. Gure laborategian isolatutako laginaren azterketa mikroskopikoak nukleoen osotasuna egiaztatu zuen eta, halaber, nukleo osoen gertakina debris zelularrarik gabekoa zela ikusi genuen. *Western blot* entseguek nukleo osoen laginen purutasuna zalantzarik gabe berretsi zituzten, ez baikenuen seinale arrastorik ere aurkitu zelularen azpidomeinu desberdinen aurkako markatzaileak erabili genituenen: β -tubulina (zitosola), Na⁺/K⁺ ATPasa-ren α 1 azpiunitatea (mintz plasmaticoa), NMDA hartzailearen NR1 azpiunitatea (mintz postsinaptikoak), sinaptosomei lotutako 25 kDa-eko proteina SNAP25 (besikula presinaptikoak) eta 58 kDa-eko *cis*-Golgi proteina (Golgi-aparatuko mintzak). Horrela karakterizatutako nukleo osoen laginetan burututako *Western blot* entseguek DAGL α proteinaren banda argi bat jarri zuten agerian. Nukleo oso (N) eta mintz gordin (P2) frakzioetan aurkitutako banda nagusia DAGL α proteinaren masa molekular teorikoarekin (115 kDa) bat zetorren, nukleo osoetan aurkitutako seinalea nabarmen ahulagoa bazen ere. DAGL α proteina osoaren monomeroari omen zegokion seinale horrez gainera, bestelako banda bat aurkitu zen 250 kDa-eko estandarraren azpian, hau da, espero

zitekeen masa teorikoaren pisu bikoitz ingurukoa. NT2 eredu zelularrean egindako gainespresio entseguek banda hori espezifikoa dela iradokitzen dute. Izan ere, migrazio profil berdineko seinalea aurkitu dugu DAGL α -HA fusio proteina gainespresatzen duten zelulen mintz laginetan, transfektatu gabeko zeluletan agertzen ez diren bitartean. Banda gehigarriaren masa molekular aparentea DAGL α -ren pisu bikotza ingurukoa izanik, homodimero bati legokiokeela espekula daiteke; jakina, DAGL α eta beste proteina baten (edo batzuen) arteko konplexua eratu izana baztertu gabe. Aipatutako seinaleez gainera, bi banda gehigarri aurkitu genituen 75 kDa-eko estandarraren azpitik. Nolanahi ere, orohar, gure emaitzek argi adierazten dute DAGL α entzima arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleoetan espresatzen dela.

2. DAGL α GARUN-KORTEXEKO NUKLEO NEURONALEN MATRIZEAN KOKATZEN DA

DAGL α garun-kortexetik isolatutako nukleo osoetan espresatzen dela zalantzarik gabe egiaztatu ondoren, DAGL α -k azpidomeinu nuklearretan duen banaketa zehazteko, azpifrakzionamendu sekuentziala eta *Western blot* analisia, eta immunofluoreszentzia bikoitza entseguak burutu genituen nukleo osoetan. Nukleo osoen azpikonpartimentuak zatikatzeko, alde zuzenetik argitaratutako prozeduraren (Fey et al., 1986; Payrastre et al., 1992) aldaera bat erabili genuen. TX-100 bidezko nukleo osoen tratamenduaz, detergente ez-ionikoekiko erauzgarri diren proteinak (nukleo-estaldurako eta nukleoplasmako proteina-pool bat) isolatu genituen lehenengo gainjalkinean (S1/TX-100 frakzioa), eta nukleoideak (Nu frakzioa) jalkinean. Jarraian, nukleoideak DNasa I-ekin (eta, ondoren, 0,25 M amonio sulfatorekin) edo RNasa A-rekin inkubatuz, kromatinari eta RNArri lotutako proteinak erauzi genituen, hurrenez hurren. Hala bi jalkin desberdin lortu genituen: matrize nuklearra (NM, DNArri lotutako proteinik gabea) eta RNasa A nukleoideak (Nu/RNasa, RNArri lotutako proteinik gabea); eta DNArri lotutako proteinen gainjalkina (S2/DNasa) ere gorde genuen. Horrela isolatutako nukleo osoen azpifrakzioetako proteinak SDS-PAGE bitartez banatu genituen. Coomassie-tindaketa patroian ikus zitekeenez, histonei zegozkien bandak

nabarmen galtzen ziren NM frakzioan beste jalkinekin (N, Nu eta Nu-RNasa) alderatuta. Ordez, seinalea askoz ahulagoa eta nabarmen intentsoagoa zen S1/TX-100 eta S2/DNasa frakzioetan, hurrenez hurren. Bestalde, GRP78/BiP erretikulu endoplasmikoko txaperonaren immunoblot-markaketak erakutsi zuenez, TX-100-ek eraginkortasun handiz solubilizatu zituen nukleo osoetatik detergente ez-ionikoekiko erauzgarri diren proteinak. Coomassie-uridin tindaketak bezala, *Western blot* entseguek Histona H3 seinalea S1/TX-100 eta S2/DNasa frakzioetan bereziki aberastuta zegoela erakutsi zuten. Ordez, matrize nuklearraren markatzailea den NeuN/Fox-3 proteina NM frakzioan nabarmen aberastuta zegoen, *splicing* faktore gisa (Kee et al., 2009) nukleo barneko sare erribonukleoproteikoarekin duen loturarekin bat datorrena (Dent et al., 2010). Azkenik, frakzionamendu sekuentzialean ikusitako poro nuklear konplexuari (NPCx) dagokion seinalearen aberaste gorakorra (N<Nu<Nu-RNasa<NM) bat zetorren sekuentzialki erauzitako proteina kantitate gorakorrarekin. Poro nuklear konplexua detergente ez-ionikoekiko zein nukleasa bidezko digestioarekiko erresistentea izanik (Davis eta Blobel, 1986), aurkikuntza honek (kontraste-fase mikroskopioaz egiaztatzearekin batera) nukleo osotasun estrukturala frakzionamendu prozeduran babestuta mandendu zela adierazten du. Orohar, markatzaileak erabiliz, nukleo osoen azpifrakzioetan egindako azterketak frakzionamendu sekuentzialaren egokitasuna egiaztatu zuen. Nukleo osoen azpifrakzioak DAGL α -ren aurkako antigorputzekin aztertu genituenean, DAGL α seinale nuklearra, hein handi batean, TX-100-ekiko erresistentea dela ikusi genuen. Hala, detergente ez-ioniko bidezko tratamenduak DAGL α -ren masa molekular teorikoari (115 kDa) zegokion seinalea eta 250 kDa inguruko banda espezifikoa (ikus eztabaida gorago) ez zituen nukleoidetatik ezabatu, banda horiek TX-100-ekiko frakzio solugarrian (S1/TX-100) partzialki berreskuratu baziren ere. Immunoblot entseguetan, aztertutako azpifrakzioen proteina kantitatea berdina izanik, askoz ere proteina gehiago berreskuratu zenez Nu frakzioan S1/TX-100 frakzioan baino ($7,6 \pm 2,8$ aldiz gehiago), detergente ez-ionikoarekiko erauzgarri den DAGL α nuklear osoaren proportzioa oso txikia dela ondoriozta daiteke. Nabarmenki, aipatutako bi DAGL α seinaleen intentsitaterik handiena NM frakzioan aurkitu genuen. Zentzu berean, RNasa A

tratamenduak DAGL α gehiena erazi zuen, entzima hori matrize nuklearreko RNArri lotuta dagoela iradokitzen duena. Lehenago ikusitakoarekin bat, bi seinale aurkitu genituen 75 kDa-eko estandarren azpitik. Seinale horien konpartimentazioa eta esangura beherago eztabaidatuko da.

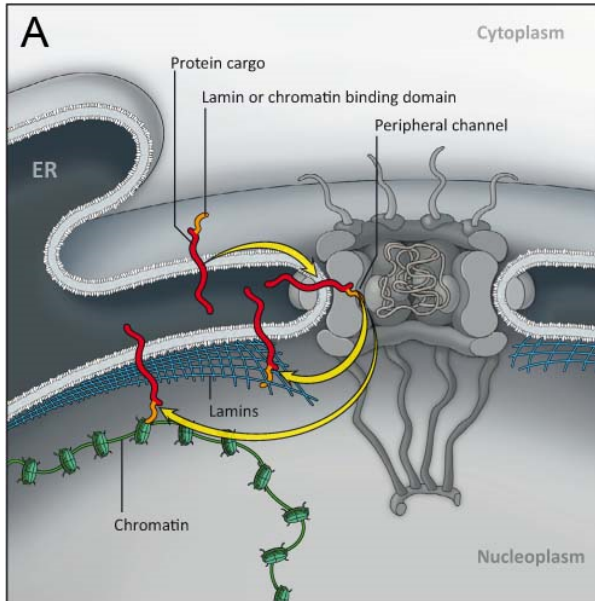
Western blot bitartez lortutako emaitzak egiaztatzeko eta DAGL α -k nukleoan duen konpartimentazioa sakonago aztertzeko asmoz, immunofluoreszentzia bikoitza entseguak burutu genituen arratoi helduaren garun-kortexetik erauzitako nukleo osoetan. DAGL α eta NeuN/Fox-3 markaketa bikoitza Hoechst kromatina-tindaketarekin konjokatu genuenean, DAGL α seinalea nukleo neuronaletan (NeuN/Fox-3 positiboak) baino ez antzeman zitekeela ikusi genuen, entzima horren espresioa neuronan nukleoetara mugatuta dagoela erakusten duena. Bereizmen handiagoarekin aztertuta, DAGL α -immunomarkaketaren kokapena bat zetorren nukleo-azpifrakzioetan burututako *Western blot* entseguen emaitzekin, seinalea gehien bat xafla nuklearraren azpiko nukleoplasman eta kromatina-tindaketa ahuleko eremuetan ikusi baikeuen. Are eta gehiago, DAGL α -seinalea, hein handi batean, NeuN/Fox-3 matrize nuklearraren markatzailearekin gainezartzen zen eta, orobat, SC-35 (*serine/arginine-rich splicing factor 35*, serina eta argininan aberatsa de *splicing* 35. faktorea) *spliceosoma*-ko *nuclear speckles* ("nukleo-orbanak") deritzen markatzailearekin.

Mintz-zeharreko lau domeinu dituen proteina izanik, DAGL α nukleo-estalduran kokatuko litzatekeela aurreikusi bagenuen ere, *Western blot* eta bereizmen handiko immunofluoreszentzia analisisiek argi erakusten dute DAGL α , hein handi batean, matrize nuklearrean kokatzen dela eta, seguruenik, nukleoaren barneko sare erribonukleoproteikoaren osagaia dela. Hala, nukleo osoetan burututako bereizmen handiko mikroskopia analisisiek DAGL α -ri zegokion immunofluoreszentzia-seinalea nukleoplasmako domeinu diskretuetara mugatuta zegoela erakutsi zuten. Era berean, DAGL α -ri zegokion immunoblot-seinale espezifikoa detergente ez-ioniko eta DNasa I/gatz kontzentrazio altua tratamenduekiko erauzgarria zen, matrize nuklearrean kokatzen den proteina baten banaketa-profilarekin bat datorrena (Berezney eta Coffey, 1974; Kaufmann et al., 1981;

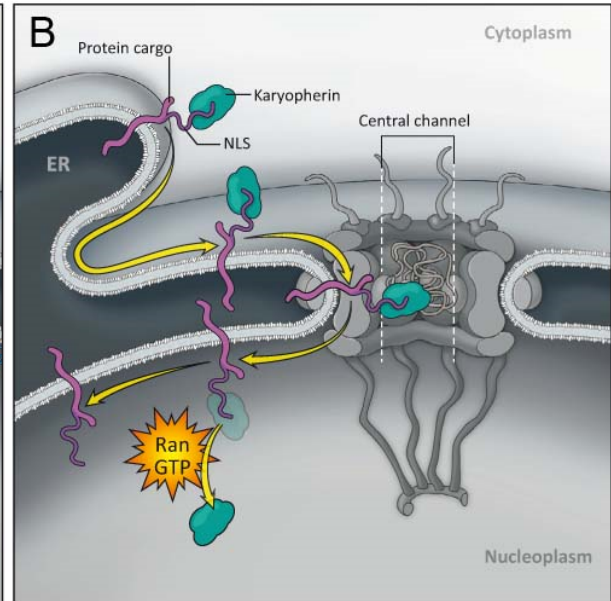
Barrack eta Coffey, 1982)). Nolanahi ere, DAGL α gisako proteina bat matrize nuklearrean kokatzeko, lehenik eta behin, barne-mintz nuklearrera igaro eta metatu beharko litzateke. Mintz-zeharreko proteinak barne-mintz nuklearrera garraiatzeko mekanismo posibleen artean, eredurik onartuenek (44. irudia, A-C) bi urratsetako prozesu bat proposatzen dute: [i] proteinaren difusioa erretikulu endoplasmikotik kanpo-mintz nuklearrera eta, jarraian, [ii] kanpo-mintz nuklearretik barne-mintz nuklearrerako garraioa, non NPCx-ko proteinek atezain gisa jokatuko luketen bi mintzen arteko kontaktu-eremuan. Erretikulu endoplasmikoaren argira ematen duen domeinu estraluminal txikia duten proteinen kasuan (<~40 kDa), garraioa difusio sinplez gerta daiteke poro nuklearrean zehar. Ordez, domeinu estraluminala handiagoa duten proteinek garraio aktiboa behar dute (ikus berrazterketa; (Katta et al., 2014). Hau kontuan hartuta, DAGL α aktiboki garraiatuko litzateke nukleoaren barne-mintzera, bere domeinu estraluminala 97,2 kDa-ekoa baita. Garraio nuklear aktiboa jasaten duten proteinek nukleora barneratzeko seinale (NLS) deritzon kontsentsu-sekuentzia izaten dute. Hala da proteina zitosolikoetan eta baita mintz-zeharreko proteinetan, non NLS-a domeinu estraluminallean egon behar den funtzionala izateko. Zitosolean, NLS-ak mintz-zeharreko proteina eta inportinaren baten arteko interakzioa ahalbidetuko luke, eta inportinak mintz-zeharreko proteina poro nuklear konplexuan zehar eramango luke. Ondoren, inportina zama-proteinatik askatuko litzateke nukleo barruan Ran-GTPasa aktibitateari esker edo Ran-aparteko mekanismoen bidez (44. irudia, B-C). Halako mekanismoak deskribatu dira EGFR (hazkuntza-faktore epidermiko hartzailea) familiako tirocina-kinasa aktibitatedun hartzaileen garraio nuklearrean; prozesu horrek endozitosisia, endosoma-sailkatzea eta COPI (*coat complex protein I*) besikula bitarteko atzera-garraioa ere behar dituela (Giri et al., 2005; Du et al., 2014). Du eta kolaboratzaileek (2014) ikusitakoaren arabera, ligando bidezko aktibazioak mintz plasmatikoko EGFR-en endozitosisia eta Golgi-aparaturako translokazioa bultzatzen du, endozitosisi-besikulen eta Golgi-mintzen arteko fusioa sintaxina-6 menpekoa dela. Translokazioa mikrotubulu bidezko mugimenduen bidez gertatzen da, eta EGFR eta dineinaren (mikrotubuluaren proteina motorretako bat) arteko interakzioa beharrezkoa da. Mintz plasmatikotik Golgi-aparaturako translokazioa ezinbesteko aurrebaldintza da EGFR

erretikulu endoplasmikora eta nukleora atzera-garraiatzeko. DAGL α -ren domeinu estraluminalean (538 eta 554 aminoazidoen bitartean) balizko NLS kontsentsu-sekuentzia bipartitua dagoela kontuan hartuta, ulergarri litzateke DAGL α -k antzeko mekanismoak erabiltzea barne-mintz nuklearrera translokatzeko. EFGR familiako tirosina-kinasa aktibitatearen hartzaileetarako deskribatu den bezala (Somanathan et al., 2003; Giri et al., 2005; Wang eta Hung, 2012), barne-mintz nuklearrean txertatzea ezinbesteko urratsa izango litzateke, baina ez nahikoa, DAGL α matrize nuklearrera translokatzeko. Mintz-zeharreko proteinak barne-mintz nuklearretik nukleoplasmarako iragan-mekanismoak gutxi azertu badira ere, erretikulu endoplasmikoko Sec61 translokoiaren β subunitatea inplikatzeko duen bide bat proposatu da EGFR barne-mintz nuklearretik matrizerara translokalizatzeko. Izan ere, Sec61 translokoiaren β subunitatea barne-mintz nuklearrean kokatzen da eta, bere espresioa siRNA bidez isiltzen denean, EGFR-ren populazio nukleoplasmatikoa jaisten da, barne-mintz nuklearrekoak gora egiten duten bitartean (Wang et al., 2010). Wang eta Hung autoreek (2010) endozitosi-gisako mekanismo bat inplikatzeko duen hipotesi interesgarria, baina nahiko espekulatiboa, proposatu dute. Hala, barne-mintz nuklearretik eratorritako besikulak matrize nuklearrera igaroko lirateke eta mintz-zeharreko proteinak besikula horien mintz bilipidikoetan txertaturik mantenduko lirateke. DAGL α -k duen lokalizazio azpinuklearraren mekanismoak zehazteko, garraio-bideen diseinua bideratutako azterketa molekularrak eta farmakologikoak beharko dira. Ondo egiaztatuko espezifikotasuna zuten DAGL α -seinaleez gainera, 75 kDa-eko estandarren azpitik banda argi bat hauteman genuen, DAGL α -ren sekuentzia osoari zegokion seinalearekin alderatuta, DNasa eta RNasa tratamenduekiko aurkako portaera erakutsi zuena. Banda hori espezifikoa balitz, bere masa molekular aparentea 68 kDa ingurukoa izanik eta erabiltako antigorputzak DAGL α -ren karboxilo muturra ezagutzen duela kontuan hartuta, seinalea oraindik aktibitate katalitikoa duen DAGL α -ren zati bati legokioke, baina mintz-zeharreko domeinurik gabea. Izan ere, aktibitate katalitikorako aminoazidoak (472. eta 524. aminoazidoak) eta balizko NLS kontsentsu-sekuentzia (538 eta 554 aminoazidoen bitartean) barne edukiko lituzkeen

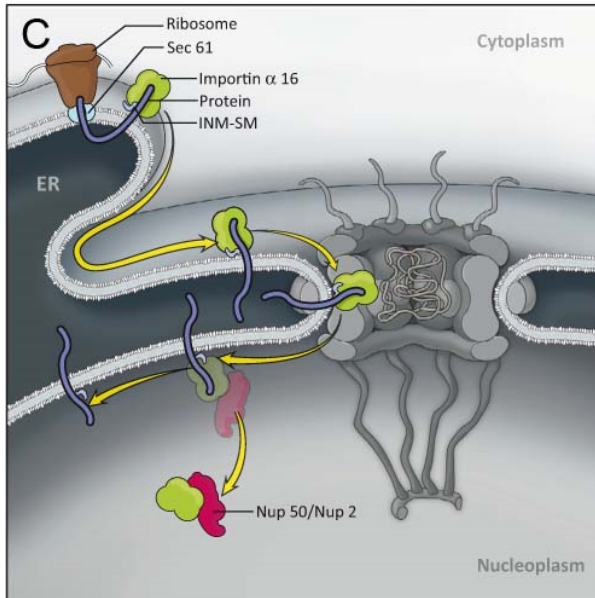
Diffusion retention



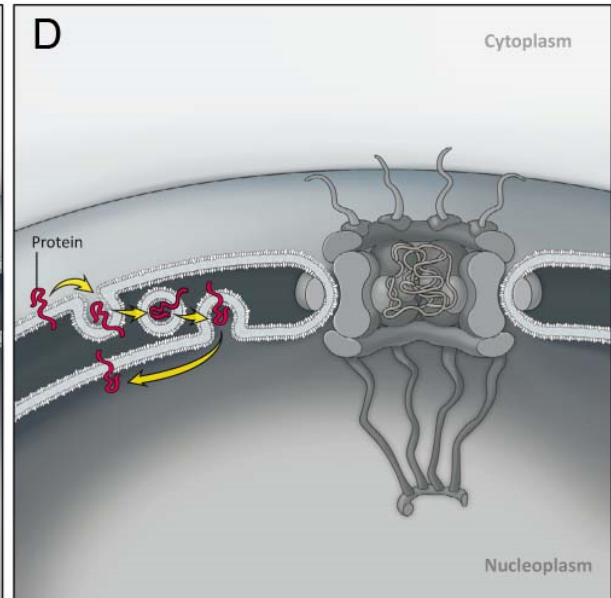
Transport factor mediated



Sorting motif mediated



Vesicle mediated



44. irudia. Proteinak barne-mintz nuklearrean txertatzeko proposatu diren bide nagusiak. Mintz-zeharreko proteina integralak erretikulu endoplasmikoan sintetizatzen dira eta, bitartean ala sintetizatu ondoren, erretikulu endoplasmikoaren mintzean txertatzen dira. **A.** Difusio-atzikitze ereduak, mintz-zeharreko proteinek nuklear konplexuko erreten periferikoak zeharkatzen dituzte, difusio sinplez igaro daitezkeela kanpo-mintz nuklearretik barne-mintz nuklearrera. Kromatinarekin edo/eta laminarekin ezarritako interakzioei ezker, mintz-zeharreko proteina barne-mintz nuklearrean mutaturako litzateke. Eredu honetan, proteinaren garraioa poro nuklear konplexuko erreten periferikoek mugatzen dutenez, proteinaren domeinu estraluminala txikia izan behar da (<~40 kDa). **B.** Garraio-faktore ereduak NLS kontsentsu-sekuentzia duten mintz-zeharreko proteinei esleitzen zaie. Zitosolean, NLS-ak mintz-zeharreko proteina eta karioferina baten arteko interakzioa eragingo luke. Jarraian, karioferinak mintz-zeharreko proteina poro nuklear konplexuko erreten zentraletik eramango luke. Ondoren, karioferina zama-proteinetatik askatuko litzateke nukleo barruan Ran-GTPasa aktibitateari esker. **C.** Seinale-sekuentzia ereduak, domeinu kargadun txiki bat egongo litzateke mintz-zeharreko proteinetan. Mintz-zeharreko proteina sintetizatzen ari den bitartean, inportin- α -16 mintz-proteina (karioferin- α -ren aldaera trunkatua) domeinu kargadunari lotzen zaio eta mintz-zeharreko proteina poro nuklear konplexuko erreten periferikora eramaten du. Barne-mintz nuklearrera igaro ondoren, Nup50/Nup2 konplexuak edo bestelako Ran-aparteko mekanismoek inportin- α -16 askatzen dute. Nolanahi ere, difusio-atzikitze eredu bezala, NLS batek ahalbidetzen du barne-mintz nuklearrerako garraioa. **D.** Besikula bidezko ereduak poro nuklear apartekoa da. Kasu honetan, mintz-zeharreko proteina barne duen besikula kanpo-mintz nuklearretik erretikulu endoplasmikoaren argira askatuko ondoren, barne-mintz nuklearrekin fusionatuko litzateke. **ER**, erretikulu endoplasmikoa; **INM**, barne-mintz nuklearra; **ONM**, kanpo-mintz nuklearra; **NPC**, poro nuklear konplexua. **Irukiaren iturria:** Katta et al., 2014.

fragmenturik txikiena 61.5 kDa-ekoa da. Beraz, oso espekulatibo gerta badaiteke ere, DAGL α -ren karboxilo muturra zatitze proteolitikoz aska liteke, hala proteina solugarrien mekanismoak erabil zitzakeela nukleora translokatzeko. Horrelako mekanismo bat deskribatu da EGFR familiako ErbB-4 tirosina-kinasa hartzailearen kasuan (Ni et al., 2001), alabaina, ez dirudi ErbB4-ren proteolisiaren arduratzen den presilina proteasak DAGL α -ren zatitzean parte har lezakeenik, presilinarekin substratuak I motako mintz-zeharreko proteinak baitira. Dena den, DAGL α -ren zatitze proteolitikoa inplikatzeko duten mekanismoak erakargarriak izan badaitezke ere, ikerlan gehiago beharko lirateke ikusitako zatia espezifikoa den jakiteko. Edonola ere, gure emaitzek DAGL α matrize nuklearraren osagaia dela aditzera ematen dute. Horrez gainera, balizko DAG-aren emaile nuklearrak (PLC β 1, PLC β 2 eta PLC β 4) nukleo osoetan espresatzen dira eta, nukleo neuronalen (NeuN-positiboak) nukleoplasman, DAGL α -ren domeinu diskretu berdintsuetara mugatuta daude. Are gehiago, PIP₂- eta PLC β 1-immunomarkaketa nabarmen gainezartzen da nukleo osoen nukleoplasman (Montana et al., 2012). PLC β isozimak, beren substratu nagusia eta DAGL α konpartimentu berdintsuetan kokatzeak PLC β -DAGL seinaleztapen ardatza nukleo neuronalen barnean jardun dezakeela pentsatzeko bidea ematen du, fosfoinositidoen zikloan parte hartzen duten aktibitate entzimatikoen eta seinaleztapen bideen kohorteari (Irvine, 2003) osagai berri bat gehituko litzaiokeela.

3. ARRATOI HELDUAREN GARUN-KORTEKETIK ISOLATUTAKO NUKLEO OSOETAN, PLC β /DAGL α ARDATZAREN MENPEKO 2-AG EMARI ENDOGENOA DAGO

Gure entsegu funtzionalek zalantzarik gabe erakutsi dutenez, fosfatidil inositol PLC (PtdIns-PLC edo PLC β) isozimen aktibazioak DAGL aktibitatearen menpeko 2-AG metaketa bultzatzen du nukleo osoetan. Jarraian eztabaidatuko den bezala, PLC β aktibitateak PIP₂ endogenoaren hidrolisiaz DAG bitartekaria ematen du eta, ondoren, PLC β -rekin konpartimentatutako DAGL aktibitateak (seguruenik DAGL α -ren menpekoa) 2-AG emari endogenoa bideratzen du (45. irudia). PLC β familiako isozimak aktibatzeeko era praktikoa bat bilatu nahian, m-3M3FBS edo kaltzio ioiak erabili genituen aktibatzaile gisa (Bae et al.,

2003). Biak α , β , γ eta δ familietako PLC entzimen menpeko hidrolisia sustatzeko gai badira ere, gure eta beste ikerlarien datuek neuronon nukleoan frogatutako 2-AG biosintesiaren erantzule nagusiak PLC β isozimak direla iradokitzen dute. Lehenik eta behin, ugaztunen garun-kortexean, PLC β isozimen espresioa nabarmen handiagoa da PLC γ eta PLC δ familiakoena baino (Ross et al., 1989; Tanaka eta Kondo, 1994; Kim et al., 1997; Watanabe et al., 1998; López de Jesús et al., 2006; Montana et al., 2012). Gainera, hemen ikusitako kaltzio kontzentrazioaren menpeko erantzuna bat dator PLC β isozimek *in vivo* bideratutako PIP₂ exogenoaren hidrolisiak erakusten duen kaltzioaren menpekotasunarekin (Smrcka et al., 1991; Biddlecome et al., 1996). Baitere, PLC β isozimen inhibitzaile selektiboak eraginkortasun handiz itzuli egiten du m-3M3FBS konposatuak zein kaltzioak sustatutako 2-AG metaketa (Powis et al., 1992). Azkenik, nukleo osoetan egindako immunofluoreszentzia bikoitza entseguetan lortutako emaitzetatik, PLC β familiako isozimen parte-hartzearen aldeko beste argudio indartsu bat dator. Izan ere, PLC β 1, 2 eta 4 isoformen seinaleak, DAGL α -ren seinalea bezala, matrize nuklearreko markatzaileek sortutakoarekin gainezartzen ziren hein handi batean.

Nukleoetan gerta litekeen MAGL aktibitateak 2-AGren metaketan izan lezakeen eragina saihesteko, entsegu guztiak MAGL entzimaren inhibitzailea den (Burston et al., 2008) N-arakidonil maleimida (*N-Arachidonyl Maleimide*, NAM) konposatuaren presentzian burutu ziren. Bestalde, zelula neuraletan espresatzen den (Antony et al., 2000; Antony et al., 2001) PtdCho-PLC entzimak bideratutako DAG-en ekoizpena saihesteko, PtdCho-PLCren inhibitzailea den D609 konposatua (Amtmann, 1996; Antony et al., 2001) erabili genuen. Nabarmenki, PtdIns espezieek (PLC β ren substratuak) azido arakidonikoa ohi dute glizerol eskeletoaren sn-2 posizioan, PtdCho espezieetan (PtdCho-PLCren substratuak) posizio horretan urri xamarra den bitartean (Exton, 1994; Hodgkin et al., 1998). DAGL aktibitatea glizerol enborrharen sn-1 posizioan dagoen azil ester lotura hidrolizatzeko selektiboa denez (posizio horretan dagoen gantz-azidoa edozein dela), batez ere PLC β isozimek emandako DAGak (baina ez PtdCho-PLC aktibitateak emandakoak) izan daitezke 2-AGren aitzindariak. Hala, PtdCho-PLC inhibitzaileen erabilerak azido arakidonikoa sn-2 posizioan duten DAG

proportzioa (eta, beraz, 2-AGren aitzindarien proportzioa) handitzea zuen helburu. Azkenik, DAG kinasek ere negatiboki eragin lezakete, 2-AG konbertsioa katalizatzen baitute azido fosfatidikoa (*Phosphatidic acid*, PA) emateko. Izan ere, untxiaren garun-kortexetik isolatutako nukleoetan, nabarmena da PA ekoizpena (Baker eta Chang, 2001) eta, hortaz, R59949 konposatua erabili genuen (45. irudia). Jiang et kolaboratzaileek (2000) *in vivo* entseguetan egiaztatu dutenaren arabera, R59949 inhibitzailea oso eraginkorra da I motako kaltzioaren menpeko α , β eta γ diazilglizerol kinasa (DAGK) isozimen aktibitate entzimatikoa blokeatzeko. Beraz, R59949 konposatuarekiko sentikor ez diren (Bunting et al., 1996; Jiang et al., 2000) bestelako DAGK isozima nuklearren (Hozumi et al., 2003) aktibitateak 2-AG metaketan eragin lezake. Edozein kasutan, gure emaitzek argi utzi zuten I motako kaltzioaren menpeko α , β eta γ DAGK inhibitzaileak jarri ezean, 2-AGren metaketa basala esanguratsuki eta m-3M3FBS aktibatzaileak sustatutakoa drastikoki jaisten zela.

Gure helburuetarako DAG “desiragaitzen” iturri posibleetako bat, azido lisofosfatidiko fosfatasa (*Lisophosphatidic acid phosphatase*, LPP) aktibitatea da, LPP-k DAG espeziak ekoitz bailitzake PtdCho-PLDk emandako PA erabilta. PtdCho-PLD-ren espresioa nukleo neuronaletan egiaztatu denez (Kanfer et al., 1996; Antony et al., 2000), hari akoplatutako LPP aktibitate nuklearren batek DAG ekoizpena bidera lezake, 2-AG maila basaletan eragingo lukeena (Gaveglio et al., 2011) (45. irudia). Aitzitik, aktibitate horrek negatiboki eragingo luke estimulatutako 2-AG metaketan, LPP-k ekoiztutako DAG espezieen artean, soilik proportzio txiki bat izan bailiteke 2-AG sintesirako aitzindari, azido arakidonikoa urria baita PtdCho espezieen sn-2 posizioan (ikus eztabaida gorago, Exton, 1994; Hodgkin et al., 1998). Nolanahi ere, 10 μ M edelfosinak erabat indargabetzen zuen m-3M3FBS eta kaltzio bidezko 2-AG metaketa, 2-AG maila basalaren %20-25 inhibitzen zuen bitartean. Beraz, estimulatutako 2-AG metaketan, PtdCho-PLD nuklearrari akoplatutako balizko LPP aktibitatea arbuia garria da. Ordez, seinaleztapen hori 2-AG maila basalen erantzule partzial izan liteke, gure hurbilketa esperimentalak ezin zehatz badezake ere. DAGL aktibitatearen menpeko 2-AG sintesia ez ezik, 2-AG emarirako bestelako bide batzuk proposatu dira. Hala

nola, fosfolipasa A1 eta lisofosfolipasa-PLC aktibitate sekuentzialen bidezko 2-arakidonil barne duten fosfolipidoen ekoizpena edo hainbat fosfatasek eragindako azido 2-arakidonil lisofosfatidikoaren konbertsioa (Piomelli, 2003; Sugiura et al., 2006; Bisogno, 2008). Alabaina, tetrahidrolipstatinak (THL; DAGL-ren inhibitzailea) ia erabat indargabetzen zuen 2-AG endokannabinoidaren metaketa basala zein estimulatutakoa. Horrek aipatu diren 2-AG emarirako bide alternatiboen kontribuzioa oso urria dela agerian jartzen du. Hemen aurkezten ditugun emaitzek agerian uzten dute 2-AG ekoizpena gidatzen duen PLC β /DAGL seinaleztapen-ardatza arratoi helduaren garun-kortexeko nukleo neuronalen matrizean egon badagoela (45. irudia). Are gehiago, horrekin bat datoz erabilitako hurbilketa metodologiko guztiek emandako emaitzak: [i] garun-kortexeko gertakin histologikoetan eta nukleo osoetan egindako immunofluoreszentzia bikoitza eta bereizmen handiko fluoreszentzia-mikroskopia analisiak, [ii] garun-kortexeko laginen frakzioetan zein nukleoan azpifrakzioetan burututako *Western blot* analisiak eta [iii] 2-AG ekoizpen nuklear endogenoaren entzima erantzuleak zeintzuk diren zehazteko gauzatutako entsegu funtzionalak. Are gehiago, matrize nuklearreko gertakinetan, DAGL aktibitatearen Michaelis-Menten konstantea (K_M) eta erreakzio entzimatiakoaren abiadura maximoa (V_{max}) kalkulatu ditugu. Lortutako K_M balioa bat dator DAGL α gainespresetzen duten zelulen mintzetan ikusitakoarekin (Shonesy et al., 2013). Honek, *Western blot* eta immunofluoreszentzia bidez lortutako aurkikuntzekin batera, 2-AG emari nuklearren erantzulea DAGL α isozima dela adierazten du. Espero litekeen bezala, matrize nuklearrean aurkitutako V_{max} balioa, gutxi gorabehera, aipatutako DAGL α gainespresio-sistema zelularrean (Shonesy et al., 2013) ikusitakoaren laurdena da.

2-AG bidezko seinaleztapenaren magnitudea ekoizpen eta degradazioaren arteko orekaren menpekoa omen da, eta oreka hori kontrolatzen duen biderik aztertuena serina-hidrolasen bidezko 2-AGren apurketa da (Karlsson et al., 1997; Dinh et al., 2002a; Dinh et al., 2004; Li et al., 2007; Blankman et al., 2007; Hashimoto et al., 2007; Marrs et al., 2010) eta sortutako produktuak AA eta glizerola dira (Freund et al., 2003). Ikerketa gehienek garuneko 2-AGaren degradazio-entzima nagusia MAGL dela erakusten badute ere (Dinh et

al., 2002b; Dinh et al., 2004; Blankman et al., 2007), gure baldintza esperimentaletan, ez dirudi garun-kortexetik isolatutako nukleo osoetan ekoiztutako 2-AGa eskuragarri dagoenik MAGL bidezko degradaziorako. Izan ere, MAGL inhibitzaileen omisioak eragin eskasa zuen PLC β ren aktibazioaz bultzatutako 2-AG ekoizpen endogenoan. Zentzu berean, 1-estearoil-2-arakidonil-sn-glicerol DAG espezie exogenotik sortutako 2-AG metaketa (DAGL aktibitatea) neurtu genuenean, ez genuen AA eraketaren arrastorik aurkitu matrize nuklearreko laginetan. Baita ere, MAGL inhibitzaileek (N-etilmalimida -NAM- 10 μ M eta JZL184 10 μ M) ez zuten 2-AG metaketa faboratu, eta emaitza berdinak lortu genituen α/β hidrolasa domeinudun proteina 6 (ABHD6; (Blankman et al., 2007) inhibitzen duen WWL70 (10 μ M) konposatuarekin. Ordez, matrize nuklearreko gertakinak 2-AG exogenoarekin elikatu genituenean, AA ekoizpen nabarmena ikusi genuen (emandako substratuaren %20 inguru hidrolizatu zen). Hau horrela, gure baldintza esperimentaletan, DAGL eta MAGL aktibitateak ez daudela kateatuta iradokitzen zuen. Beharbada, gure entsegu-baldintzetan sortutako 2-AGa ez zen eskuragarria MAGLen bidezko hidrolisirako edo lortutako 2-AG kontzentrazioak (2 μ M inguru) txikiak dira MAGL aktibitatea pizteko. Esaterako, α/β hidrolasa domeinudun proteina 12 (ABHD12) serina-hidrolasaren K_M 100 μ M baino handiagoa da (Navia-Paldanius et al., 2012).

Matrize nuklearrean, MAGL aktibitatea egon badagoela ikusita, aktibitate horren entzima erantzuleak zeintzuk izan litezkeen galdetu genion gure buruari. Garunean, MAGLz gainera, 2-AG degradatzeko gai diren beste hiru hidrolasa espresatzen dira (Dinh et al., 2002b; Dinh et al., 2004; Blankman et al., 2007), eta hirurak sinapsian kokatzen dira (Murataeva et al., 2014): gantz-azidoen amida hidrolasa (FAAH), ABHD6 eta ABHD12. Serina-hidrolasa horiek garuneko 2-AGaren degradazioan duten kontribuzioaren azterketarik zehatzena Blankmann et kolaboratzaileek (2007) burutu zuten. Autore horiek ikusitakoaren arabera, sagu garuneko mintzetan, MAGL, ABHD12 eta ABHD6 entzimek 2-AGren hidrolisian duten kontribuzioa %85, %9, eta %4-koa da, hurrenez hurren. Aztertu zuten gainerako entzima guztien artean, hurrengo hidrolasarik aktiboena FAAH dela aurkitu zuten, bere kontribuzioa soilik %1

ingurukoa bada ere. Nabarmenki, *in vivo*, bere substratu nagusia anandamida (AEA) bada ere, *in vitro* entsegetan, FAAH eraginkorra da 2-AGren hidrolasa gisa (Goparaju et al., 1998). Aipatutako lau serina-hidrolasen kokapen heterogeneoak eta espresio mailak 2-AGren hidrolisian eta seinaleztapen kannabinoide sinaptikoan duten funtzio desberdina azal dezakete neurri batean (ikus berrazterketa; (Murataeva et al., 2014). Hala, MAGL presinapsiaren (Gulyas et al., 2004) mintz plasmaticoari ahul lotuta zein frakzio solugarrian kokatzen da (Blankman et al., 2007), CB1 hartzailen parean dagoen 2-AG degradatzeko aproposa omen dena. MAGLren aktibitateak CB1 hartzailen menpeko epe laburreko plastizitatean garrantzi handia duela dirudi; hau da, depolarizazioak eragindako inhibizioaren ezabaketa (DSI) eta depolarizazioak eragindako kitzikapenaren ezabaketa (DSE) erantzunetan, bietan 2-AGk atzera-mezulari gisa jokatzeko duela. Izan ere, MAGL genea ezabatuta duten saguetan, CB1-menpeko DSI eta DSE erantzunak luzeago mantentzen dira (Kano et al., 2009; Straiker eta Mackie, 2009). Gainera, MAGL inaktibazio farmakologiko edo genetiko osoak tonu kannabinoidea areagotzen du eta, aldi berean, CB1 hartzailen desentsibilizazioa, CB1 agonistekiko tolerantzia eta CB1 hartzailen espresioaren jaitsiera (Chanda et al., 2010; Schlosburg et al., 2010). ABHD12 ere presinapsian kokatzen da, *pool* garrantzitsu bat Golgi-aparatuan kokatzen bada ere (Blankman et al., 2007). Presinapsian kokatzen den ABHD12 populazioak 2-AG hidrolisian parte hartzen du, bere kontribuzioa txiki xamarra bada ere (Blankman et al., 2007; Blankman et al., 2013). Hala ere, ez dirudi ABHD12k epe laburreko CB1 hartzailen menpeko plastizitate sinaptikoan parte hartzen duenik, bere gainespresioak ez baitu DSE luzatzen hipokanpoko neurona autaptikoetan (Straiker et al., 2012). Aitzitik, ABHD12ren ezabaketa genetikoak korrante kitzikatzaile postsinaptikoak (EPSCak) moteltzen ditu, 2-AG gehiegizkoa denean, ABHD12 bere hidrolisian inplikaturik egon litekeela iradokitzen duena. ABHD12 ezabatuta zuten neurona autaptikoen kultiboa luzaro mantendu zenean, CB1 hartzailen desentsibilizazioa ikusi zen. Beraz, baldintza berezietan, ABHD12 hidrolasak 2-AGren garbiketara parte har dezakeela dirudi (Straiker et al., 2013). Aipatutako ikerlanen arabera, MAGL eta ABHD12 oso zeregin desberdinak dituzte funtzio sinaptikoan, biak 2-AG hidrolizatzeke gai eta auresinaptikoak

izanik ere. Horren ildotik, azpimarratzekoa da MAGL eta ABHD12 harreman oso desberdina dutela bigeruz lipidikoarekin. Batetik, MAGL ez bezala, ABHD12 mintz-zeharreko proteina da. Bestetik, homologia bidezko modelizazioak ABHD12ren domeinu katalitikoa bigeruz lipidikoaren aurpegi estrazelularrera ematen duela iragartzen du, MAGL bigeruz lipidikoaren aurpegi zitosolikoari ahul lotuta dagoen bitartean. Beraz, bi entzima presinaptiko horien domeinu katalitikoaren kokapenak funtzio desberdintasuna baldintzatuko lukeela espekula daiteke. FAAH eta ABHD6 hidrolasei dagokienez, biak alde postsinaptikoan kokatzen diren mintz-zeharreko proteina integralak dira, eta horrek 2-AG atzera-seinaleztapenean duten eragin eskasa azalduko luke (ikus berrazterketa; (Murataeva et al., 2014).

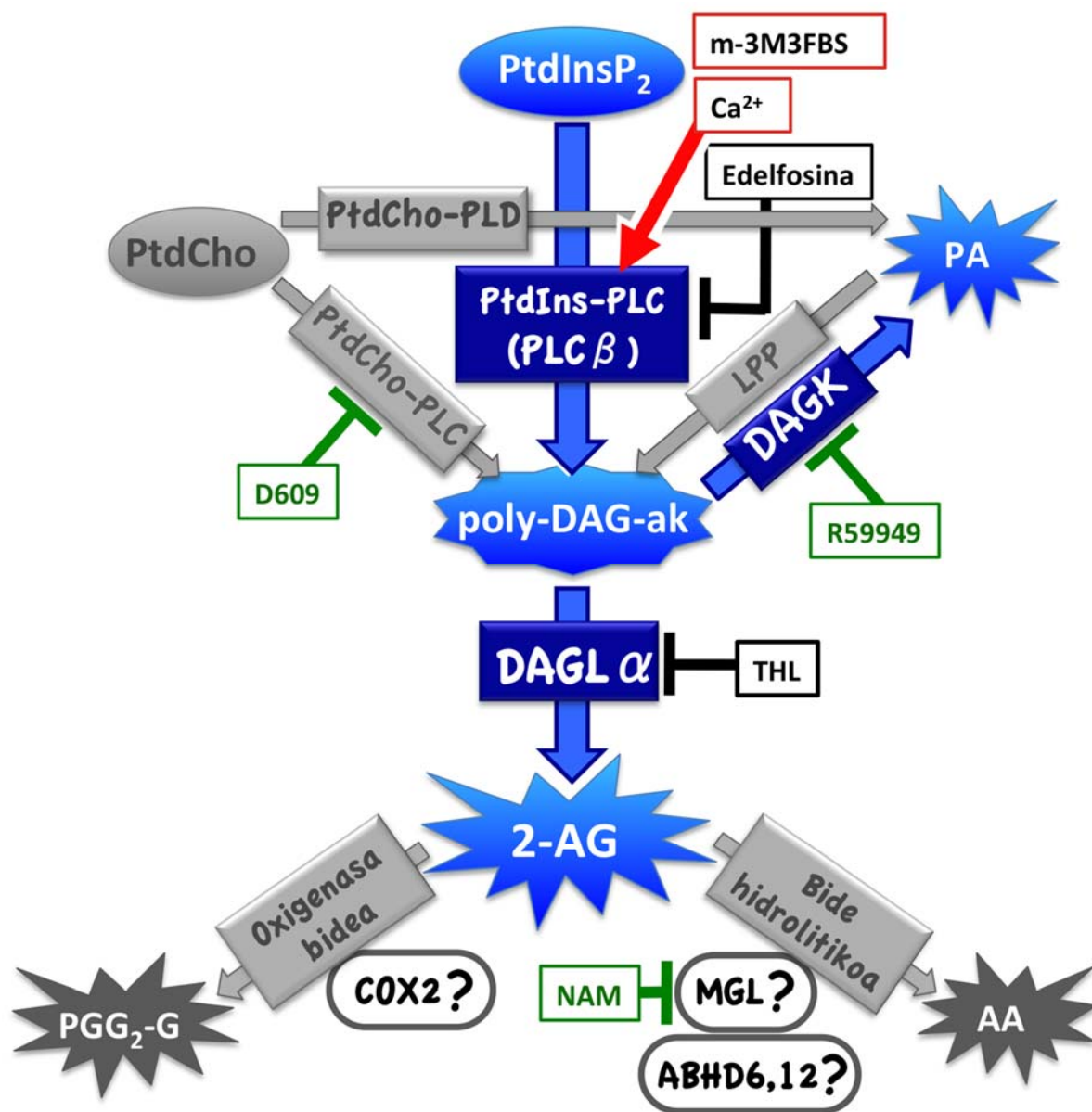
Arratoi helduaren garun-kortexetik isolatutako nukleo osoetan ikusitako 2-AG ekoizpen nuklear endogenoak (García del Caño et al., 2014; García del Caño et al., 2015), sinapsian bezala, metabolito horren garbiketarako degradazio-entzimak nukleoan ere koka litezkeela pentsarazten du. Berriz, sinapsia eta nukleoa estrukturalki eta funtzionalki oso urrun dauden domeinu zelularrak izanik, entzima horien espresio erlatibo mailak oso desberdinak izan litezkeela aurreikusten genuen. Beraz, aipatutako lau serina-hidrolasa horietako batzuk nukleoan ere koka litezkeelakoan, arratoi helduaren garun-kortexeko azpifrazioetan (nukleo isolatuak barne), MAGL, FAAH eta ABHD12ren espresioa *Western blot* bidez aztertu genuen. ABHD6ren espresioa ezin izan genuen aztertu haren aurkako antigorputz espezifikorik ezin izan genuelako eskuratu. Aztertutako hiru hidrolasetatik, MAGL eta ABHD12 aurkako antigorputzek proteina horien masa molekular teorikoarekin bat zetozen bandak eman zituzten nukleo osoen laginetan. Gainera, *Western blot* seinaleak intentsoagoak ziren nukleo osoen laginetan homogenatu gordinen baino, bi hidrolasa horiek nukleoetan aberastuta daudela iradokitzen duena. Are gehiago, nukleo osoen laginetan MAGL seinalea hiru bat aldiz intentsoagoa zen mintz plasmatikoen laginetan baino, ABHD12 seinalea bi konpartimentuetako laginetan parekoa zen bitartean. Sinapsiaren antzera, entzima hidrolitikoek 2-AGren degradazioan duten kontribuzio erlatiboak isoforma desberdinen kokapen azpinuklearraren menpekoea dela aurreikus litekeelakoan, MAGL eta

ABHD12ren kokapen azpinuklearra immunofluoreszentzia bikoitzaren bidez aztertu genuen. Argi eta garbi, bi entzimen kasuan, immunoerreaktibitatea nukleo-estalduraren azpian kokatzen zen eta MAGL zein ABHD12ren aurkako antigorputzek seinale bizia eman zuten nukleoplasmako gune diskretuetan, kromatina tindaketa ahuleko eremuetan. Bi immunofluoreszentzia-seinaleak ere gainezarpen handia, baina ez-osoia, erakutsi zuten NeuN/Fox-3 (matrize nuklearreko markatzailea) zein DAGL α -seinaleekin. Nukleo osoen azpifrakzioetan egindako *Western blot* entseguek informazio gehigarria eman zuten. Hala, MAGL seinalea ia erabat ezabatzen zen matrize nuklearretik DNasa I entzimarekin, ABHD12 seinalearen *pool* handi bat matrize nuklearrean iraun zuen bitartean. DAGL α matrize nuklearrean kokatzen dela kontuan hartuta (García del Caño et al., 2015), emaitza hauek ABHD12 (eta ez MAGL) nukleoan ekoiztutako 2-AGaren entzima hidrolitiko nagusia izan litekeela iradokitzen zuten, eta bat zetozen MAGL inhibitzaileen omisioak 2-AG metaketa nuklearrean zuen eragin eskasarekin. Hala ere, *Western blot* eta immunofluoreszentzia bidez lortutako emaitzetatik ateratako ondorioak berresteko, entsegu biokimikoak gehiago burutu genituen matrize nuklearreko gertakinetan. Hala, 2-AG exogenoaren hidrolisia (hau da, AA metaketa) serina-hidrolasa aktibitadedun entzimen inhibitzaile desberdinen presentzian aztertu genuen. NAM eta JZL184 MAGL inhibitzaile selektiboen presentzian lortutako emaitzak bat zetozen matrize nuklearrean ikusitako MAGL-immunoerreaktibitate ezarekin, eraginik ez baizen ikusi AA metaketan. ABHD6 espresioa, *Western blot* eta immunofluoreszentzia bitartez, ikertu ezin izan bagenuen ere, ABHD6ren inhibizioak AA metaketan izan lezakeen eragina aztertzea erabaki genuen. Horretarako WWL70 inhibitzaile selektiboa erabili genuen eta, MAGL inhibitzaileek bezala, eraginik ez zuela ikusi genuen. Azkenik, ABHD12ren inhibitzaile selektiborik ezean, metil-arakidonil fluorofosfonatoa (MAFP) erabili genuen. MAFP ABHD12ren inhibitzaile indartsua da, baina ABHD6 eta FAAH entzimen gainean ere eragiten du (Deutsch et al., 1997; Saario et al., 2004; Navia-Paldanius et al., 2012). Lortutako emaitzen arabera, 10 μ M MAFP erabat galarazten zuen AA emaria eta karakterizazio farmakologikoak inhibizio horren IC₅₀ 1 nM inguruan dagoela erakutsi zuten. Potentzia hori bat dator MAFPk ABHD12rekiko duen afinitatearekin. Datu horrek,

serina-hidrolasa aktibitateak MAGL eta ABDH6 inhibitzaillekiko erakusten duen sentikortasun ezarekin batera, 2-AGren hidrolasa nagusia ABHD12 dela adierazten du, are gehiago matrize nuklearrean aurkitutako serina-hidrolasa bakarra ABHD12 dela ikusita. Hala ere, *Western blot* entseguetan ikusitakoaren arabera, MAGL aberastuta dago nukleoetan eta, beraz, entzima horrek 2-AGren degradazioan parte hartu lezake nukleo osoetan. Baita ere, ikusitako DAGL eta MAGL aktibitate hidrolitikoaren desakoplamendua erabilitako laginaren ondoriozkoa da. MAGL eta ABHD12 serina-hidrolasa nuklearren banaketan antzeman dugun desberdintasuna, substratu-multzo desberdinen kontrolaren ondoriozkoa izan liteke. Mintz plasmatikoa dauden 2-AGren degradazio-entzimetarako proposatu den gisara (Blankman et al., 2007) serina-hidrolasa nuklear desberdinen kokapen heterogeneoak 2-AG pool desberdinen gaineko kontrolarekin erlazionatua egon liteke.

2-AGren biologian, ziklooxigenasa-2 (COX2) menpeko oxidazioa azken urteotan garrantzi gehien hartu duen bide metabolikoetako bat da. AA aitzindari gisa erabiliz, COX2 aktibitateak prostaglandina G₂ (PGG₂) endoperoxido ziklikoa ematen du eta, ondoren, PGG₂-ren erredukzioaz PGH₂. Isomerasa espezifikoek eragin fisiologiko ugari dituzten prostaglandinak (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}), prostaziklina (PGI₂) edo tronboxano A₂ (TXA₂) ekoizten dituzte (O'Banion, 1999). AA substratuaz gainera, COX2k 2-AG bihur dezake prostaglandina glizerol esterrak (PGG₂-G) emateko (45. irudia). PGG₂-G horietatik, aurrerago aipatutako bide metaboliko berdinen bidez, prostaglandinen (PGD₂-G, PGE₂-G, PGF_{2α}-G), prostaziklinaren (PGI₂-G), tronboxano A₂-ren (TXA₂-G) glizerol esterrak ekoizten dira (Sang et al., 2007; Hu et al., 2008; Straiker et al., 2011). Hainbat ikerketen arabera, COX2 bidezko konbertsioa eragin nabarmena du 2-AGk atzera-seinaleztapen sinaptikoan duen funtzioan. Esaterako, hipokampo-xafletan COX2 aktibitatearen inhibizioak DSIren iraupena handitzen du (Kim eta Alger, 2004) eta horrek COX2-k 2-AGren atzera-seinaleztapena mugatzean parte har dezakeela iradokitzen du. Zentzu berean, Slanina eta Sweitzer (2005) COX2-ren inhibizioak CB1-menpeko erantzun kitzikatzaileen beherapena eragiten duela ikusi zuten eta, hipokanpoko neurona GABAergikoen azpipopulazio batean, DSI doitzeko MAGL eta COX2

elkarlanean aritzen direla ikusi da (Straiker eta Mackie, 2009). Edonola ere, argi dago COX2 aktibitateak eragin



45. irudia. Isolatutako nukleo osoetan 2-arakidonilglicerol (2-AG) endokannabinoidaren metaketarako fosfolipasa C β /diazilglicerol lipasa α (PLC β /DAGL α) seinaleztapen-bidearen eredu. Irudi eskematikoan, 2-AG sintesian eta degradazioan ahalezko partaideak erakusten dira. Urdinez, lan honetan edo aurreko azterketetan egiaztatutakoaren arabera, matrize nuklearrean agertzen diren metabolitoak, entzimak eta bideak erakusten dira. Grisez, ordez, egiaztatu ez diren balizko osagaiak agertzen dira. Gure lanean erabili ditugun aktibatzaileak gorritz erakusten dira, orlegiz 2-AG metaketa baldintzak optimizatzeko erabilitako inhibitzaileak erakusten dira eta, beltzez, 2-AG metaketa nuklearra PLC β /DAGL α seinaleztapen ardatzaren menpekoa dela egiaztatzeko, kontrol negatibo gisa erabilitakoak dira.

handia izan dezakeela 2-AG sinaptikoaren metaketan, eta beste horrenbeste gerta liteke nukleoan, betiere COX2 nukleoan espresatuko balitz. Berriz, gure emaitzek COX2, gehien bat, nukleo estalduran kokatzen dela eta TX-100ekiko erauzgarria dela erakutsi zuten. Beraz, aktibitate entzimatiarren kateamendurako ko-konpartimentazioa aurrebaldintza bada,

ez dirudi COX2-k 2-AG nuklearraren metaketan eragingo lukeenik. Zentzu horretan, 10 μ M R-fulbiprofeno (COX2 inhibitzailea) konposatuak ez zuen 2-AG metaketa faboratu DAG exogenotik sortutako 2-AG metaketa. Hala ere, gorago MAGL eta ABHD12 aktibitate hidrolitikoetarako eztabaidatu den bezala, ezin bazter daiteke nukleo osoetan COX2 menpeko 2-AG degradazioa gerta litekeenik, hala PGG₂-Gak ekoiztuko liratekeela kateatutako PLC β , DAGL eta COX2 aktibitate entzimatikoen ondorioz (45. irudia).

4. NUKLEO NEURONALEAN EKOIZTUTAKO 2-AG-REN AHALEZKO FUNTZIOAK

Lan honen ondorio nagusitik (hots, nukleo neuronalen matrizean, kateatutako PLC β eta DAGL aktibitateen menpeko 2-AG ekoizpen endogenoa dagoela) itaun nagusi bat sortzen da: zein izan daiteke neuronan nukleoan PLC β eta DAGL aktibitateen menpe ekoiztutako 2-AGaren rol fisiologikoa?. Galderari erantzuteko hurbilketa esperimentalak ezinbestekoa bada ere, hainbat hipotesi planteatu ditzakegu eskura ditugun datuak aintzat hartuta. Idearik gertukoenetako bat 2-AG nuklearra konpartimentu horretako PLC β 1 nuklearrari esleitutako funtzioaren baten edo batzuren bitartekaria izan litekeela da. Zentzu honetan, lerro zelular desberdinetan, PLC β 1 nuklearrak ziklo zelularren kontrolean egundoko garrantzia duela demostratu da. PLC β 1 nuklearrak ziklo zelularren ganean duen eragina bere aktibitate katalitikoaren menpekoa dela ikusi ohi da, aktibitate horrek ziklo zelularren efektore batzuren erregulazioan dituen eraginak ezagunak direla. Haatik, PLC β 1 nuklearraren aktibitateetik sortutako bitartekari molekularrek erantzun zelularretan eta efektoreen erregulazioan duten rola ezezaguna da. Nukleoan, PLC β 1 aktibitatea pizteko eta itzaltzeko berezko mekanismoak daude, biokimikoki ondo bereizten direnak mintz plasmatikokoan dauden mekanismoetatik. Mintz plasmatikokoari asoziatuak dauden PLC β isozimen suspertze-mekanismoak ohizkoena G_{q/11} proteinei akoplatutako mintz-hartzaile metabotropikoen seinalez tapena inplikatzen du. Hartzaile horien aktibazioak G_{q/11} proteinen α -azpunitatea eta GTPren arteko konplexuaren eraketa eragiten du (G α_q -GTP), eta aktibatutako G α_q eta PLC β 1en arteko konplexuaren eraketak aktibitate katalitikoa bizkortzen du. Aldi berean,

PLC β 1 berak duen GAP aktibitateak, GTP/GDP trukea katalizatuz, G α_q inaktibatzen du eta PLC β 1 isozimak bideratutako erantzunei bukaera ematen die (Wallace et al., 1991; Sallés et al., 1993a; Sallés et al., 1993b). PLC β 1 nuklearraren aktibazio modurik nagusia, ordez, MAPK bitartez gertatzen da (Martelli et al., 2000; Xu et al., 2001b). Hala, IGF-1 hazkuntza-faktoreak MAPKren translokazio nuklearra eragiten du, eta kinasa horrek, S982 posizioan eragindako PLC β 1en fosforilazioaz, fosfoinositol nuklearren zikloa jartzen du abian (Xu et al., 2001b). Pizte-mekanismoaren kasuan bezala, PLC β 1 nuklearrak berezko inaktibazio mekanismoa du. Xu eta kolaboratzaileek (2001b) ikusitakoaren arabera, PIP $_2$ -tik sortutako DAGak proteina kinasa C- α (PKC α) zitosoletik nukleora erakartzen du. PKC α -k, bere aldetik, PLC β 1 nuklearraren fosforilazioa katalizatzen du S887 posizioan, eta horrek PLC β 1en inaktibazioa dakar (Xu et al., 2001b). Aktibazio eta inaktibazio mekanismo nagusiek aipatutako PLC β 1 populazio biak biokimikoki ondo bereiztea ahalbidetzen badu ere, mintzen eta nukleoko PLC β 1 populazioek, entsegu-tutuan bada ere, Ca $^{2+}$ ioien bidezko aktibazioa partekatzen dute (Sallés et al., 1993a; Sallés et al., 1993b; García del Caño et al., 2015), hemen aurkeztutako emaitzak). Beraz, mintzean bezala (Hashimotodani et al., 2005), kaltzioa beharrezko kofaktorea izan liteke PLC β 1en aktibazioan eta, beraz, kaltzio korrante nuklearrak garrantzitsuak izan litezke fosfoinositol nuklearren metabolismoa doitzeko.

Nolanahi ere, PLC β 1 isozimaren *pool* nuklearrak proliferazioa edo diferentziazioa bultzatzen dezake testuinguru zelularren arabera. Esaterako, sagu-eritroleuzemia (MEL) lerroaren kasuan, PLC β 1 isozimaren *pool* nuklearra mitogenikoa da eta hazkuntza-faktoreek estimulatutako proliferazioa bultzatzen du. Proliferazioan eta DMSOk eragindako diferentziazioan dauden MEL zeluletan, PLC β 1 aktibitatea bizkortzen eta geldotzen da, hurrenez hurren (Divecha et al., 1995). Are gehiago, MEL zeluletan, PLC β 1en gainespresioak DMSOk bultzatutako diferentziazioa geldotzen du. Berriz, efektu hori ez da antzematen PLC β 1M2b mutantea (NLS sekuentzian, nukleorako translokazioa galarazten duen K1056I, K1063I, K1070I mutazioak dituena; (Kim et al., 1996) gainespresatzen denean (Matteucci et al., 1998). MEL zeluletan, PLC β 1 nuklearrak ziklinak eta ziklinen menpeko

kinasak (cdk) modulatu ditu, PLC β 1-en gainespresioa nahikoa dela ziklo zelularren G1>S progresioa erregulatzen duten D3 ziklinaren eta cdk4 kinasaren espresioa bizkortzeko (Faenza et al., 2000a). Ondorioz, ziklina D3/cdk4 konplexuak retinoblastoma proteina (pRB) fosforilatzen du, eta horrek E2F1 transkripzio faktorearen aktibazioa eta ziklo zelularren progresioa dakar (Mittnacht, 1998). Paradoxikoki, beste testuinguru zelular batzuetan, ziklina D3 eta cdk4 ziklo zelularren gelditze eta diferentziaziorako beharrezkoak dira. Hala, hazkunde-eten egoeran dauden 3T3-L1 pre-adipozitoak, hormona tratamenduaz, berriz sartzen dira ziklo zelularrean, eta diferentziaziorako ezinbestekoa den hedapen klonal aldiari bide ematen zaio. Prozesu horretan, Cdk-ziklina-E2F-Rb seinaleztapen ardatzak giltza moduan jokatzen du, E2F1-en gora-erregulazio indartsua eragiten duela adipogenesiaren hasieran (Richon et al., 1997). E2F1 transkripzio faktoreak, adipogenesirako transkripzio faktore nagusia den peroxisomen proliferaziorako aktibatutako gamma hartzailaren (PPAR γ) espresioa areagotuz, adipozitoen diferentziazioa erregulatzen du (Fajas et al., 2002). Bestalde, PPAR γ espresioa bultzatzeaz gainera, cdk4 kinasa eta ziklina D3 PPAR γ -ri lotzeko eta aktibatzeko gai dira (Abella et al., 2005; Sarruf et al., 2005). Are gehiago, ziklina D3/PPAR γ interakzioaren ondorioz gertatzen den PPAR γ aktibazioa ligando menpekoa dela ikusi da (Sarruf et al., 2005). Nabarmenki, IGF-1 bidez bultzatutako 3T3-L1 pre-adipozitoen diferentziazioan, PLC β 1-en lokalizazio nuklearra zein aktibitate katalitikoa ezinbestekoak dira (O'Carroll et al., 2009). Autore horiek ikusitakoaren arabera, PLC β 1 nuklearra eta bere aktibitate katalitikoa beharrezkoa da 3T3-L1 zelulen adipogenesiaren bi aldietan. Tratamenduaren ondorengo lehenengo 5 minutuetan, PLC β 1 nuklearraren erregulazioa ERK eta PKC α -ren menpekoa da, eta ez du behar PLC β 1 berria nukleora translokatzeari. Tratamenduaren bigarren egunetik aurrera, PLC β 1 aktibitatea sintetizatutako PLC β 1 berriaren translokazio nuklearraren menpekoa da eta ERK/PKC α seinaleztapenaren independentea. Aldi goiztiar zein berantiarretan izan, PLC β 1 espresioaren ezabaketak (interferentzia RNA txikien -siRNA- bidez) 3T3-L1 zelulen diferentziazioa galarazten du. Halaber, PLC β 1 aktibitatearen inhibizioak, eta PLC β 1 aktibitate katalitiko nuklearra eta PLC β 1-en lokalizazio nuklearra galarazten duten mutanteek (PLC β 1^{S982G} - Δ mk- eta M2b,

hurrenez hurren) ziklina D3/cdk4 konplexuko osagaien gora-erregulazioa eta 3T3-L1 adipozito diferentziazioa saihesten dute (O'Carroll et al., 2009). Baita ere, Δ mk eta M2b gainartzaile negatiboen gainespresioak PPAR γ gora-erregulazioa saihesten du. Beste eredu zelular batzuetan ere, PLC β 1 nuklearra ezinbestekoa da diferentziaziorako. Hala, C2C12 sagu mioblastoetan, PLC β 1 nuklearraren menpeko D3 ziklinaren gora-erregulazioa beharrezkoa da C2C12 zelulak muskulu eskeletikora diferentziazitzeko (Faenza et al., 2003). Tesi lan honekin erlazionatuago, gure laborategian ikusitakoaren arabera (González-Burguera et al., 2015) PLC β 1en espresioa beharrezkoa eta nahikoa da NT2 zelulen diferentziazio neuronal bultzatzeko. Hala, siRNA bidezko PLC β 1en ezabaketak 1 β -arabinofuranosilzitosina (AraC) tratamenduaz eragindako NT2 zelulen diferentziazio neuronal (Musch et al., 2010; González-Burguera et al., 2016) erabat galarazten du (González-Burguera et al., 2015). Zentzu berean, PLC β 1en gainespresioak NT2 zelulen diferentziazio neuronal bultzatzen du AraC bidezko indukziorik gabe (González-Burguera et al., 2015).

Gorago eztabaidatutako aurrekariak agerian jartzen dute PLC β 1 isozimak proliferazioa edo diferentziazioa bultzatzea dezakeela testuinguru zelularraren arabera, eta PLC β 1 menpe aktibatutako efektoreetako batzuk partekatuta daudela proliferazioan eta diferentziazioan. Diferentziazio neuronalaren testuinguruan, PLC β 1 bidezko efektu fisiologikoetan parte hartzen duten efektoreen artean, PPAR γ hartzaile nuklearrak geroz eta atentzio gehiago jasotzen ari da, besteak beste, PPAR γ agonistek marraskarien ama-zelula enbrionarioen diferentziazio neuronal eragiteko gai direlako (Ghoochani et al., 2012). 2-AG PPAR γ -ren agonista endogenoa izanik (Raman et al., 2011), PLC β 1 nuklearraren aktibitatea eta PPAR γ -k bultzatutako diferentziazio neuronal lotzen dituen bitartekaria 2-AG izan litekeela planteatu daiteke. Baita ere, 2-AG nuklearraren degradazio oxidatiboz sor litezkeen ziklopentenona glizerol esterrak (bereziki 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -J₂ prostaglandinaren glizerol esterra; 15d-PGJ₂-G) PPAR γ -ren agonistak dira eta funtzio bera bete lezakete (Surh et al., 2011; Raman et al., 2011). Ideia hau oso erakargarria izanik, neurona helduen nukleo neuronalatik lortutako

ebidentziak erabili ditugu PLC β 1/DAGL α /2-AG ardatz nuklearra deskribatzeko. Neurona helduetan, proposatutako PLC β 1/DAGL α /2-AG/PPAR γ seinaleztapen-ardatz nuklearraren funtzioa neuronen egoera postmitotikoa mantentzea izan liteke. Honen alde, PLC β 1 bidezko PPAR γ aktibazioak 3T3-L1 adipozitoen diferentziazioa mantentzen du (O'Carroll et al., 2009). Bestalde, PPAR γ hartzailearen agonistek (Zhao et al., 2011; Gray et al., 2012; Corona eta Duchon, 2016), Kannabinoideen deribatuak barne (Sun et al., 2008; Díaz-Alonso et al., 2016), neuroinflamazio paradigma esperimental desberdinetan, neuronen biziraupena faboratzen dutela jakinda, beste ideia interesgarri bat sortzen da proposatutako seinaleztapen-ardatzaren inguruan: 2-AGk neuronan babesle gisa joka lezakeela PPAR γ hartzailearen aktibazioaren bidez. Beraz, neuroinflamazioan edo neuronan heriotza eragiten duten bestelako baldintzetan, 2-AG nuklearraren metaketa areagotzen den aztertzea interesgarria izango litzateke. Zentzu horretan, hipoxia (Nakano et al., 2006) eta hiperkitzikakortasun (Tanaka et al., 2013) baldintzetan, DAG quinasa ζ -ren translokazioa gertatzen da, neuronak p53 menpeko heriotzatik babesten dituen (Tanaka et al., 2013). Nabarmenki, arratoi helduaren garun kortexetik isolatutako nukleo osoetan burututako 2-AG metaketaren entseguetan, DAG kinasa aktibitatearen inhibitzaileak jarri ezean, PLC β 1/DAGL α aktibitateek bideratutako 2-AG metaketa nabarmen gutxitzen dela ikusi dugu, seguruenik, DAG eskuragarritasunaren jaitsieraren ondorioz. Beraz, DAG quinasa ζ nuklearraren translokazio zitosolikoak DAG eskuragarritasuna handituko luke DAGL α -k 2-AG ekoizteko. Beraz, 2-AG ekoizpena eta degradazioa aztertzea oso interesgarria izango litzateke hipoxia eta hiperkitzikakortasun pairatu duten animalietatik isolatutako nukleoetan.

VII. ONDORIOAK

1. DAGL α -ren aurkako antigorputzen espezifikotasunaren balioestean erabilitako hurbilketa esperimental guztiek DGL α -Rb-Af380 untxi-antigorputz poliklonala egokiena dela adierazi zuten.
2. Erabilitako fixapen metodoak, DAGL α -ren lokalizazio sinaptiko ezagunaz gain, agerian jartzen du entzima hori arratoi helduaren garun-kortexeko nukleoetan ere espresatzen dela.
3. Garun-kortexeko mintz zelularretan egindako *Western blot* bidezko azterketak DAGL α nagusiki mintz sinaptikoetan espresatzen dela erakusten du.
4. Garun-kortexeko nukleo osoen laginetan egindako *Western blot* bidezko azterketak DAGL α -ren espresio nuklearra berresten du.
5. Immunofloreszentzia bikoitzaren bidezko azterketak DAGL α -ren espresio nuklearra soilik jatorri neuronaleko nukleoetan gertatzen dela erakusten du.
6. Immunofloreszentzia bikoitzaren bidezko azterketak DAGL α nuklearraren markaketa kromatina tindaketa ahuleko nukleoplasma eremuetara mugatuta dagoela erakusten du.
7. Nukleo neuronaletan, immunofloreszentzia bikoitzaren bidezko azterketak PLC β isozimak DAGL α -ren lokalizazio berdintsuetan kokatzen dela erakusten du.
8. Garun-kortexeko nukleo osoen azpifrakzioetan egindako *Western blot* bidezko azterketak DAGL α , gehien bat, matrize nuklearrean kokatzen dela erakusten du.
9. 2-AG ekoizpen endogenoaren azterketak PLC β eta DAGL α nukleo neuronaletan elkarrekin lan egiten dutela erakusten du. Honenbestez, sinapsietan bezala, 2-AG sintesirako PLC β /DAGL α -ardatzak funtzionatzen du nukleo neuronaletan.

10. Garun-kortexeko nukleoen matrizean, 2-AGren ekoizpen-zinetika Michaelis-Menten zinetika-eredura moldatzen da, eta lortutako parametroek ($K_M=179,8 \pm 15,8 \mu\text{M}$ eta $V_{max}=1,3 \pm 0,22 \text{ pmol}/\mu\text{g proteina}/\text{min}$) 2-AG ekoizpenaren erantzulea DAGL α isozima dela iradokitzen dute.

11. Immunfluoreszentzia eta *Western blot* bidezko azterketek, nukleo neuronaletan, 2-AG degradazioan inplikaturako entzimen konpartimentazioa heterogeneoa dela erakusten dute. Hala, nukleo neuronalen matrizean aztertutako entzimen artean, ABHD12 hidrolasa besterik ez da espresatzen.

12. Degradazio entzimatiakoaren azterketak, nukleo neuronalen matrizean 2-AG degradazioaren erantzulerik nagusiena ABHD12 dela iradokitzen du.

VIII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abella A, Dubus P, Malumbres M, Rane SG, Kiyokawa H, Sicard A, Vignon F, Langin D, Barbacid M, Fajas L (2005) Cdk4 promotes adipogenesis through PPARgamma activation. *Cell Metab* 2:239-249.
- Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I (2006) The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci* 26:1551-1561.
- Allen AC, Gammon CM, Ousley AH, McCarthy KD, Morell P (1992) Bradykinin stimulates arachidonic acid release through the sequential actions of an sn-1 diacylglycerol lipase and a monoacylglycerol lipase. *J Neurochem* 58:1130-1139.
- Amin D, Sutherland CA, Khandwala AS, Jamall IS, Kapoor AL (1986) Inhibition of the effects of thrombin on guinea pig platelets by the diacylglycerol lipase inhibitor RHC 80267. *Thromb Res* 44:75-84.
- Amtmann E (1996) The antiviral, antitumoural xanthate D609 is a competitive inhibitor of phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Drugs Exp Clin Res* 22:287-294.
- Antony P, Kanfer JN, Freysz L (2000) Phosphatidylcholine metabolism in nuclei of phorbol ester-activated LA-N-1 neuroblastoma cells. *Neurochem Res* 25:1073-1082.
- Antony P, Farooqui AA, Horrocks LA, Freysz L (2001) Effect of D609 on phosphatidylcholine metabolism in the nuclei of LA-N-1 neuroblastoma cells: A key role for diacylglycerol. *FEBS Letters* 509:115-118.
- Argaw A, Duff G, Zabouri N, Cécyre B, Chainé N, Cherif H, Tea N, Lutz B, Ptito M, Bouchard J (2011) Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance. *J Neurosci* 31:1489-1499.
- Bae Y, Lee TG, Park JC, Hur JH, Kim Y, Heo K, Kwak J, Suh P, Ryu SH (2003) Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Mol Pharmacol* 63:1043-1050.
- Baker RR, Chang H (2001) Phosphatidic acid is the prominent product of endogenous neuronal nuclear lipid phosphorylation, an activity enhanced by sphingosine, linked to phospholipase C and associated with the nuclear envelope. *Biochim Biophys Acta* 1534:110-120.
- Barrack ER, Coffey DS (1982) Biological properties of the nuclear matrix: Steroid hormone binding. *Recent Prog Horm Res* 38:133-195.
- Belgrader P, Siegel AJ, Berezney R (1991) A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix. *J Cell Sci* 98 (Pt 3):281-291.
- Berezney R, Coffey DS (1974) Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 60:1410-1417.
- Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urbán GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T (2007) Hardwiring the brain: Endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* 316:1212-1216.

BIBLIOGRAFIA

- Biddlecome GH, Berstein G, Ross EM (1996) Regulation of phospholipase C-beta1 by α_1 and m_1 muscarinic cholinergic receptor. steady-state balance of receptor-mediated activation and GTPase-activating protein-promoted deactivation. *J Biol Chem* 271:7999-8007.
- Bin Pan, Wei Wang, Jonathan Z. Long, Dalong Sun, Cecilia J. Hillard, Benjamin F. Cravatt, Qing-song Liu (2009) Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl 4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl)piperidine-1-carboxylate (JZL184) enhances retrograde endocannabinoid signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (United States)* 331:591-597.
- Bisogno T (2008) Endogenous cannabinoids: Structure and metabolism. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1:1-9.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov MYu n, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V (2000) N-acyl-dopamines: Novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J* 351 Pt 3:817-824.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams E, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163:463-468.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 14:1347-1356.
- Blankman JL, Long JZ, Trauger SA, Siuzdak G, Cravatt BF (2013) ABHD12 controls brain lysophosphatidylserine pathways that are deregulated in a murine model of the neurodegenerative disease PHARC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1500-1505.
- Boronenkov IV, Loijens JC, Umeda M, Anderson RA (1998) Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell* 9:3547-3560.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brill LM, Xiong W, Lee K, Ficarro SB, Crain A, Xu Y, Terskikh A, Snyder EY, Ding S (2009) Phosphoproteomic analysis of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5:204-213.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E (1998) Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82:1131-1149.
- Bunting M, Tang W, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM (1996) Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* 271:10230-10236.

BIBLIOGRAFIA

- Burston JJ, Sim-Selley LJ, Harloe JP, Mahadevan A, Razdan RK, Selley DE, Wiley JL (2008) N-arachidonyl maleimide potentiates the pharmacological and biochemical effects of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol through inhibition of monoacylglycerol lipase. *J Pharmacol Exp Ther* 327:546-553.
- Cai D, Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT (2001) Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci* 21:4731-4739.
- Canonica PL, Cronin MJ, MacLeod RM (1985) Diacylglycerol lipase and pituitary prolactin release in vitro: Studies employing RHC 80267. *Life Sci* 36:997-1002.
- Cavallaro U, Dejana E (2011) Adhesion molecule signalling: Not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:189-197.
- Chanda PK, Gao Y, Mark L, Btsh J, Strassle BW, Lu P, Piesla MJ, Zhang M, Bingham B, Uveges A, Kowal D, Garbe D, Kouranova EV, Ring RH, Bates B, Pangalos MN, Kennedy JD, Whiteside GT, Samad TA (2010) Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system. *Mol Pharmacol* 78:996-1003.
- Chevaleyre V, Castillo PE (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: A novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38:461-472.
- Corona JC, Duchen MR (2016) PPAR γ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radic Biol Med* 100:153-163.
- Costa MA, Fonseca BM, Keating E, Teixeira NA, Correia-da-Silva G (2014) 2-arachidonoylglycerol effects in cytotrophoblasts: Metabolic enzymes expression and apoptosis in BeWo cells. *Reproduction* 147:301-311.
- Davis LI, Blobel G (1986) Identification and characterization of a nuclear pore complex protein. *Cell* 45:699-709.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.
- Dent MAR, Segura-Anaya E, Alva-Medina J, Aranda-Anzaldo A (2010) NeuN/fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett* 584:2767-2771.
- Dephoure N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10762-10767.
- Deutsch DG, Omeir R, Arreaza G, Salehani D, Prestwich GD, Huang Z, Howlett A (1997) Methyl arachidonyl fluorophosphonate: A potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochem Pharmacol* 53:255-260.
- Devane WA, Breuer A, Sheskin T, Järbe TU, Eisen MS, Mechoulam R (1992a) A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 35:2065-2069.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992b) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.

BIBLIOGRAFIA

- Díaz-Alonso J, Paraíso-Luna J, Navarrete C, Del Río C, Cantarero I, Palomares B, Aguares J, Fernández-Ruiz J, Bellido ML, Pollastro F, Appendino G, Calzado MA, Galve-Roperh I, Muñoz E (2016) VCE-003.2, a novel cannabigerol derivative, enhances neuronal progenitor cell survival and alleviates symptomatology in murine models of huntington's disease. *Sci Rep* 6:29789.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002a) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10819-10824.
- Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D (2004) RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol* 66:1260-1264.
- Dinh TP, Freund TF, Piomelli D (2002b) A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 121:149-158.
- Divecha N, Letcher AJ, Banfic HH, Rhee SG, Irvine RF (1995) Changes in the components of a nuclear inositide cycle during differentiation in murine erythroleukaemia cells. *Biochem J* 312:63-67.
- Doherty n, Walsh n (1996) CAM-FGF receptor interactions: A model for axonal growth. *Mol Cell Neurosci* 8:99-111.
- Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS (1991) Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels. *Cell* 67:21-33.
- D'Santos CS, Clarke JH, Irvine RF, Divecha N (1999) Nuclei contain two differentially regulated pools of diacylglycerol. *Curr Biol* 9:437-440.
- Du Y, Shen J, Hsu JL, Han Z, Hsu M-, Yang C-, Kuo H-, Wang Y-, Yamaguchi H, Miller SA, Hung M- (2014) Syntaxin 6-mediated golgi translocation plays an important role in nuclear functions of EGFR through microtubule-dependent trafficking. *Oncogene* 33:756-770.
- Exton JH (1994) Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1212:26-42.
- Faenza I, Matteucci A, Manzoli L, Billi AM, Aluigi M, Peruzzi D, Vitale M, Castorina S, Suh PG, Cocco L (2000a) A role for nuclear phospholipase cbeta 1 in cell cycle control. *J Biol Chem* 275:30520-30524.
- Faenza I, Blalock W, Bavelloni A, Schoser B, Fiume R, Pacella S, Piazzini M, D'Angelo A, Cocco L (2012) A role for PLCβ1 in myotonic dystrophies type 1 and 2. *Faseb J* 26:3042-3048.
- Faenza I, Ramazzotti G, Bavelloni A, Fiume R, Gaboardi GC, Follo MY, Gilmour RS, Martelli AM, Ravid K, Cocco L (2007) Inositide-dependent phospholipase C signaling mimics insulin in skeletal muscle differentiation by affecting specific regions of the cyclin D3 promoter. *Endocrinology* 148:1108-1117.

BIBLIOGRAFIA

- Faenza I, Bavelloni A, Fiume R, Lattanzi G, Maraldi NM, Gilmour RS, Martelli AM, Suh P, Billi AM, Cocco L (2003) Up-regulation of nuclear PLC β 1 in myogenic differentiation. *J Cell Physiol* 195:446-452.
- Faenza I, Matteucci A, Manzoli L, Billi AM, Aluigi M, Peruzzi D, Vitale M, Castorina S, Suh P, Cocco L (2000b) A role for nuclear phospholipase C β 1 in cell cycle control. *J Biol Chem* 275:30520-30524.
- Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J (2002) E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell* 3:39-49.
- Farooqui AA, Taylor WA, Horrocks LA (1986) Characterization and solubilization of membrane bound diacylglycerol lipases from bovine brain. *Int J Biochem* 18:991-997.
- Farooqui AA, Taylor WA, Horrocks LA (1984) Separation of bovine brain mono- and diacylglycerol lipases by heparin sepharose affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* 122:1241-1246.
- Farooqui AA, Horrocks LA (2005) Signaling and interplay mediated by phospholipases A2, C, and D in LA-N-1 cell nuclei. *Reprod Nutr Dev* 45:613-631.
- Fey EG, Krochmalnic G, Penman S (1986) The nonchromatin substructures of the nucleus: The ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J Cell Biol* 102:1654-1665.
- Fiume R, Faenza I, Matteucci A, Astolfi A, Vitale M, Martelli AM, Cocco L (2005) Nuclear phospholipase C β 1 (PLC β 1) affects CD24 expression in murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 280:24221-24226.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017-1066.
- Fritschy J (2008) Is my antibody-staining specific? how to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci* 28:2365-2370.
- Fukata Y, Fukata M (2010) Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 11:161-175.
- Gao Y et al (2010) Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 30:2017-2024.
- García del Caño G, Montana M, Aretxabala X, Gonzalez-Burguera I, Lopez de Jesus M, Barrondo S, Salles J (2014) Nuclear phospholipase C-beta1 and diacylglycerol LIPASE-alpha in brain cortical neurons. *Adv Biol Regul (England)* 54:12-23.
- García del Caño G, Aretxabala X, Gonzalez-Burguera I, Montana M, Lopez de Jesus M, Barrondo S, Barrio RJ, Sampedro C, Goicolea MA, Salles J (2015) Nuclear diacylglycerol lipase-alpha in rat brain cortical neurons: Evidence of 2-arachidonoylglycerol production in concert with phospholipase C-beta activity. *J Neurochem (England)* 132:489-503.

BIBLIOGRAFIA

- Garro MA, López de Jesús M, Ruíz de Azúa I, Callado LF, Meana JJ, Sallés J (2001) Regulation of phospholipase cbeta activity by muscarinic acetylcholine and 5-HT(2) receptors in crude and synaptosomal membranes from human cerebral cortex. *Neuropharmacology* 40:686-695.
- Gaveglio VL, Pasquaré SJ, Giusto NM (2011) Metabolic pathways for the degradation of phosphatidic acid in isolated nuclei from cerebellar cells. *Arch Biochem Biophys* 507:271-280.
- Ghoochani A, Shabani K, Peymani M, Ghaedi K, Karamali F, Karbalaei K, Tanhaie S, Salamian A, Esmaeili A, Valian-Borujeni S, Hashemi M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H (2012) The influence of peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma(1)$ during differentiation of mouse embryonic stem cells to neural cells. *Differentiation* 83:60-67.
- Giri DK, Ali-Seyed M, Li L, Lee D, Ling P, Bartholomeusz G, Wang S, Hung M (2005) Endosomal transport of ErbB-2: Mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol Cell Biol* 25:11005-11018.
- Goncalves MB, Suetterlin P, Yip P, Molina-Holgado F, Walker DJ, Oudin MJ, Zentar MP, Pollard S, Yáñez-Muñoz RJ, Williams G, Walsh FS, Pangalos MN, Doherty P (2008) A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner. *Mol Cell Neurosci* 38:526-536.
- González-Burguera I (2015). Human postmitotic neurons derived from NTERA2/D1 cells by short exposure to cytosine- β -D-arabinofuranoside: characterization of neurotransmitter phenotypes and role of phospholipase C β 1 in differentiation. Dirigida por Gontzal García del Caño y Maider Lopez De Jesus. Tesis doctoral internacional. UPV/EHU.
- González-Burguera I, Ricobaraza A, Aretxabala X, Barrondo S, García del Caño G, López de Jesús M, Sallés J (2016) Highly efficient generation of glutamatergic/cholinergic NT2-derived postmitotic human neurons by short-term treatment with the nucleoside analogue cytosine β -D-arabinofuranoside. *Stem Cell Res* 16:541-551.
- Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S (1998) Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett* 422:69-73.
- Gray E, Ginty M, Kemp K, Scolding N, Wilkins A (2012) The PPAR- γ agonist pioglitazone protects cortical neurons from inflammatory mediators via improvement in peroxisomal function. *J Neuroinflammation* 9:63.
- Grubb DR, Iliades P, Cooley N, Yu YL, Luo J, Filtz TM, Woodcock EA (2011) Phospholipase Cbeta1b associates with a Shank3 complex at the cardiac sarcolemma. *Faseb J* 25:1040-1047.
- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF (2004) Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 20:441-458.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3662-3665.

BIBLIOGRAFIA

- Harkany T, Mackie K, Doherty P (2008) Wiring and firing neuronal networks: Endocannabinoids take center stage. *Curr Opin Neurobiol* 18:338-345.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M (2007) Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci* 27:1211-1219.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Maejima T, Fukami K, Kano M (2008) Pharmacological evidence for the involvement of diacylglycerol lipase in depolarization-induced endocannabinoid release. *Neuropharmacology* 54:58-67.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Ogata H, Emoto K, Maejima T, Araishi K, Shin H, Kano M (2005) Phospholipase cbeta serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* 45:257-268.
- Hodgkin MN, Pettitt TR, Martin A, Michell RH, Pemberton AJ, Wakelam MJ (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: Which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* 23:200-204.
- Hozumi Y, Ito T, Nakano T, Nakagawa T, Aoyagi M, Kondo H, Goto K (2003) Nuclear localization of diacylglycerol kinase zeta in neurons. *Eur J Neurosci* 18:1448-1457.
- Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB, Marto JA, Sabatini DM (2011) The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* 332:1317-1322.
- Hu SS, Bradshaw HB, Chen JS-, Tan B, Walker JM (2008) Prostaglandin E2 glycerol ester, an endogenous COX-2 metabolite of 2-arachidonoylglycerol, induces hyperalgesia and modulates NFkappaB activity. *Br J Pharmacol* 153:1538-1549.
- Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, Goswami T, Rad R, Beausoleil SA, Villén J, Haas W, Sowa ME, Gygi SP (2010) A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* 143:1174-1189.
- Irvine RF (2003) Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:349-360.
- Jiang Y, Sakane F, Kanoh H, Walsh JP (2000) Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-[2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidiny)ethyl]-2, 3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes. *Biochem Pharmacol* 59:763-772.
- Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J, Greenberg DA (2004) Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 66:204-208.
- Jung K, Astarita G, Zhu C, Wallace M, Mackie K, Piomelli D (2007) A key role for diacylglycerol lipase-alpha in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization. *Mol Pharmacol* 72:612-621.
- Kanfer JN, McCartney D, Singh IN, Freysz L (1996) Phospholipase D activity of rat brain neuronal nuclei. *J Neurochem* 67:760-766.

BIBLIOGRAFIA

- Kang R, Wan J, Arstikaitis P, Takahashi H, Huang K, Bailey AO, Thompson JX, Roth AF, Drisdell RC, Mastro R, Green WN, Yates JR, Davis NG, El-Husseini A (2008) Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature* 456:904-909.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89:309-380.
- Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C (1997) cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem* 272:27218-27223.
- Katona I, Freund TF (2012) Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci* 35:529-558.
- Katona I, Freund TF (2008) Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 14:923-930.
- Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung K, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26:5628-5637.
- Katta SS, Smoyer CJ, Jaspersen SL (2014) Destination: Inner nuclear membrane. *Trends Cell Biol* 24:221-229.
- Kaufmann SH, Coffey DS, Shaper JH (1981) Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope, and pore complex lamina. *Experimental Cell Research*, *Experimental Cell Research* 132:105-123.
- Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo Pera RA (2009) Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* 462:222-225.
- Keimpema E, Barabas K, Morozov YM, Tortoriello G, Torii M, Cameron G, Yanagawa Y, Watanabe M, Mackie K, Harkany T (2010) Differential subcellular recruitment of monoacylglycerol lipase generates spatial specificity of 2-arachidonoyl glycerol signaling during axonal pathfinding. *J Neurosci* 30:13992-14007.
- Kennerly DA, Sullivan TJ, Sylwester P, Parker CW (1979) Diacylglycerol metabolism in mast cells: A potential role in membrane fusion and arachidonic acid release. *J Exp Med* 150:1039-1044.
- Kim CG, Park D, Rhee SG (1996) The role of carboxyl-terminal basic amino acids in gqalpha-dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C-beta1. *J Biol Chem* 271:21187-21192.
- Kim D, Jun KS, Lee SB, Kang NG, Min DS, Kim YH, Ryu SH, Suh PG, Shin HS (1997) Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* 389:290-293.
- Kim J, Alger BE (2010) Reduction in endocannabinoid tone is a homeostatic mechanism for specific inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 13:592-600.

BIBLIOGRAFIA

- Kim J, Alger BE (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* 7:697-698.
- Kozak KR, Prusakiewicz JJ, Marnett LJ (2004) Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Curr Pharm Des* 10:659-667.
- Kuriki H, Tamiya-Koizumi K, Asano M, Yoshida S, Kojima K, Nimura Y (1992) Existence of phosphoinositide-specific phospholipase C in rat liver nuclei and its change during liver regeneration. *J Biochem* 111:283-286.
- Levasseur S, Kostelec M, Burke G (1984) RHC 80267 inhibits thyrotropin-stimulated prostaglandin release from rat thyroid lobes. *Prostaglandins* 27:673-682.
- Li W, Blankman JL, Cravatt BF (2007) A functional proteomic strategy to discover inhibitors for uncharacterized hydrolases. *J Am Chem Soc* 129:9594-9595.
- Lledo P, Merkle FT, Alvarez-Buylla A (2008) Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 31:392-400.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- López de Jesús M, Zalduegui A, Ruiz de Azúa I, Callado LF, Meana JJ, Sallés J (2006) Levels of G-protein alpha q/11 subunits and of phospholipase C-beta(1-4), -gamma, and -delta1 isoforms in postmortem human brain caudate and cortical membranes: Potential functional implications. *Neurochem Int* 49:72-79.
- Ludányi A, Hu SS-, Yamazaki M, Tanimura A, Piomelli D, Watanabe M, Kano M, Sakimura K, Maglóczky Z, Mackie K, Freund TF, Katona I (2011) Complementary synaptic distribution of enzymes responsible for synthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the human hippocampus. *Neuroscience* 174:50-63.
- Maccarrone M, Bernardi G, Agrò AF, Centonze D (2011) Cannabinoid receptor signalling in neurodegenerative diseases: A potential role for membrane fluidity disturbance. *Br J Pharmacol* 163:1379-1390.
- Marrs WR et al (2010) The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci* 13:951-957.
- Martelli AM, Bortul R, Tabellini G, Bareggi R, Manzoli L, Narducci P, Cocco L (2002) Diacylglycerol kinases in nuclear lipid-dependent signal transduction pathways. *Cell Mol Life Sci* 59:1129-1137.
- Martelli AM, Billi AM, Manzoli L, Faenza I, Aluigi M, Falconi M, De Pol A, Gilmour RS, Cocco L (2000) Insulin selectively stimulates nuclear phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) beta1 activity through a mitogen-activated protein (MAP) kinase-dependent serine phosphorylation. *FEBS Lett* 486:230-236.
- Martin BR, Cravatt BF (2009) Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells. *Nat Methods* 6:135-138.

BIBLIOGRAFIA

- Massa F, Koehl M, Koelh M, Wiesner T, Grosjean N, Revest J, Piazza P, Abrous DN, Oliet SHR (2011) Conditional reduction of adult neurogenesis impairs bidirectional hippocampal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:6644-6649.
- Matteucci A, Faenza I, Gilmour RS, Manzoli L, Billi AM, Peruzzi D, Bavelloni A, Rhee SG, Cocco L (1998) Nuclear but not cytoplasmic phospholipase C beta 1 inhibits differentiation of erythroleukemia cells. *Cancer Res* 58:5057-5060.
- Miled N, Bussetta C, De caro A, Rivière M, Berti L, Canaan S (2003) Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol* 136:131-138.
- Mitchell J, Best N, Sundstrom LE, Wheal HV (1993) The use of sodium sulphide-fixed brain tissue for immunocytochemical staining of activated microglia and reactive astrocytes. *Histochemistry (Germany)* 99:91-94.
- Mittnacht S (1998) Control of pRB phosphorylation. *Current Opinion in Genetics & Development* 8:21-27.
- Montana M, García del Caño G, Lopez de Jesus M, Gonzalez-Burguera I, Echeazarra L, Barrondo S, Salles J (2012) Cellular neurochemical characterization and subcellular localization of phospholipase C beta1 in rat brain. *Neuroscience (United States)* 222:239-268.
- Moriyama T, Urade R, Kito M (1999) Purification and characterization of diacylglycerol lipase from human platelets. *J Biochem* 125:1077-1085.
- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabás K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzmán M, Lu H, Galve-Roperh I, Harkany T (2008) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8760-8765.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65.
- Murataeva N, Straiker A, Mackie K (2014) Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br J Pharmacol* 171:1379-1391.
- Musch T, Oz Y, Lyko F, Breiling A (2010) Nucleoside drugs induce cellular differentiation by caspase-dependent degradation of stem cell factors. *PLoS ONE* 5:e10726.
- Nakano T, Hozumi Y, Ali H, Saino-Saito S, Kamii H, Sato S, Kayama T, Watanabe M, Kondo H, Goto K (2006) Diacylglycerol kinase zeta is involved in the process of cerebral infarction. *Eur J Neurosci* 23:1427-1435.
- Nardini M, Dijkstra BW (1999) Alpha/beta hydrolase fold enzymes: The family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9:732-737.
- Navia-Paldanius D, Savinainen JR, Laitinen JT (2012) Biochemical and pharmacological characterization of human α/β -hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *J Lipid Res* 53:2413-2424.

BIBLIOGRAFIA

- Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G (2001) Gamma -secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294:2179-2181.
- Nomura DK, Morrison BE, Blankman JL, Long JZ, Kinsey SG, Marcondes MCG, Ward AM, Hahn YK, Lichtman AH, Conti B, Cravatt BF (2011) Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science* 334:809-813.
- O'Banion MK (1999) Cyclooxygenase-2: Molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* 13:45-82.
- O'Carroll SJ, Mitchell MD, Faenza I, Cocco L, Gilmour RS (2009) Nuclear PLCbeta1 is required for 3T3-L1 adipocyte differentiation and regulates expression of the cyclin D3-cdk4 complex. *Cell Signal* 21:926-935.
- Osborne SL, Thomas CL, Gschmeissner S, Schiavo G (2001) Nuclear PtdIns(4,5)P2 assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J Cell Sci* 114:2501-2511.
- Oudin MJ, Gajendra S, Williams G, Hobbs C, Lalli G, Doherty P (2011) Endocannabinoids regulate the migration of subventricular zone-derived neuroblasts in the postnatal brain. *J Neurosci* 31:4000-4011.
- Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I (2006) Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *Faseb J* 20:2405-2407.
- Payraastre B, Nievers M, Boonstra J, Breton M, Verkleij AJ, Van Bergen en Henegouwen, P M (1992) A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J Biol Chem* 267:5078-5084.
- Pedicord DL, Flynn MJ, Fanslau C, Miranda M, Hunihan L, Robertson BJ, Pearce BC, Yu X, Westphal RS, Blat Y (2011) Molecular characterization and identification of surrogate substrates for diacylglycerol lipase α . *Biochem Biophys Res Commun* 411:809-814.
- Pérez Roque ME, Pasquaré SJ, Castagnet PI, Giusto NM (1998) Can phosphorylation and dephosphorylation of rod outer segment membranes affect phosphatidate phosphohydrolase and diacylglycerol lipase activities? *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol* 119:85-93.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873-884.
- Porter AC, Sauer J, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1020-1024.
- Powis G, Seewald MJ, Gratas C, Melder D, Riebow J, Modest EJ (1992) Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. *Cancer Res* 52:2835-2840.

BIBLIOGRAFIA

- Prescott SM, Majerus PW (1983) Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *J Biol Chem* 258:764-769.
- Raman P, Kaplan BLF, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE (2011) 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-glycerol ester, a putative metabolite of 2-arachidonoyl glycerol, activates peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Mol Pharmacol* 80:201-209.
- Ramazzotti G, Faenza I, Gaboardi GC, Piazzini M, Bavelloni A, Fiume R, Manzoli L, Martelli AM, Cocco L (2008) Catalytic activity of nuclear PLC- β 1 is required for its signalling function during C2C12 differentiation. *Cellular Signalling* 20:2013-2021.
- Reisenberg M, Singh PK, Williams G, Doherty P (2012) The diacylglycerol lipases: Structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond , B, Biol Sci* 367:3264-3275.
- Ren X, Harms JS, Splitter GA (2001) Bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22 interacts with histones, and the carboxyl terminus of VP22 is required for nuclear localization. *J Virol* 75:8251-8258.
- Resh MD (2006) Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci STKE* 2006:re14.
- Richon VM, Lyle RE, McGehee RE (1997) Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 272:10117-10124.
- Rikova K et al (2007) Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131:1190-1203.
- Rimmerman N, Hughes HV, Bradshaw HB, Pazos MX, Mackie K, Prieto AL, Walker JM (2008) Compartmentalization of endocannabinoids into lipid rafts in a dorsal root ganglion cell line. *Br J Pharmacol* 153:380-389.
- Rosenberger TA, Farooqui AA, Horrocks LA (2007) Bovine brain diacylglycerol lipase: Substrate specificity and activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Lipids* 42:187-195.
- Ross CA, MacCumber MW, Glatt CE, Snyder SH (1989) Brain phospholipase C isozymes: Differential mRNA localizations by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2923-2927.
- Saario SM, Savinainen JR, Laitinen JT, Järvinen T, Niemi R (2004) Monoglyceride lipase-like enzymatic activity is responsible for hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes. *Biochem Pharmacol* 67:1381-1387.
- Saario SM, Salo OMH, Nevalainen T, Poso A, Laitinen JT, Järvinen T, Niemi R (2005) Characterization of the sulfhydryl-sensitive site in the enzyme responsible for hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes. *Chem Biol* 12:649-656.

BIBLIOGRAFIA

- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R (2011) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472:466-470.
- Sallés J, Wallace MA, Fain JN (1993a) Differential effects of alkylating agents on the multiple muscarinic receptor subtypes linked to activation of phospholipase C by carbachol in rat brain cortical membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 264:521-529.
- Sallés J, Wallace MA, Fain JN (1993b) Modulation of the phospholipase C activity in rat brain cortical membranes by simultaneous activation of distinct monoaminergic and cholinergic muscarinic receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 20:111-117.
- Sanchez-Heras E, Howell FV, Williams G, Doherty P (2006) The fibroblast growth factor receptor acid box is essential for interactions with N-cadherin and all of the major isoforms of neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 281:35208-35216.
- Sang N, Zhang J, Chen C (2007) COX-2 oxidative metabolite of endocannabinoid 2-AG enhances excitatory glutamatergic synaptic transmission and induces neurotoxicity. *J Neurochem* 102:1966-1977.
- Sarruf DA, Iankova I, Abella A, Assou S, Miard S, Fajas L (2005) Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 25:9985-9995.
- Savinainen JR, Saario SM, Laitinen JT (2012) The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol (Oxf)* 204:267-276.
- Schlosburg JE, Blankman JL, Long JZ, Nomura DK, Pan B, Kinsey SG, Nguyen PT, Ramesh D, Booker L, Burston JJ, Thomas EA, Selley DE, Sim-Selley LJ, Liu Q, Lichtman AH, Cravatt BF (2010) Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13:1113-1119.
- Schulte K, Steingrüber N, Jergas B, Redmer A, Kurz CM, Buchalla R, Lutz B, Zimmer A, Schlicker E (2012) Cannabinoid CB1 receptor activation, pharmacological blockade, or genetic ablation affects the function of the muscarinic auto- and heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 385:385-396.
- Shimizu T, Tanaka K, Yokotani K (2013) Stimulatory and inhibitory roles of brain 2-arachidonoylglycerol in bombesin-induced central activation of adrenomedullary outflow in rats. *J Pharmacol Sci* 121:157-171.
- Shiraishi-Yamaguchi Y, Furuichi T (2007) The homer family proteins. *Genome Biol* 8:206.
- Shonesy BC, Wang X, Rose KL, Ramikie TS, Cavener VS, Rentz T, Baucum AJ, Jalan-Sakrikar N, Mackie K, Winder DG, Patel S, Colbran RJ (2013) CaMKII regulates diacylglycerol lipase- α and striatal endocannabinoid signaling. *Nat Neurosci* 16:456-463.
- Smotrys JE, Linder ME (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: Regulation and function. *Annu Rev Biochem* 73:559-587.

BIBLIOGRAFIA

- Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Sternweis PC (1991) Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified gq. *Science*, Science (New York, N Y), Science Science, Science,, Science , Sciencee, SCIENCES 251:804-807.
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130:843-852.
- Somanathan S, Stachowiak EK, Siegel AJ, Stachowiak MK, Berezney R (2003) Nuclear matrix bound fibroblast growth factor receptor is associated with splicing factor rich and transcriptionally active nuclear speckles. *J Cell Biochem* 90:856-869.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388:773-778.
- Straiker A, Mackie K (2009) Cannabinoid signaling in inhibitory autaptic hippocampal neurons. *Neuroscience* 163:190-201.
- Straiker A, Wager-Miller J, Hu S, Blankman J, Cravatt B, Mackie K (2011) COX-2 and fatty acid amide hydrolase can regulate the time course of depolarization-induced suppression of excitation. *British Journal of Pharmacology (Oxford, UK)* 164:1672-1683.
- Straiker A, Min K, Mackie K (2013) Fmr1 deletion enhances and ultimately desensitizes CB(1) signaling in autaptic hippocampal neurons. *Neurobiology of Disease (United States)* 56:1.
- Straiker A, Wager-Miller J, Mackie K (2012) The CB1 cannabinoid receptor C-terminus regulates receptor desensitization in autaptic hippocampal neurones. *Br J Pharmacol* 165:2652-2659.
- Suárez J, Ortíz O, Puente N, Bermúdez-Silva FJ, Blanco E, Fernández-Llebrez P, Grandes P, de Fonseca FR, Moratalla R (2011) Distribution of diacylglycerol lipase alpha, an endocannabinoid synthesizing enzyme, in the rat forebrain. *Neuroscience* 192:112-131.
- Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Miyashita T, Kondo S, Suhara Y, Takayama H, Waku K, Seki C, Baba N, Ishima Y (1999) Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J Biol Chem* 274:2794-2801.
- Sugiura T, Waku K (2002) Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J Biochem* 132:7-12.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 45:405-446.
- Sun B, Murray NR, Fields AP (1997) A role for nuclear phosphatidylinositol-specific phospholipase C in the G2/M phase transition. *J Biol Chem* 272:26313-26317.
- Sun H, Huang Y, Yu X, Li Y, Yang J, Li R, Deng Y, Zhao G (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, rosiglitazone, suppresses CD40 expression and attenuates inflammatory responses after lithium pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Int J Dev Neurosci* 26:505-515.

BIBLIOGRAFIA

- Sun L, Sun Q, Qi J (2017) Adult hippocampal neurogenesis: An important target associated with antidepressant effects of exercise. *Rev Neurosci* .
- Surh Y, Na H, Park J, Lee H, Kim W, Yoon I, Kim D (2011) 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochemical Pharmacology* 82:1335-1351.
- Sutherland CA, Amin D (1982) Relative activities of rat and dog platelet phospholipase A₂ and diglyceride lipase. selective inhibition of diglyceride lipase by RHC 80267. *J Biol Chem* 257:14006-14010.
- Szabo B, Urbanski MJ, Bisogno T, Di Marzo V, Mendiguren A, Baer WU, Freiman I (2006) Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the mouse cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol (Lond)* 577:263-280.
- Tabellini G, Bortul R, Santi S, Riccio M, Baldini G, Cappellini A, Billi AM, Berezney R, Ruggeri A, Cocco L, Martelli AM (2003) Diacylglycerol kinase-theta is localized in the speckle domains of the nucleus. *Exp Cell Res* 287:143-154.
- Tanaka O, Kondo H (1994) Localization of mRNAs for three novel members (β 3, β 4 and γ 2) of phospholipase C family in mature rat brain. *Neuroscience Letters* 182:17-20.
- Tanaka T, Okada M, Hozumi Y, Tachibana K, Kitanaka C, Hamamoto Y, Martelli AM, Topham MK, Iino M, Goto K (2013) Cytoplasmic localization of DGK ζ exerts a protective effect against p53-mediated cytotoxicity. *J Cell Sci* 126:2785-2797.
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimoto Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M (2010) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* 65:320-327.
- Thompson RJ (1973) Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex. *J Neurochem* 21:19-40.
- Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M (2007) Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci* 27:3663-3676.
- van der Wel T, Janssen FJ, Baggelaar MP, Deng H, den Dulk H, Overkleeft HS, van der Stelt M (2015) A natural substrate-based fluorescence assay for inhibitor screening on diacylglycerol lipase α . *J Lipid Res* 56:927-935.
- Vellani V, Petrosino S, De Petrocellis L, Valenti M, Prandini M, Magherini PC, McNaughton PA, Di Marzo V (2008) Functional lipidomics. calcium-independent activation of endocannabinoid/endovanilloid lipid signalling in sensory neurons by protein kinases C and A and thrombin. *Neuropharmacology* 55:1274-1279.
- Wallace BG, Qu Z, Huganir RL (1991) Agrin induces phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 6:869-878.

BIBLIOGRAFIA

- Wang Y, Du D, Fang L, Yang G, Zhang C, Zeng R, Ullrich A, Lottspeich F, Chen Z (2006) Tyrosine phosphorylated Par3 regulates epithelial tight junction assembly promoted by EGFR signaling. *Embo J* 25:5058-5070.
- Wang Y, Hung M (2012) Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell & Bioscience* 2:.
- Wang Y, Yamaguchi H, Huo L, Du Y, Lee H, Lee H, Wang H, Hsu J, Hung M (2010) The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. *J Biol Chem* 285:38720-38729.
- Watanabe M, Nakamura M, Sato K, Kano M, Simon MI, Inoue Y (1998) Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase cbeta in mouse brain. *Eur J Neurosci* 10:2016-2025.
- Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A (2008) The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci* 38:89-97.
- Williams EJ, Mittal B, Walsh FS, Doherty P (1995) FGF inhibits neurite outgrowth over monolayers of astrocytes and fibroblasts expressing transfected cell adhesion molecules. *J Cell Sci* 108 (Pt 11):3523-3530.
- Williams E, Walsh FS, Doherty P (2003) The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. *J Cell Biol* 160:481-486.
- Won Y, Puhl HL, Ikeda SR (2009) Molecular reconstruction of mGluR5a-mediated endocannabinoid signaling cascade in single rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 29:13603-13612.
- Wu C, Zhu J, Wager-Miller J, Wang S, O'Leary D, Monory K, Lutz B, Mackie K, Lu H (2010) Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci* 32:693-706.
- Xu A, Wang Y, Xu LY, Gilmour RS (2001a) Protein kinase C alpha -mediated negative feedback regulation is responsible for the termination of insulin-like growth factor I-induced activation of nuclear phospholipase C beta1 in swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 276:14980-14986.
- Xu A, Suh P, Marmy-Conus N, Pearson RB, Seok OY, Cocco L, Gilmour RS (2001b) Phosphorylation of nuclear phospholipase C β 1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* 21:2981-2990.
- Yáñez-Mó M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdés M, Sánchez-Madrid F (2009) Tetraspanin-enriched microdomains: A functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol* 19:434-446.
- Yang W, Di Vizio D, Kirchner M, Steen H, Freeman MR (2010) Proteome scale characterization of human S-acylated proteins in lipid raft-enriched and non-raft membranes. *Mol Cell Proteomics* 9:54-70.

BIBLIOGRAFIA

- Yang X, Yang H, Xie Q, Liu X, Hu X (2009) Peripheral inflammation increased the synaptic expression of NMDA receptors in spinal dorsal horn. *Pain* 144:162-169.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M (2006) Localization of diacylglycerol lipase-alpha around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* 26:4740-4751.
- Zhao W, Wang L, Zhang M, Wang P, Zhang L, Yuan C, Qi J, Qiao Y, Kuo PC, Gao C (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma negatively regulates IFN-beta production in toll-like receptor (TLR) 3- and TLR4-stimulated macrophages by preventing interferon regulatory factor 3 binding to the IFN-beta promoter. *J Biol Chem* 286:5519-5528.
- Zhou D, Song ZH (2001) CB1 cannabinoid receptor-mediated neurite remodeling in mouse neuroblastoma N1E-115 cells. *J Neurosci Res* 65:346-353.

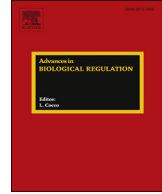
IX. ERANSKINAK



Contents lists available at ScienceDirect

Advances in Biological Regulation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbior



Nuclear phospholipase C- β 1 and diacylglycerol LIPASE- α in brain cortical neurons



Gontzal García del Caño ^a, Mario Montaña ^{b, c},
Xabier Aretxabala ^a, Imanol González-Burguera ^b,
Maider López de Jesús ^{b, c}, Sergio Barrondo ^{b, c}, Joan Sallés ^{b, c, *}

^a Departamento de Neurociencias, Facultad de Farmacia (Vitoria-Gasteiz), Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Spain

^b Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia (Vitoria-Gasteiz), Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Spain

^c CIBERSAM, Spain

A B S T R A C T

Phosphoinositide (PtdIns) signaling involves the generation of lipid second messengers in response to stimuli in a receptor-mediated manner at the plasma membrane. In neuronal cells of adult brain, the standard model proposes that activation of metabotropic receptors coupled to Phospholipase C- β 1 (PLC- β 1) is linked to endocannabinoid signaling through the production of diacylglycerol (DAG), which could be systematically metabolized by 1,2-diacylglycerol Lipases (DAGL) to produce an increase of 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG), the most abundant endocannabinoid in the brain. However, the existence of a nuclear PtdIns metabolism independent from that occurring elsewhere in the cell is now widely accepted, suggesting that the nucleus constitutes both a functional and a distinct compartment for PtdIns metabolism. In this review, we shall highlight the main achievements in the field of neuronal nuclear inositol lipid metabolism with particular attention to progress made linked to the 2-AG biosynthesis. Our aim has been to identify potential sites of 2-AG synthesis other than the neuronal cytoplasmic compartment by determining the subcellular localization of PLC- β 1 and DAGL- α , which is much more abundant than DAGL- β in brain. Our data show that PLC- β 1 and DAGL- α are detected in discrete brain

* Corresponding author. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), C/. Paseo de la Universidad, 7, 01006-Vitoria-Gasteiz, Spain. Fax: +34 945 013223.

E-mail address: joan.salles@ehu.es (J. Sallés).

regions, with a marked predominance of pyramidal morphologies of positive cortical cells, consistent with their role in the biosynthesis and release of 2-AG by pyramidal neurons to control their synaptic inputs. However, as novelty, we showed here an integrated description of the localization of PLC- β 1 and DAGL- α in the neuronal nuclear compartment. We discuss our comparative analysis of the expression patterns of PLC- β 1 and DAGL- α , providing some insight into the potential autocrine role of 2-AG production in the neuronal nuclear compartment that probably subserve additional roles to the recognized activation of the CB1 cannabinoid receptor.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The PLC- β family plays a pivotal role in the transmembrane signal transduction pathways by catalyzing the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdInsP₂) to yield two prominent intracellular second messengers diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃), in response to the interaction of various ligands with cell surface heptahelical receptors coupled to G_{q/11} family of heterotrimeric G proteins, in most eukaryotic cells (Rhee, 2001).

In the rodent brain, mRNA of each PLC- β family member displays distinct, largely reciprocal expression; PLC- β ₁ mRNA in the telencephalon, PLC- β ₂ in the white matter, PLC- β ₃ in the caudal cerebellum and PLC- β ₄ in the rostral cerebellum and brainstem (Ross et al., 1989; Tanaka and Kondo, 1994; Watanabe et al., 1998a). By Northern blot, and PCR analysis of embryonic and adult rodent and human tissues, it has been detected the expression of PLC- β ₁ in all adult rat and human tissues tested, at varying relative levels (Caricasole et al., 2000; Peruzzi et al., 2002). Typically, higher signal intensities were observed in some CNS areas, such cerebral cortex, amygdala, caudate nucleus and hippocampus (Caricasole et al., 2000; Peruzzi et al., 2002). From a chronological point of view, after the establishment of the PLC- β ₁ knockout mice by Kim et al. (1997), several physiological and behavioral studies have demonstrated that PLC- β ₁(-/-) animals would seem to mirror clinically important situations related with the inhibitory neuronal circuitry of the CNS. To date, it has been claimed the use of PLC- β ₁ knockout mice as an animal model of epilepsy (Kim et al., 1997), and as a mouse model of schizophrenia (Koh et al., 2008; McOmish et al., 2008a, 2008b). It is notable that losses of PLC- β ₁ are found in patients with neurological or psychiatric disorders such as epileptic encephalopathies and schizophrenics which are recapitulated in knock-out mice (Kurian et al., 2010; Udawela et al., 2011; Lo Vasco et al., 2012). Indeed, previous results showing a derangement of the PLC- β ₁ signaling pathway in the brains of patients with schizophrenia (Lin et al., 1999; Shirakawa et al., 2001), inspired the examination of any phenotypes related to symptoms of schizophrenia in PLC- β ₁ knockout mice (Koh et al., 2008; McOmish et al., 2008a, 2008b). This knockout mouse exhibits symptoms similar to human schizophrenia such as locomotor hyperactivity, impaired prepulse inhibition of the startle response, lack of barbering and nesting behaviors, socially subordinate status, impaired learning, and lack of type II theta rhythm which has been implicated in working memory (Koh et al., 2008; McOmish et al., 2008a, b). More importantly, clozapine but not haloperidol (atypical and typical antipsychotics, respectively) rescues the sensorimotor gating deficit in these animals, suggesting selective predictive validity to the animal model (McOmish et al., 2008b). Furthermore, PLC- β ₁ knockout animals showed hypersensitivity for both hot and cold thermal stimuli, and their use could model clinically important situations related to opioid tolerance development (Liu et al., 2006).

As will be discussed later, PLC- β ₁ and diacylglycerol lipase α (DAGL- α) are key elements in endocannabinoid release from postsynaptic neurons, and PLC- β ₁ can serve as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal in hippocampal and cortical neurons (Hashimoto-dani et al., 2005). Therefore, the possibility that the disruption of the PLC- β ₁ mediated signal transduction pathway may lead to a functional endocannabinoid “denervation” and in consequence, epileptiform hyperexcitability has driven the study of the precise anatomical position of CB1 cannabinoid receptors, PLC- β ₁ and of DAGL- α at the excitatory synapse in most brain areas

(Katona et al., 2006; Yoshida et al., 2006; Uchigashima et al., 2007; Lafourcade et al., 2008; Fukaya et al., 2008; Montaña et al., 2012).

Traditionally, in the CNS the PtdIns cycle and PLC- β_1 activity have been thought to be associated with the plasma membrane. However, over the past twenty years it has become increasingly apparent that PLC- β_1 also operates in the nucleus and modulates mitogenesis and cell cycle progression in a number of cell types (Faenza et al., 2008). Therefore, additional efforts must be made to characterize the presence of PLC- β_1 in nuclear fractions of cells of neural origin (neuron and glia), and to establish its role in the regulation of neuronal differentiation and the survival of the postmitotic mature neuron.

Topics

Role of PLC- β_1 in the control of neuronal excitability

In the CNS, neurotransmitter receptor coupling to PLC- β has been extensively documented in [3 H]-inositol-labeled brain slices, synaptosomes and/or primary culture of neurons from selected CNS areas obtained from animals (Gonzales and Crews, 1984, 1985; Fisher and Bartus, 1985; Kendall and Nahorski, 1985; Fisher and Agranoff, 1987; Sallés et al., 1989; Forray and El-Fakahani, 1990). However, it should be borne in mind that, although intact cellular systems are useful tools to assess the presence of this signal transduction system, the response to agonists could reflect either the sequential coupling of the three elements of the pathway (receptor/ $G\alpha_q$ /PLC- β), or the PLC activation secondary to calcium entry induced by direct receptor gating, depolarization and so forth (Wallace et al., 1991). By using washed mammalian brain (rodents and humans) membrane preparations and exogenous phosphoinositides as substrates, it is possible to show the direct coupling of G-proteins, M_1/M_3 muscarinic acetylcholine and 5-HT $_2$ serotonin receptors to PLC- β (Claro et al., 1989; Wallace and Claro, 1990; Wallace et al., 1991; Sallés et al., 1993a, 1993b; Wallace and Claro, 1993; Garro et al., 2001). Thus, examination of PLC- β activity in post-mortem human brain membranes with exogenous substrates is currently one of the best available methods for examining the functionality of neurotransmitter systems that directly affect PLC- β in the human brain (Wallace et al., 1991). Actually, the expression of all PLC- β isoforms and $G\alpha_q$ subunits, and PLC- β activity stimulated by guanine nucleotides and agonists in plasma membranes of human brain, has been established (Garro et al., 2001; López de Jesús et al., 2006; Ruiz de Azúa et al., 2006). Collectively, the functional changes observed in PLC- β activity between regions of human brain could be matched by specific changes in the protein levels of PLC- β_1 isoform, suggesting that PLC- β_1 levels rather than the availability of $G\alpha_q$ subunits may limit the rate of phosphoinositide hydrolysis (López de Jesús et al., 2006; Ruiz de Azúa et al., 2006). In transgenic mice (PLC- β_1 knockout), it has been shown that PLC- β_1 , but not PLC- β_4 , is involved in signal transduction in the cerebral cortex by coupling predominantly to the muscarinic acetylcholine receptors (Kim et al., 1997). Again, these results are reflecting the predominant presence of PLC- β_1 over other members of the PLC- β family in mammalian brain cortex (Watanabe et al., 1998a; Ruiz de Azúa et al., 2001; López de Jesús et al., 2006).

DAGLs catalyze the hydrolysis of diacylglycerol (DAG) to 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG), the most abundant endogenous agonist of the CB1 cannabinoid receptor. Despite both DAGL- α and DAGL- β isoforms are expressed in the mammalian central nervous system, DAGL- α is the major responsible for 2-AG synthesis in nervous tissue as shown by measurement of 2-AG production after selective knocking down of DAGL- α and DAGL- β proteins (Gao et al., 2010). Ultrastructural analyses show that, in a subset of glutamatergic synapses, DAGL- α is located perisynaptically around the postsynaptic density (Yoshida et al., 2006). The presence of the type I metabotropic glutamate receptors and the downstream DAG-producing effector PLC- β_1 in the same subdomain has led to hypothesize the existence of a postsynaptic retrograde 2-AG signaling complex that regulates glutamatergic neurotransmission. Interestingly, PLC- β_1 can serve as a coincidence detector through its Ca^{2+} dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal in hippocampal neurons (Hashimotodani et al., 2005). The 2-AG release is triggered by either depolarization or activation of $Gq/11$ -coupled receptors such as group I metabotropic glutamate receptors (mGluRs) (Ohno-Shosaku et al., 2002) and M_1/M_3 muscarinic receptors (Fukudome et al., 2004). Importantly, the 2-AG release is markedly facilitated when depolarization is combined with the activation of these receptors (Ohno-Shosaku et al., 2002; Kim et al., 2002),

and this endocannabinoid release is absent in PLC- β_1 ($-/-$) knockout mice (Hashimotodani et al., 2005). Therefore, PLC- β_1 is able to integrate two separate signals, namely depolarization and receptor activation, for induction of 2-AG release, and may contribute to the proper maintenance of the brain inhibitory circuitries (Hashimotodani et al., 2005). Interestingly, $G\alpha_{q/11}$ ($-/-$) knockout mice exhibits a similar phenotype (increased seizure susceptibility) with reduced endocannabinoid levels under basal and excitotoxic conditions (kainic acid administration) (Wettschurek et al., 2006).

In the last five years, the description of the distribution of the PLC- β_1 isoform, the phenotype of PLC- β_1 -expressing cells, and its neuronal subcellular localization as assessed by double-immunofluorescence staining of rat brain sections and confocal laser scanning and by electron microscopy has been reported (Fukaya et al., 2008; Montaña et al., 2012). Immunohistochemical labeling revealed a considerable morphological heterogeneity among PLC- β_1 -positive cells in the cortex, even though there was a marked predominance of pyramidal morphologies (Fukaya et al., 2008; Montaña et al., 2012). Furthermore, the high anatomical resolution achieved in our immunohistochemical analysis allowed to observe a high overlap between PSD-95 and PLC- β_1 signals in the cerebral cortex, thus confirming a well defined subcellular location for PLC- β_1 , which previously could be only demonstrated by western blot analysis of subcellular fractions (Taguchi et al., 2007) or electron microscopy (Fukaya et al., 2008). A reasonable explanation of this is that our fixation method may have exposed epitopes localized to the postsynaptic densities. In this regards, several evidences indicate that postsynaptic density proteins are inaccessible to antibodies due to limited penetration (Fritschy et al., 1998; Watanabe et al., 1998b) and, in fact, Fukaya et al. (2008) could detect PLC- β_1 at postsynaptic densities only by postembedding immunogold, whereas they were unable to demonstrate a clear postsynaptic membrane labeling in free floating sections. In agreement with evidence that PLC- β_1 is mostly located at postsynaptic sites (Fukaya et al., 2008) and with its apparent absence from the PSD-95 complex (Dosemeci et al., 2007), the intensity levels of PLC- β_1 and PSD-95 signals were not correlated each to other, as expected for two proteins that do not interact despite their close proximity. PSD-95 is the archetypal protein of the postsynaptic density at excitatory synapses on glutamatergic neurons (Feng and Zhang, 2009), and is in a good position to interact with postsynaptic membrane proteins and to regulate their activity. For instance, Xia et al. (2003) showed that serotonin-induced PLC activation is significantly enhanced by interactions between 5-HT_{2A} receptors and PSD-95 (Xia et al., 2003), although they did not show a direct interaction between PSD-95 and PLC- β_1 . Although, probably the extreme C-terminal 4 amino acids of PLC- β_1 form a PDZ-binding motif (Kim et al., 2011) that could be recognized by PDZ-domain-containing scaffold proteins concentrated at the top of dendritic spines, like PSD-95 and the Src-homology domain 3 (SH3) and multiple ankyrin repeat domains (Shank) family (Feeng and Zhang, 2009), the factor(s) responsible for the location of PLC- β_1 at the postsynaptic density still remains open.

Collectively, these precise neuroanatomical data confirm and extend those of the localization of the molecular components of the endocannabinoid system at the excitatory synapse of most brain areas: presynaptic CB₁ cannabinoid receptors are localized to dendritic apparatus, presumably glutamatergic synapses, expressing PLC- β_1 and DAGL- α (see Fig. 1) (Katona et al., 2006; Uchigashima et al., 2007; Lafourcade et al., 2008; Fukaya et al., 2008; Montaña et al., 2012).

Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdInsP₂)

In addition to being the precursor of IP₃ and DAG, PtdInsP₂ complexes with and regulates many cytoplasmic and membrane proteins (Suh and Hille, 2005). Recent work has characterized the regulation of a wide range of ion channels by PtdInsP₂, helping to redefine the role of this lipid in cells and neurobiology. In most cases, PtdInsP₂ increases channel activity and its hydrolysis by PLC- β reduces channel activity (Suh and Hille, 2005). Ion channels reported to be activated by PtdInsP₂ include all inward rectifier potassium channels (Suh and Hille, 2005). It must be borne in mind that inwardly rectifying potassium channels have dominant control of the membrane potential of mammalian neurons, and therefore, modulation of their activity can profoundly influence neuronal excitability (Jan and Jan, 1997). A major signal transduction mechanism in neurobiology is the direct coupling of metabotropic receptors to ion channels by a membrane-delimited pathway that does not involve cytoplasmic intermediates (Nicoll, 1988; Neer, 1995). Inwardly rectifying potassium channels fall into

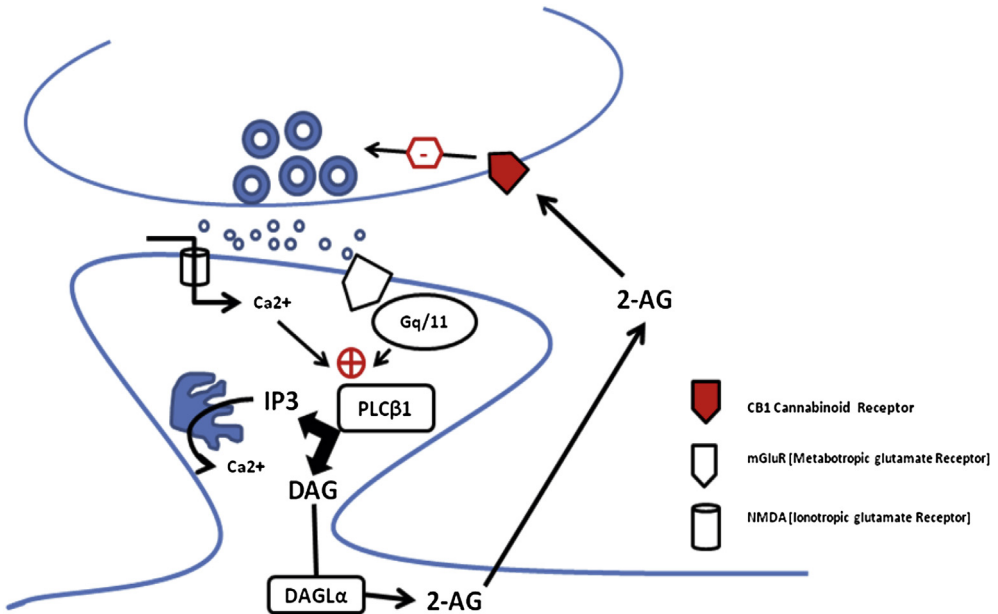


Fig. 1. 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) biosynthesis and synaptic plasticity at cortical and hippocampal pyramidal neurons as deduced from molecular localization reported previously (Katona et al., 2006; Yoshida et al., 2006; Lafourcade et al., 2008). Synthesis involves a rapid production of 2-AG, which, in this example, is triggered by activation of mGluRs in the postsynaptic neuron. mGluRs, via Gq/11 proteins, activates phospholipase C- β 1 (PLC- β 1) dependent increase in intracellular Ca $^{2+}$ (mobilized from intracellular stores by inositol 1,4,5-trisphosphate -IP $_3$ -) and diacylglycerol (DAG) mobilization. Furthermore, the depolarization dependent Ca $^{2+}$ entry from the extracellular space by the activation of glutamate ionotropic receptors, further stimulates PLC- β 1 activity. Finally, 2-AG is synthesized mainly by Diacylglycerol lipase- α (DAGL- α) acting on DAG, and leads to its release from the postsynaptic neuron. 2-AG activates CB1 cannabinoid receptors expressed on axon terminals, which ultimately suppress either GABA or glutamate release and trigger short- and long-term forms of synaptic plasticity.

seven subfamilies, and include a subfamily designated as Kir3 that is directly coupled to heterotrimeric G-proteins and mediates the effect of activated metabotropic receptors (Dascal, 1997). Activation of metabotropic receptors coupled to G $_{i/o}$ proteins catalyzes the release of G $\beta\gamma$ subunits and this dimer directly interacts with Kir3 channels to increase their open probability (Logothetis et al., 1987). It has already been proved that, in mammalian neurons and in *Xenopus* oocytes, Kir3 channels can be activated by neurotransmitters through G $_{i/o}$ -protein coupled receptors (GPCR) such as the serotonin 5-HT $_{1A}$, dopamine D $_2$, α_2 -adrenergic, GABA $_B$, cannabinoid CB $_1$ and opioid receptors (Dascal, 1997; Suh and Hille, 2005). Moreover, Kir3 knockout mice have revealed important roles for GIRK channels in the generation of inhibitory postsynaptic potentials in hippocampal and cerebellar neurons, where they serve as a common effector for the neurotransmitters commented above (Suh and Hille, 2005). Therefore, Kir3 channels provide an important mechanism for the slow inhibitory modulation of cellular excitability in heart and brain by neurotransmitters coupled to G $_{i/o}$ proteins. This subfamily of inward rectifiers, also known as the G protein-regulated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels, is composed of four members designated GIRK1–4 (Dascal, 1997). Although the different GIRK subunits are regulated differentially by a variety of intracellular factors, reports indicate that these channels require membrane PtdInsP $_2$ for activity (Huang et al., 1998; Sui et al., 1998). The levels of PtdInsP $_2$ can be changed and *per se* acts as a novel signal to regulate GIRK channels. Moreover, the functional dependence of G $\beta\gamma$ signaling on PtdInsP $_2$ levels predicts the possible cross-talk of different metabotropic receptors (G $_{i/o}$ - versus G $_{q/11}$ -coupled receptors). In fact, GIRK channels are inhibited by activation of metabotropic receptors coupled to G $_{q/11}$ proteins and PLC- β via local PtdInsP $_2$ depletion (Cho et al., 2005) (Fig. 2). The results obtained in cardiomyocytes cannot be directly extrapolated to other cell types. Data obtained from rat hippocampus suggest that GIRK channel activity is dependent

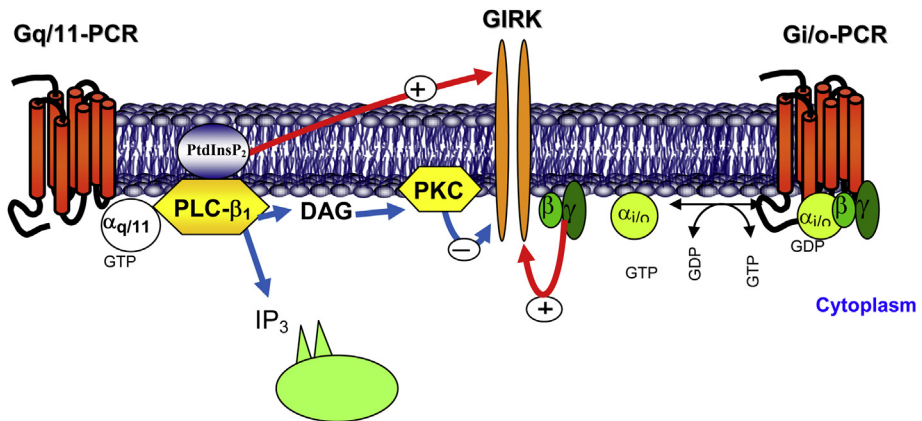


Fig. 2. PLC- β_1 regulation of G Protein-Coupled Inwardly Rectifying K⁺ channels (GIRKs) through the modulation of PtdInsP₂ levels, and its cross-talk with Gi/o protein coupled receptors (Gi/o-PCRs).

both on membrane PtdInsP₂ levels and PKC activity, since PKC phosphorylates the channel causing a reduction in PtdInsP₂-channel interaction (Sohn et al., 2007). In fact, although in PLC- β_1 (-/-) knockout mice, the effect of carbachol (muscarinic agonist) on inwardly rectifying K⁺ current was significantly reduced, the carbachol inhibition of GIRK currents can be suppressed by blocking PKC signaling pathways (Sohn et al., 2007).

Role of PLC- β_1 during mammalian brain development

A prominent feature of the analysis of expression and functional activity of PLC- β_1 (mRNA and protein) in human fetal and adult brain cortex is that it is highly expressed in adult but almost absent in fetal cortex (Caricasole et al., 2000; Peruzzi et al., 2002; Ruiz de Azúa et al., 2006). The difference of expression and functional activity that it is evident between prenatal and postnatal brain cortex could hint at a role of PLC- β_1 during brain development. Moreover, given the importance of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression [i.e. by methylation, see Follo et al. (2013)], it will be desirable to study the effects of covalent modification of nucleotides placed on the promoter region of the human PLCB1 gene.

The implication of PLC- β_1 signaling pathway, activated by metabotropic receptors (i.e. mGluRs), in activity-dependent development of the cerebral cortex has been demonstrated in PLC- β_1 (-/-) knockout mice (Hannan et al., 2001; Böhm et al., 2002; Spires et al., 2005). Collectively, the PLC- β_1 signaling pathways, activated via type mGluR-I, is implicated in activity-dependent development of the cerebral cortex, as both PLC- β_1 (-/-) and mGluR-5 (-/-) knockout mice exhibit disrupted “barrel” formation in somatosensory cortex. In the rodent primary somatosensory cortex, the configuration of the somatosensory map from the periphery to the neocortex is topographically represented as discrete modules of layer IV granule cells (“barrels”) and thalamo-cortical afferent terminals (Woolsey and Van der Loos, 1970; O’Leary et al., 1994). Each mature barrel consists of a barrel-shaped “wall” of densely-packed neurons, which extend their dendrites into a cell-sparse region in the center of the barrel, known as the barrel “hollow” (Woolsey and Van der Loos, 1970; Woolsey et al., 1975). In each hollow is a dense bundle of axons from the ventroposterior complex of the thalamus, which synapse on the dendrites of the layer IV neurons (Woolsey and Van der Loos, 1970; Woolsey et al., 1975; O’Leary et al., 1994). Several lines of evidence suggest that the morphological reorganization of cortical neurons to form barrels depend, at least in part, on signals conveyed during a critical period in the postnatal development in higher animals (O’Leary et al., 1994; Fox et al., 1996). Therefore, the primary somatosensory cortex of rodents is an ideal system for studying the molecular mechanisms of barrel formation, and furthermore provides an excellent model of the activity-dependent development of cerebral cortex. In this context, to characterize the effects on development of synaptic circuitry in

“barrel” cortex, the neuronal ultrastructure, synapse formation and dendritic spine morphology have been examined in PLC- β_1 ($-/-$) knockout mice (Spires et al., 2005). The authors found a decrease in the proportion of synapses with symmetric morphology at postnatal day 5 that was gone by postnatal day 19, indicating a transient imbalance in excitatory and inhibitory circuitry (Spires et al., 2005). These observations indicate that the PLC- β_1 signaling pathways play a critical role in the coordinated development of the neocortex. Moreover, PLC- β_1 ($-/-$) knockout mice show the development of aberrant mossy fiber projections and neurodegeneration in the hippocampus, which could cause epileptiform hyperexcitability (Böhm et al., 2002).

Another clue for a role of PLC- β family signaling during neuronal differentiation comes from published data showing that $G_{q/11}$ -activated PLC- $\beta_{1/3}$ interacts with cell polarity proteins Par3 and Par6 (Par:partition-defective) (Cai et al., 2005; Kim et al., 2011). A mature neuron is typically polarized both structurally and functionally, with a single axon and several dendrites. Therefore, major signaling cascades involved in neuronal polarization are fundamental traits of neurons during embryonic development and neuronal cell chirality formation. Up to this point, there are two major signaling cascades described involving PIP3-kinase/Akt/GSK-3 β and Rho family of small GTPases and the Par3/Par6/PKC (Yoshimura et al., 2006).

Role of nuclear PLC- β_1 in model cellular systems

In this review, we confine our discussion specifically to those functions associated with the PLC- β_1 isoform, but it should be noted that additional PLCs are present within the nucleus and function in a cell cycle-dependent manner. At present, dissection of the contribution of each PLC isoform to the progression of the cell cycle or the role in the nucleus has been done in a limited number of cell types. For instance, in isolated membrane-free rat liver nuclei, about 60% of the total PLC-activity corresponds to PLC- β_1 (Crljen et al., 2004).

PLC- β_1 is mitogenic, mediating growth factor-stimulated proliferation. In murine erythroleukemia (MEL) cell cultures, PLC- β_1 activity correlates directly with proliferation and inversely with differentiation (Divecha et al., 1995). Endogenous PLC- β_1 activity decreases upon DMSO-induced differentiation of MEL cells. PLC- β_1 opposes differentiation, as transfection of MEL cells to over express wild-type PLC- β_1 attenuates DMSO-induced differentiation of MEL cells (Matteucci et al., 1998). In contrast, transfection of PLC- β_1 lacking a functional NLS (“nuclear localization signal”) has no effect, emphasizing the specific role of nuclear PLC- β_1 in differentiation. PLC- β_1 has also been implicated in rat liver regeneration (Kuriki et al., 1992). Increased nuclear PI-PLC activity was detected during regeneration of rat liver with peak activity preceding increased DNA synthesis. Further analysis determined that PLC- β_1 is present in hepatocyte nuclei, with PLC- β_1 primarily at DNA replication sites within chromatin (Albi et al., 2003). The following observations suggest that PLC- β_1 is one of the major nuclear factors involved in triggering DNA replication. Several groups have convincingly demonstrated that nuclear PLC- β_1 is activated by mitogen-activated protein kinases (MAPK) in response to growth factors (Martelli et al., 2000; Xu et al., 2001a). Stimulation with growth factors including insulin and IGF-1 causes a specific increase in nuclear PLC activity. PLC- β_1 immunoprecipitated from IGF-1-stimulated Swiss 3T3 nuclei is phosphorylated at Ser⁹⁸², located within a “PSSP” MAPK consensus sequence (Xu et al., 2001a). Phosphorylation of PLC- β_1 is prevented by treatment with the ERK inhibitors PD98059 and U0126, implicating the MAPK cascade in nuclear PLC- β_1 activation. Co-immunoprecipitation experiments demonstrated that PLC- β_1 and ERK1/2 interact in the nuclei of IGF-1-stimulated cells, and in vitro protein kinase assays confirmed that activated ERK directly phosphorylates PLC- β_1 . Although there is no obvious catalytic effect, phosphorylation of PLC- β_1 at Ser⁹⁸² is essential for its mitogenic action. On the other hand, phosphorylation of PLC- β_1 at Ser⁸⁸⁷ by PKC α plays a critical role in the termination of the IGF-1-dependent signals in Swiss 3T3 cells (Xu et al., 2001b). Similar results have been demonstrated in HL-60 cells (Lukinovic-Skudar et al., 2005). Interestingly, there is significant experimental evidence linking nuclear PLC- β_1 to cyclins and cyclin-dependent kinases (cdks). Faenza et al. (2000) reported that cyclin D3 and its cognate kinase cdk4, which regulate progression through G1, are themselves modulated by PLC- β_1 . Overexpression of PLC- β_1 is sufficient to induce overexpression of both cyclin D3 and cdk4 in Friend erythroleukemia cells. Overexpression of PLC- β_1 also causes increased phosphorylation of the retinoblastoma tumor suppressor protein (pRb) and activation of the

E2F transcription factor, consistent with enhanced progression through G1. At the molecular level, pRb regulates cell cycle progression through its interaction with the transcription factor E2F. When cells progress to S phase, pRb becomes highly phosphorylated by cyclin/cdk complexes, which leads to the release of E2F, enabling E2F-mediated transcription of genes required for S phase progression (Mittnacht, 1998).

The findings with erythroid differentiation in MEL cells, however, contrast with the pattern of expression of PLC- β_1 seen in other differentiating systems. For example, differentiation of C2C12 murine myoblasts in response to mitogen withdrawal and insulin stimulation is characterized by a marked increase in nuclear PLC- β_1 (Faenza et al., 2003, 2007, 2012). In this case, the timing of PLC- β_1 synthesis and its accumulation in the nucleus precedes that of the late muscle marker Troponin T by 24 h. Furthermore, the expression of a transfected PLC- β_1 mutant lacking the nuclear localization signal acted as a dominant negative for nuclear translocation of PLC- β_1 and suppressed the differentiation of C2C12 myoblasts into multinucleated myotubes (Faenza et al., 2003). More recently, the critical role of both PLC- β_1 and PLC- γ_1 in activating cyclin D3 promoter during the differentiation process has been demonstrated (Faenza et al., 2007). Later, these authors showed that PLC- β_1 catalytic activity was essential for the transduction of differentiating signals elicited by insulin, targeting cyclin D3 promoter through the activation of c-jun/AP1 transcription factor (Ramazzotti et al., 2008). Another clue for a role of nuclear PLC- β_1 signaling during differentiation comes from published data from the same group of research showing that PLC- β_1 up-regulates the expression of CD24, a cell-adhesion antigen involved in differentiation and hematopoiesis, in murine Friend erythroleukemia cells (Fiume et al., 2005).

With respect to DAGL- α , classical biochemical techniques provide evidence about the presence of a diacylglycerol lipase activity in the nucleus of several cellular models. DAG-lipase activity is present in subcellular fractions prepared from LA-N-1 neuroblastoma cell homogenates, and the nuclear fraction had significant DAG- and MAG-lipase activities. These enzymes hydrolyze DAG which is generated in LA-N-1 cells by the action of PLC and PLD on nuclear phospholipids (Antony et al., 2000; Farooqui and Horrocks, 2005). In the nucleus, DAG is also substrate for DAG-kinase (Martelli et al., 2002; Hozumi et al., 2003). Thus nuclear DAG-lipase and DAG-kinase attenuate the DAG generated signal by regulating the amount of nuclear DAG available for the activation of protein kinase C isozymes. These results make plausible that a PLC- β_1 /DAGL- α -dependent machinery for 2-AG synthesis exists in the neuronal nucleus.

With these evidences in mind, we sought to explore whether PLC- β_1 and DAGL- α are actually present in the nucleus of mature neuronal cells. We addressed this issue in adult rat brain cortex by double immunofluorescence staining and confocal laser scanning. In our study, PLC- β_1 and the nuclear speckles markers SC-35 and NeuN/Fox3 (Osborne et al., 2001; Tabellini et al., 2003; Dent et al., 2010) displayed an overlapping pattern, with the proteins being localized to chromatin-poor compartments (Montaña et al., 2012). In contrast, co-localization was faint with Nuclear Pore Complex and Lamin B1, and there were no apparent correlation between the immunofluorescence intensities of both nuclear envelope markers (Montaña et al., 2012). Moreover, PLC- β_1 was also highly expressed in PtdInsP₂-rich regions of neuronal nuclei (Montaña et al., 2012). Finally, to assess whether the subcellular expression pattern of PLC- β_1 involved specifically one of the two splice variants of PLC- β_1 , we carried out western blot experiments in cortical subcellular fractions (Montaña et al., 2012). Clearly, PLC- β_1a was predominant over PLC- β_1b in all the fractions studied, although the relative contribution of each variant to the total signal differed between subcellular compartments (Montaña et al., 2012).

Double immunofluorescence against DAGL- α and the nuclear matrix component NeuN/Fox3, revealed a similar distribution of both markers and a high overlap between DAGL- α - and NeuN/Fox-immunopositive puncta. Similar results were obtained when antibodies against DAGL- α and SC-35 (a nuclear speckle marker) were combined (García del Caño, unpublished results).

Therefore, diverse functions may be envisaged for nuclear PLC- β_1 /DAGL- α and its potential product 2-AG. Further research should shed more light on the multiple emerging roles played by this highly bioactive molecule, as well as on the mechanisms which regulate nuclear DAGL- α in neuronal cells. In conclusion, our results (Montaña et al., 2012; García del Caño, unpublished results), by describing evidence for the presence in the neuronal nuclei of mechanisms for 2-AG production, have provided biochemical grounds for the previous hypotheses that this monoacylglycerol might act as one of the physiological agonists at the nuclear PPAR γ receptor or as a precursor of several types of prostaglandins

(Rockwell et al., 2006; Raman et al., 2012). In fact, recent data identify PPAR γ as a novel molecular target of nuclear PLCs (Fiume et al., 2012). Future studies will have to be aimed at a deeper understanding of the molecular mechanisms underlying both 2-AG formation and its regulation, as well as at clarifying the physiological function of 2-AG in the neuronal nuclear compartment.

Cell cycle re-entry in postmitotic mature neurons

In the central nervous system, after young neuroblasts leave ventricular zone (VZ) or subventricular zone (SVZ), they become permanently post-mitotic cells. The nature of this permanent exit from the cell cycle of a mature neuron is still poorly understood. As discussed previously, the fact is that there are no known tumor that originates from a mature neuronal cell, and therefore the cancers that we refer to as “brain” tumors originate primarily from non-neuronal cells such as astrocytes, oligodendrocytes, and cells of the meninges (Herrup and Yang, 2007). However, cell cycle events have been documented to be associated with several human neurodegenerative diseases, as well as their mouse models (Herrup and Yang, 2007), and there is evidence that neurons which are at risk of neurodegeneration are also at risk of re-initiating a cell cycle process that involves the expression of cell cycle proteins and DNA replication (Herrup and Yang, 2007). For instance, many studies have reported that a wide range of cell cycle proteins, including cell cycle inhibitors, are elevated in neurons in at-risk regions of late stage of Alzheimer disease patients, but not in age-matched controls (Busser et al., 1998; Smith et al., 1999; Hoozemans et al., 2002). The cell cycle proteins whose levels have been reported to increase in AD include cyclin D, E (Busser et al., 1998; Smith et al., 1999; Hoozemans et al., 2002), cdk4 (Busser et al., 1998), cyclin B (Busser et al., 1998), and Ki67 (Smith et al., 1999). Furthermore, as reviewed by Liu et al. (2010) bioinformatic and genomic studies have consistently placed “cell cycle” as among the top ranked functional categories for gene transcripts that are altered in rats one day following any of several types of insults to the central nervous system (e.g. cerebral ischemia, intracerebral hemorrhage, and kainite-induced seizures). Taken together, these findings suggest that post-mitotic neurons are in a state of terminal differentiation and incapable to undergoing cell division. Nevertheless, they might retain certain elements of the cell cycle and have the capability of reactivating additional aspects of the replication mechanisms when under stresses. In other words, any events that force a mature neuron back into the cell cycle are lethal rather than mitogenic for the neuron (Herrup and Yang, 2007). As summarized previously, examples of some mitogenic pathways that overlap and commonly lead to cell cycle re-entry and neuronal death include the following: (1) FAK/Src/Ras/Raf/MEK1,2/ERK1,2; (2) Ras/Rac1/MEK3,6/P38; (3) PLC/IP3/PKC/JNK; (4) PI3K/Akt/mTor/Tau; and (5) JAK/STAT (Liu et al., 2010).

As discussed above, previous studies suggested that the overexpression of the rat cDNA of PLC- β_1 in the nucleus is directly responsible for the overexpression and activation of cyclin D3/cdk4 complex, which stimulates progression through G1 phase and showed how nuclear PLC- β_1 is a key element for the specific regulation of the cyclin D3/cdk4 complex and its downstream targets such as pRb and the transcription factor E2F-1. Therefore, the results obtained with model cell types beg the question of whether there is a common mechanism in place, and strengthens to study the role of nuclear PLC- β_1 in mature postmitotic neurons under several types of brain injuries.

Acknowledgments

This work was supported by grants of Department of Industry and Department of Education of the Basque Government, Spain (SAIOTEK, GIC).

References

- Albi E, Rossi G, Maraldi NM, Magni MV, Cataldi S, Solimando L, et al. Involvement of nuclear phosphatidylinositol-dependent phospholipases C in cell cycle progression during rat liver regeneration. *J Cell Physiol* 2003;197:181–8.
- Antony P, Kanfer JN, Freysz L. Phosphatidylcholine metabolism in nuclei of phorbol ester activated LA-N-1 neuroblastoma cells. *Neurochem Res* 2000;25:1073–82.
- Böhm D, Schwegler H, Kotthaus L, Nayernia K, Rickmann M, Köhler M, et al. Disruption of PLC- β_1 mediated signal transduction in mutant mice causes age-dependent hippocampal mossy fiber sprouting and neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci* 2002; 21:584–601.

- Busser J, Geldmacher DS, Herrup K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer disease brain. *J Neurosci* 1998;18:2801–7.
- Cai Y, Stafford LJ, Bryan BA, Mitchell D, Liu M. G-protein-activated phospholipase C- β , new partners for cell polarity proteins Par3 and Par6. *Oncogene* 2005;24:4293–300.
- Caricasole A, Sala C, Roncarati R, Formenti E, Terstappen GC. Cloning and characterization of the human phosphoinositide-specific phospholipase C- β_1 . *Biochim Biophys Acta* 2000;1517:63–72.
- Cho H, Lee D, Lee SH, Ho WK. Receptor-induced depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits inwardly rectifying K⁺ channels in a receptor-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:4643–8.
- Claro E, Wallace MA, Lee HM, Fain JN. Carbachol in the presence of guanosine 5'-o-(3-thiotriphosphate) stimulates the breakdown of exogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, phosphatidylinositol 4-phosphate, and phosphatidylinositol by rat brain membranes. *J Biol Chem* 1989;264:18288–95.
- Crljen V, Visnjic D, Banfic H. Presence of different phospholipase C isoforms in the nucleus and their activation during compensatory liver growth. *FEBS Lett* 2004;571:35–42.
- Dent MAR, Segura-Anaya E, Alva-Medina J, Aranda-Anzaldo A. NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett* 2010;584:2767–71.
- Divecha N, Letcher AJ, Banfic HH, Rhee SG, Irvine RF. Changes in the components of a nuclear inositol cycle during differentiation in murine erythroleukemia cells. *Biochem J* 1995;312:63–7.
- Dascal N. Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell Signal* 1997;9:551–73.
- Dosemeci A, Makusky AJ, Jankowska-Stephens E, Yang X, Slotta DJ, Markey SP. Composition of the synaptic PSD-95 complex. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1749–60.
- Faenza I, Matteucci A, Manzoli L, Billi AM, Peruzzi D, et al. A role for nuclear phospholipase C- β_1 in cell cycle control. *J Biol Chem* 2000;275:30520–4.
- Faenza I, Bavelloni A, Fiume R, Lattanzi G, Maraldi NM, Gilmour RS, et al. Up-regulation of nuclear PLC- β_1 in myogenic differentiation. *J Cell Physiol* 2003;195:446–52.
- Faenza I, Ramazzotti G, Bavelloni A, Fiume R, Gaboardi GC, Follo MY, et al. Inositol-dependent phospholipase C signaling mimics insulin in skeletal muscle differentiation by affecting specific regions of the cyclin D3 promoter. *Endocrinology* 2007;148:1108–17.
- Faenza I, Bregoli L, Ramazzotti G, Gaboardi G, Follo MY, Mongiorgi S, et al. Nuclear phospholipase C-beta1 and cellular differentiation. *Front Biosci* 2008;13:2452–63.
- Faenza I, Blalock W, Bavelloni A, Schoser B, Fiume R, Pacella S, et al. A role for PLCbeta1 in myotonic dystrophies type 1 and 2. *FASEB J* 2012;26:1–7.
- Farooqui AA, Horrocks LLA. Signaling and interplay mediated by phospholipases A2, C and D in LA-N-1 cell nuclei. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:613–31.
- Feng W, Zhang M. Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:87–99.
- Fisher SK, Bartus RT. Regional differences in the coupling of muscarinic receptors to inositol phospholipid hydrolysis in guinea pig brain. *J Neurochem* 1985;45:1085–95.
- Fisher SK, Agranoff BW. Receptor activation and inositol lipid hydrolysis in neural tissues. *J Neurochem* 1987;48:999–1017.
- Fiume R, Faenza I, Matteucci A, Astolfi A, Vitale M, Martelli AM, et al. Nuclear phospholipase C β_1 affects CD24 expression in murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 2005;280:24221–6.
- Fiume R, Ramazzotti G, Faenza I, Piazzi M, Bavelloni A, Billi AM, et al. Nuclear PLCs affect insulin secretion by targeting PPARgamma in pancreatic cells. *FASEB J* 2012;26:203–10.
- Follo MY, Marmiroli S, Faenza I, Fiume R, Ramazzotti G, Martelli AM, et al. Nuclear phospholipase C β_1 signaling, epigenetics and treatments in MDS. *Adv Biol Regul* 2013;53:2–7.
- Forray C, El-Fakahany E. On the involvement of multiple muscarinic receptor subtypes in the activation of phosphoinositide metabolism in rat cerebral cortex. *Mol Pharmacol* 1990;37:893–902.
- Fox K, Schlaggar B, Glazewsky S, O'Leary DDM. Glutamate receptor blockade at cortical synapses disrupts development of thalamocortical and columnar organization in somatosensory cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;94:5584–9.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D. Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 1998;390:194–210.
- Fukaya M, Uchigashima M, Nomura S, Hasegawa Y, Kikuchi H, Watanabe M. Predominant expression of phospholipase C beta1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close association with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements. *Eur J Neurosci* 2008;28:1744–59.
- Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Tsubokawa H, et al. Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M₂-mediated direct suppression and M₁/M₃-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* 2004;19:2682–92.
- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, et al. Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 2010;30:2017–24.
- Garro MA, López de Jesús M, Ruiz de Azúa I, Callado LF, Meana JJ, Sallés J. Regulation of phospholipase C- β activity by muscarinic acetylcholine and 5-HT₂ receptors in crude and synaptosomal membranes from human cerebral cortex. *Neuropharmacology* 2001;40:686–95.
- Gonzales RA, Crews FT. Characterization of the cholinergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in rat brain slices. *J Neurosci* 1984;4:3120–7.
- Gonzales RA, Crews FT. Guanine nucleotides stimulate production of inositol trisphosphate in rat cortical membranes. *Biochem J* 1985;232:799–804.
- Hannan AJ, Blakemore C, Katsnelson A, Vitalis T, Haber KM, Bear M, et al. PLC- β_1 , activated via mGluRs, mediates activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nat Neurosci* 2001;4:282–8.
- Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Ogata H, Emoto K, Maejima T, et al. Phospholipase C- β serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* 2005;45:257–68.
- Herrup K, Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* 2007;8:368–78.

- Hoozemans JJ, Bruckner MK, Rozemuller AJ. Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclo-oxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:678–88.
- Hozumi Y, Ito T, Nakano T, Nakagawa T, Aoyagi M, Kondo H, et al. Nuclear localization of diacylglycerol kinase zeta in neurons. *Eur J Neurosci* 2003;18:1448–57.
- Huang CL, Fena S, Hilgeman DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by G β γ . *Nature* 1998;391:803–6.
- Jan LY, Jan YN. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Ann Rev Neurosci* 1997;20:91–123.
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, et al. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 2006;26:5628–37.
- Kendall DA, Nahorski SR. 5-hydroxytryptamine-stimulated inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortex slices: pharmacological characterization and effects of antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;233:473–9.
- Kim D, Jun KS, Lee SB, Kang NG, Min DS, Kim YH, et al. Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* 1997;389:290–3.
- Kim J, Isokawa M, Ledent C, Alger BE. Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J Neurosci* 2002;22:10182–91.
- Kim JK, Lim S, Kim J, Kim S, Kim JH, Ryu SH, et al. Subtype-specific roles of phospholipase C- β via differential interactions with PDZ domain proteins. *Adv Enz Regul* 2011;51:138–51.
- Koh HY, Kim D, Lee J, Lee S, Shin HS. Deficits in social behavior and sensorimotor gating in mice lacking phospholipase C β 1. *Genes Brain Behav* 2008;7:120–8.
- Kurian MA, Meyer E, Vassallo G, Morgan NV, Prakash N, Pasha S, et al. Phospholipase C- β 1 deficiency is associated with early-onset epileptic encephalopathy. *Brain* 2010;133:2964–70.
- Kuriki H, Tamiya-Koizumi K, Asano M, Yoshida S, Kojima K, Nimura Y. Existence of phosphoinositide-specific phospholipase C in rat liver nuclei and its change during liver regeneration. *J Biochem (Tokyo)* 1992;111:283–6.
- Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ. Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *Plos One* 2008;8:e709.
- Lin XH, Kitamura N, Hashimoto T, Shirakawa O, Maeda K. Opposite changes in phosphoinositide-specific phospholipase C immunoreactivity in the left prefrontal and superior temporal cortex of patients with chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999;46:1665–71.
- Liu NJ, vonGizycki H, Gintzler AR. Phospholipase C- β 1 modulates pain sensitivity, opioid antinociception and opioid tolerance formation. *Brain Res* 2006;1069:47–53.
- Liu D-Z, Ander BP, Sharp FR. Cell cycle inhibition without disruption of neurogenesis is a strategy for treatment of central nervous system diseases. *Neurobiol Dis* 2010;37:549–57.
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 1987;325:321–6.
- López de Jesús M, Zalduogui A, Ruiz de Azúa I, Callado LF, Meana JJ, Sallés J. Levels of G-protein $\alpha_{q/11}$ subunits and of phospholipase C- β_{1-4} , - γ , and δ_1 isoforms in postmortem human brain caudate and cortical membranes: potential functional implications. *Neurochem Int* 2006;49:72–9.
- Lo Vasco VR, Cardinale G, Polonia G. Deletion of PLCB1 gene in schizophrenia-affected patients. *J Cell Mol Med* 2012;16:844–51.
- Lukinovic-Skudar V, Donagic L, Banfic H, Visnjic D. Nuclear phospholipase C- β_{1b} activation during G₂/M and late G₁ phase in nocodazole-synchronized HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1733:148–56.
- Martelli AM, Billi AM, Manzoli L, Faenza I, Aluigi M, Falconi M, et al. Insulin selectively stimulates nuclear phosphoinositide-specific phospholipase C β_1 activity through a mitogen-activated protein (MAP) kinase-dependent serine phosphorylation. *FEBS Lett* 2000;486:230–6.
- Martelli AM, Bortul R, Tabellini G, Bareggi R, Manzoli L, Narducci P, et al. Diacylglycerol kinases in nuclear lipid-dependent signal transduction pathways. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1129–37.
- Matteucci A, Faenza I, Gilmour RS, Manzoli L, Billi AM, Peruzzi D, et al. Nuclear but not cytoplasmic phospholipase C β_1 inhibits differentiation of erythroleukemia cells. *Cancer Res* 1998;58:5057–60.
- McOmish CE, Burrows EL, Howard M, Hannan AJ. PLC- β 1 knockout mice as a model of disrupted cortical development and plasticity: behavioural endophenotypes and dysregulation of RGS4 gene expression. *Hippocampus* 2008a;18:824–34.
- McOmish CE, Burrows EL, Howard M, Scarr E, Kim D, Shin HS, et al. Phospholipase C- β 1 knockout mice exhibit endophenotypes modelling schizophrenia which are rescued by environmental enrichment and clozapine administration. *Mol Psychiatry* 2008b;13:661–72.
- Mittnacht S. Control of pRb phosphorylation. *Curr Opin Gen Dev* 1998;8:21–7.
- Montaña M, García del Caño G, López de Jesús M, González-Burguera I, Echeazarra L, Barrondo S, et al. Cellular neurochemical characterization and subcellular localization of phospholipase C- β 1 in rat brain. *Neuroscience* 2012;222:239–68.
- Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 1995;80:249–57.
- Nicoll RA. The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science* 1988;241:545–51.
- Ohno-Shosaku T, Shosaku Y, Tsubokawa H, Kano M. Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur J Neurosci* 2002;15:953–61.
- O'Leary DDM, Schlagger B, Tuttle R. Specification of neocortical areas and thalamocortical connections. *Ann Rev Neurosci* 1994;17:419–39.
- Osborne SL, Thomas CL, Gschmeissner S, Schiavo G. Nuclear PtdIns (4,5) P₂ assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J Cell Sci* 2001;114:2501–11.
- Peruzzi D, Aluigi M, Manzoli L, Billi AM, Di Giorgio FP, Morleo M, et al. Molecular characterization of the human PLC- β_1 gene. *Biochim Biophys Acta* 2002;1584:46–54.
- Raman R, Kaplan BLF, Kaminski NE. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂-glycerol, a putative metabolite of 2-arachidonoylglycerol and a peroxisome proliferator-activated receptor γ -ligand, modulates nuclear factor of activated T cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;342:816–26.
- Ramazzotti G, Faenza I, Gaboardi GC, Piazzi M, Bavelloni A, Fiume R, et al. Catalytic activity of nuclear PLC- β 1 is required for its signalling function during C2C12 differentiation. *Cell Signal* 2008;20:2013–21.

- Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Ann Rev Biochem* 2001;70:221–312.
- Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE. Interleukin-2 suppression by 2-arachidonoylglycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor γ independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol* 2006;70:101–11.
- Ross CA, MacCumber MW, Glatt CE, Snyder SH. Brain phospholipase C isozymes: differential mRNA localizations by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2923–7.
- Ruiz de Azúa I, Lumberras MA, Zalduegui A, Baamonde C, Dierssen M, Flórez J, et al. Reduced phospholipase C- β activity and isoform expression in the cerebellum of Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome. *J Neurosci Res* 2001;66:540–50.
- Ruiz de Azúa I, del Olmo E, Pazos A, Sallés J. Transmembrane signalling through phospholipase C- β in the developing human prefrontal cortex. *J Neurosci Res* 2006;84:13–26.
- Sallés J, Claro E, García A, Picatoste F, Badia A. Differential effects of chronic treatment with mianserin and protryptiline on rat brain cortical α 1-adrenoceptors. *Brain Res* 1989;498:366–70.
- Sallés J, Wallace MA, Fain JN. Differential effects of alkylating agents on the multiple muscarinic receptor subtypes linked to activation of phospholipase C by carbachol in rat brain cortical membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1993a;264:521–9.
- Sallés J, Wallace MA, Fain JN. Modulation of the phospholipase C activity in rat brain cortical membranes by simultaneous activation of distinct monoaminergic and cholinergic muscarinic receptors. *Mol Brain Res* 1993b;20:111–7.
- Shirakawa O, Kitamura N, Lin XH, Hashimoto T, Maeda K. Abnormal neurochemical asymmetry in the temporal lobe of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;25:867–77.
- Smith MZ, Nagy Z, Esiri MM. Cell cycle-related protein expression in vascular dementia and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999;271:45–8.
- Sohn JW, Lee D, Cho H, Lim W, Shin H-S, Lee S-H, et al. Receptor-specific inhibition of GABA β -activated K⁺ currents by muscarinic and metabotropic glutamate receptors in immature rat hippocampus. *J Physiol* 2007;580(pt 2):411–22.
- Spires TL, Molnar Z, Kind PC, Cordery PM, Upton AL, Blakemore C, et al. Activity-dependent regulation of synapse and dendritic spine morphology in developing barrel cortex requires PLC- β . *Cereb Cortex* 2005;15:385–93.
- Suh BC, Hille B. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15:370–8.
- Sui JL, Petit-Jacques J, Logothetis DE. Activation of the atrial K ACh channel by the $\beta\gamma$ subunits of G proteins or intracellular Na⁺ ions depends on the presence of phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1307–12.
- Tabellini G, Bortol R, Santi S, Riccio M, Baldini G, Cappellini A, et al. Diacylglycerol kinase-theta is localized in the speckle domains of the nucleus. *Exp Cell Res* 2003;287:143–54.
- Taguchi K, Kumanogoh H, Nakamura S, Maekawa S. Localization of phospholipase C beta 1 on the detergent-resistant membrane microdomain prepared from the synaptic plasma membrane fraction of rat brain. *J Neurosci Res* 2007;85:1364–71.
- Tanaka O, Kondo H. Localization of mRNAs for three novel members (beta3, beta4 and gamma2) of phospholipase C family in mature rat brain. *Neurosci Lett* 1994;182:17–20.
- Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M. Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci* 2007;27:3663–76.
- Udawela M, Scarr E, Hannan AJ, Thomas EA, Dean B. Phospholipase C β 1 expression in the dorsolateral prefrontal cortex from patients with schizophrenia at different stages of illness. *Aust N Z J Psychiatry* 2011;45:140–7.
- Wallace MA, Claro E. Comparison of serotonergic to muscarinic cholinergic stimulation of phosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain cortical membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:1296–300.
- Wallace MA, Claro E, Carter HR, Fain JN. Phosphoinositide-specific phospholipase C activation in brain cortical membranes. *Methods Enzymol* 1991;197:183–90.
- Wallace MA, Claro E. Transmembrane signalling through phospholipase C in human cortical membranes. *Neurochem Res* 1993;18:139–45.
- Watanabe M, Nakamura M, Sato K, Kano M, Simon MI, Inoue Y. Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of PLC- β in mouse brain. *Eur J Neurosci* 1998a;10:2016–25.
- Watanabe M, Fukaya M, Sakimura K, Manabe T, Mishina M, Inoue Y. Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fibre-recipient layer) of the mouse hippocampal CA3 subfield. *Eur J Neurosci* 1998b;10:478–87.
- Wettschurek N, Van der Stelt M, Tsubokawa H, Krestel H, Moers A, Petrosino S, et al. Forebrain-specific inactivation of Gq/11 family G-proteins results in age-dependent epilepsy and impaired endocannabinoid formation. *Mol Cell Biol* 2006;26:5888–94.
- Woolsey TA, Van der Loos H. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of the mouse cerebral cortex. *Brain Res* 1970;17:205–42.
- Woolsey TA, Dierker ML, Wann DF. Mouse Sml cortex: qualitative and quantitative classification of golgi-impregnated barrel neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:2165–9.
- Xia Z, Gray JA, Compton-Toth BA, Roth BL. A direct interaction of PSD-95 with 5-HT 2A serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J Biol Chem* 2003;278:21901–8.
- Xu A, Suh PG, Marmy-Conus N, Pearson RB, Seok OY, Cocco L, et al. Phosphorylation of nuclear phospholipase C β 1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor. *Mol Cell Biol* 2001a;21:2981–90.
- Xu A, Wang Y, Xu LY, Gilmour RS. Protein kinase C α -mediated negative feedback regulation is responsible for the termination of insulin-like growth factor I-induced activation of nuclear phospholipase C β 1 in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 2001b;276:14980–6.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Kamiya H, Kano M, Watanabe M. Localization of diacylglycerol lipase- α around post-synaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* 2006;26:4740–51.
- Yoshimura T, Arimura N, Kaibuchi K. Signalling networks in neuronal polarization. *J Neurosci* 2006;26:10626–30.

ORIGINAL
ARTICLENuclear diacylglycerol lipase- α in rat brain cortical neurons: evidence of 2-arachidonoylglycerol production in concert with phospholipase C- β activity

Gontzal García del Caño,* Xabier Aretxabala,* Imanol González-Burguera,† Mario Montaña,† Maider López de Jesús,†¹ Sergio Barrondo,†¹ Ramón J. Barrio,‡ Carmen Sampedro,§ M. Arantzazu Goicolea‡ and Joan Sallés†¹

*Departamento de Neurociencias, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 01006 Vitoria-Gasteiz (Araba), Spain

†Departamento de Farmacología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 01006 Vitoria-Gasteiz (Araba), Spain

‡Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 01006 Vitoria-Gasteiz (Araba), Spain

§Servicio General de Análisis, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 01006 Vitoria-Gasteiz (Araba), Spain

Abstract

In this report, we describe the localization of diacylglycerol lipase- α (DAGL α) in nuclei from adult cortical neurons, as assessed by double-immunofluorescence staining of rat brain cortical sections and purified intact nuclei and by western blot analysis of subnuclear fractions. Double-labeling assays using the anti-DAGL α antibody and NeuN combined with Hoechst staining showed that only nuclei of neuronal origin were DAGL α positive. At high resolution, DAGL α -signal displayed a punctate pattern in nuclear subdomains poor in Hoechst's chromatin and lamin B1 staining. In contrast, SC-35- and NeuN-signals (markers of the nuclear speckles) showed a high overlap with DAGL α within specific subdomains of the nuclear matrix. Among the members of the phospholipase C- β (PLC β) family, PLC β 1, PLC β 2, and

PLC β 4 exhibited the same distribution with respect to chromatin, lamin B1, SC-35, and NeuN as that described for DAGL α . Furthermore, by quantifying the basal levels of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) by liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS), and by characterizing the pharmacology of its accumulation, we describe the presence of a mechanism for 2-AG production, and its PLC β /DAGL α -dependent biosynthesis in isolated nuclei. These results extend our knowledge about subcellular distribution of neuronal DAGL α , providing biochemical grounds to hypothesize a role for 2-AG locally produced within the neuronal nucleus.

Keywords: 2-AG production, DAGL α , neuronal nuclei, PLC β 1, PLC β 2, PLC β 4.

J. Neurochem. (2014) 10.1111/jnc.12963

Over the last few years, the study of the phospholipase C- β (PLC β)/diacylglycerol lipase- α (DAGL α) signaling cascade in the mammalian central nervous system has sought to characterize its presence at specific domains of the neuronal plasma membrane, and to establish its role in the control of neuronal excitability of glutamatergic neurons, the principal neuronal type of several brain regions such as the cerebral cortex. At present, it is well established that the diacylglycerol

Received July 31, 2014; revised manuscript received September 22, 2014; accepted October 7, 2014.

Address correspondence and reprint requests to Joan Sallés, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria-Gasteiz (Araba), Spain. E-mail: joan.salles@ehu.es
¹CIBERSAM, Spain.

Abbreviations used: DAGL α , diacylglycerol lipase- α ; PLC β , phospholipase C- β ; PtdIns-PLC, phosphatidylinositol-phospholipase C.

(DAG) ensuing from PLC β 1 activity is taken by DAGL α to produce 2-arachidonoylglycerol (2-AG), which is the most abundant endogenous agonist of the CB1 cannabinoid receptor (Stella *et al.* 1997; Hashimoto *et al.* 2005; Jung *et al.* 2005, 2007). In the mammalian brain, the molecular architecture of this signaling cascade has been precisely located near the post-synaptic density of excitatory synapses (Katona *et al.* 2006; Lafourcade *et al.* 2007; Yoshida *et al.* 2011), where PLC β 1 acts as a coincidence detector because of its ability to integrate the signals coming from the activation of Gq-coupled receptors and the entry of extracellular calcium through ionotropic receptors or voltage-dependent calcium channels (Stella *et al.* 1997; Kim *et al.* 2001; Ohno-Shosaku *et al.* 2002, 2003; Hashimoto *et al.* 2005; Jung *et al.* 2005, 2007). Among members of their respective families, the prominent role of PLC β 1 and DAGL α activities for 2-AG synthesis has been proved by selective knockdown of PLC β 1, DAGL α , and DAGL β genes (Bisogno *et al.* 2003; Hashimoto *et al.* 2005; Gao *et al.* 2010; Tanimura *et al.* 2010; Yoshino *et al.* 2011).

In spite of the fact that most research involving signal transduction pathways based on PLC β 1/DAGL α has been devoted to the study of the phenomena that take place at the plasma membrane, the work of several independent laboratories has consistently demonstrated that the phosphoinositide cycle (biosynthetic and hydrolytic machinery) is present in the cell nucleus (Payrastra *et al.* 1992; Boronenkov *et al.* 1998; Osborne *et al.* 2001; Tabellini *et al.* 2003), and may be important for various nuclear events such as mRNA export, DNA repair, and gene transcription (Irvine 2003). In fact, PLC β 1 was the first member of the PLC β family identified at the nuclear level (Cocco *et al.* 1987; Martelli *et al.* 1992; Divecha *et al.* 1993). With respect to PLC β 1, confocal and immunoelectron microscope studies and classical biochemical techniques provide evidence of its presence in the inner nuclear matrix (Zini *et al.* 1994; Bertagnolo *et al.* 1995; Crljen *et al.* 2004; Fiume *et al.* 2009), where it is preferentially located in nuclear speckles, which are involved in splicing events and can be easily identified by specific markers, such as the splicing factors (Bavelloni *et al.* 2006). We have recently demonstrated in neuronal nuclei isolated from adult rat brain cortex that PLC β 1 is localized to chromatin-poor domains of the nuclear matrix, where it displays a high colocalization with NeuN/Fox and SC-35 (Montaña *et al.* 2012; present work), two known markers of nuclear speckles (Osborne *et al.* 2001; Tabellini *et al.* 2003; Dent *et al.* 2010). Moreover, PLC β 1 was also highly expressed in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdInsP $_2$)-rich regions of neuronal nuclei (Montaña *et al.* 2012). Indeed, it was observed that the bulk of PtdInsP $_2$ -signal was confined to speckle-like structures, with only faint staining at the nuclear membrane (Montaña *et al.* 2012).

With respect to DAGL α , although there is no evidence in the literature indicating a location of DAGL α in the neuronal nuclear compartment, some observations make it seem plausible. Classical biochemical techniques, using preparations of nuclei obtained from several cellular models and mammalian brain, provide evidence that the nuclear compartment possesses DAGL and monoacylglycerol lipase (MAGL) activities (Antony *et al.* 2000; Baker and Chang 2000; Farooqui *et al.* 2004; Farooqui and Horrocks 2005; Gaveglio *et al.* 2011), which are yet to be molecularly characterized.

With these facts in mind, we sought to explore whether a PLC β -DAGL α -dependent machinery for 2-AG synthesis is actually present in the nuclear compartment of rat brain cortical neurons, as we have recently proposed (García del Caño *et al.* 2014). Results obtained by high-resolution fluorescence microscopy and by subnuclear fractionation and western blot analysis indicate that a DAGL α -dependent synthesis of 2-AG may exist in the neuronal nucleus. Furthermore, using pharmacological tools in purified intact nuclei from adult rat brain cortex, we have quantified the endogenous levels of 2-AG and demonstrated its PLC β /DAGL-dependent production. Our findings raise the possibility that, in adult cortical neurons, a nuclear endocannabinoid pathway may act in a localized manner to mediate regulatory processes such as gene transcription.

Materials and methods

Drugs and chemicals for LC-MS

2-AG and its deuterated analogue 2-AG-d5 were obtained from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Water (H $_2$ O), acetonitrile, formic acid, ethylacetate, and hexane (all of Fluka LC-MS grade) were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). m-3M3FBS, o-3M3FBS, edelfosine, tetrahydrolipstatin (THA), *N*-arachidonoyl maleimide (NAM), and D609 were from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). R59949 was from Merck (Darmstadt, Germany).

Animals

Eight-week-old male albino Sprague–Dawley rats (250 g) were purchased from Harlan Iberica (Barcelona, Spain). Animals were housed and handled according to the ARRIVE guidelines and to the approval of the Ethics/Animal Committee of the University of the Basque Country (Reg. N. CEBA/164/2010/GARCÍA DEL CAÑO).

Preparation of histological sections from adult rat brain

Rats were anesthetized with an overdose of choral hydrate (1 g/kg i.p.; Panreac Química S.A. Barcelona, Spain), and perfused transcardially with either 0.1 M phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS) or a 0.37% (w/v) sulfide solution for 4 min, followed by 4% (w/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in 0.1 M phosphate-buffer, pH 7.4 (PB) for 4 min. Brains were removed, kept at 20–25°C in the same fixative for 4 h, transferred to PB containing 30% sucrose, and kept at 4°C until they sank. Blocks of brain tissue were coronally cryosectioned at 40 μ m using a microtome (Leitz-Wetzlar

1310; Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, Germany) equipped with a temperature control sensor (5MP BFS-Physitemp Controller). Sections were placed in PBS and then cryoprotected by incubations in increasing concentrations (5, 10, and 20% v/v) of dimethyl sulfoxide (Sigma) in PB. Finally, brain sections were subjected to permeabilization by three freeze–thawing cycles in isopentane at -80°C . Immunohistochemistry and immunofluorescence were performed in free-floating sections as described previously (Montaña *et al.* 2012) (see Supporting Information for further details).

Subcellular fractionation

Animals were killed by decapitation and brains were immediately removed. The crude membrane fraction (P2) was isolated as described previously (Montaña *et al.* 2012). Highly purified intact nuclei (N) were isolated using the protocol by Thompson (1973) slightly modified, as we have recently published (Montaña *et al.* 2012). Sequential fractionation of nuclei was carried out as described by Fey *et al.* (1986) with minor modifications (see Supporting Information for details).

Nuclei set aside for western blot analysis and measurement of 2-AG production by LC-MS were stored at -80°C until further use. Nuclei used for immunofluorescence were resuspended in TM-2 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 2 mM MgCl_2 and protease inhibitors), counted under a light-phase microscope and adjusted to a dilution of 2×10^6 nuclei/mL. Nuclei were laid on gelatin-coated slides (5×10^4 nuclei/slide) and air dried. Before immunofluorescence, slides were immersed in 0.37% (w/v) sulfide solution for 4 min followed by incubation in buffered 2% paraformaldehyde for 15 min, both at 20° – 25°C .

Western blot

Samples of P2 and nuclear subfractions were boiled in urea-denaturing buffer [20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 12% glycerol, 12% Urea, 5% dithiothreitol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.01% bromophenol blue] for 5 min, resolved by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and then electrophoretically transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Polyvinylidene fluoride sheets were blocked with blocking solution (0.2 M PBS, pH 7.5, containing 5% non-fat dry milk and 0.5% bovine serum albumin, 0.2% Tween-20) for 1 h at 20° – 25°C , and incubated overnight at 4°C with antibodies against DAGL α , PLC β isoforms, or specific markers of the P2 and nuclear subfractions diluted in blocking solution (Table S1 for details). After extensive washing with 0.2 M PBS, containing 0.1% Tween-20, membranes were incubated for 2 h at 20° – 25°C with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Bioscience) diluted 1 : 10 000 in blocking solution, and developed using enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Microscope studies and imaging

Micrographs of sections processed for immunohistochemical staining were observed with an Olympus BX50F optic microscope (Olympus, Hamburg, Germany), acquired with a high-resolution digital camera (Olympus Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Germany), and digitized using Cella software (Olympus Soft Imaging Systems GmbH) for image acquisition.

Fluorescence images were captured with an epifluorescence microscope Carl Zeiss Axio Observer.Z1, equipped with a HXP 120 C

metal halide lamp illumination source, a high-resolution monochromatic camera (AxioCam MRm, 1388×1040 pixels), a structured illumination module (ApoTome), and a XYZ motorized stage (all from Carl Zeiss MicroImaging, Inc, Göttingen, Germany). Images were taken using a $63 \times$ Plan-Apochromat objective (NA 1.4) and optical sections ($0.24 \mu\text{m}$ intervals in the z -axis) were obtained with the Zeiss ApoTome device, with camera settings adjusted to obtain images with a pixel size of $0.01 \mu\text{m}^2$. Bandpass filters used were 49 DAPI (Ex G 365/Em 445/50) for Hoechst's staining, 38 HE eGFP (Ex 470/40, Em 525/50) for Alexa Fluor 488, and 43 HE Cy3 shift free (Ex 550/25, Em 605/70) for Alexa Fluor 568 and DyLight 549. Images were digitized using Zeiss Axio Vision 4.8 software (Carl Zeiss MicroImaging, Inc). Minor despeckling was performed on ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) software. Images were exported to TIFF format, and compiled and labeled using Adobe Photoshop CS3 (San Jose, CA, USA).

2-AG measurements by LC-MS/MS

2-AG accumulation in isolated rat brain cortical nuclei was initiated in 2-mL siliconized microcentrifuge tubes by the addition of cold-isolated nuclei (200 μg nuclear protein) to the prewarmed assay buffer containing the appropriate concentrations of the selected activators or inhibitors of PLC β and DAGL α in a final volume of 500 μL . The assay buffer contained 50 mM Tris-maleate, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 0.32 M sucrose. When the effects of Ca^{2+} ions were assayed, 3 mM EGTA and CaCl_2 to yield the desired free Ca^{2+} concentration were added to the assay buffer. These assays were run for 30 min at 37°C and were stopped by keeping on ice. Tubes were spiked with 20- μL acetonitrile containing the internal standard (2-AG-d5, 50 nM) and the appropriate concentration of 2-AG in its natural form. Ethylacetate/hexane (1000 μL ; 9 : 1, v/v) was added to extract the nuclear fraction with the aid of a 5-mm-steel ball using the TissueLyser II (Qiagen, Valencia, CA, USA) for 1 cycle of 10 s at 30 Hz. Then, the tubes were centrifuged for 10 min at 10 000 g and 4°C , and the upper (organic) phase was removed, evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at 37°C , and redissolved in 500- μL acetonitrile.

Analysis was performed as described previously (Schulte *et al.* 2012) on a LC-MS/MS system based on Agilent Technologies (Wilmington, DE, USA) consisting of a 6410 Triple Quad mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source operating in positive ion mode, and a 1200-series binary pump system. 2-AG was separated with a Phenomenex Luna 2.5 μm C18 (2)-HST (High Speed Technology) column, 100×2 mm, combined with a Security Guard pre-column (C18, 4×2 mm; Phenomenex; Torrance, CA, USA) with solvents A (0.1% formic acid in 20 : 80 acetonitrile/water, v/v) and B (0.1% formic acid in acetonitrile), using the following gradient: 55–90% B (0–2 min), then held at 90% B (2–7.5 min) and reequilibrated at 55% B (7.5–10 min). The column temperature was 25°C , the flow rate was 0.3 mL/min, the injection volume was 10 μL , and the needle was rinsed for 60 s using a flushport with water/acetonitrile (80 : 20) as the eluent. The electrospray ionization interface was operated using nitrogen as nebulizer and desolvation gas, and using the following settings: temperature 350°C , nebulizer pressure 40 psi, and capillary voltage + 4800 V. The following precursor-to-product ion transitions were used for multiple-reaction monitoring (MRM): 2-AG m/z 379287; 2-AG-d5 m/z 384.2287 (Figure S10c).

Data analysis

GraphPad Prism (version 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used to organize and statistically analyze data. The concentration–response curves for m-3M3-FBS (2,4,6-trimethyl-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzene-1-sulfonamide) and Ca^{2+} were analyzed by nonlinear regression using the appropriate equations, which gave estimates of the basal level, maximal response (E_{max}) and EC_{50} of the curves. The significance of differences between means was analyzed by unpaired two-tailed Student's *t*-test or ANOVA followed by the Tukey–Kramer multiple comparison tests. Statistical significance was set at the 95% confidence level.

Results

DAGL α -specific immunoreactivity is detected in cell nuclei of the rat somatosensory cortex

To address the question of whether DAGL α , the most abundant DAGL in mammalian brain could be detected in cell nuclei of rat cerebral cortex, we conducted immunohistochemical experiments in adult rat brain sections. For this purpose, we used a fixation procedure consisting in a brief perfusion with 0.37% sulfide buffer before paraformaldehyde fixation, which has been previously shown to improve immunoreactivity (Mitchell *et al.* 1993) and expose otherwise inaccessible epitopes (Montaña *et al.* 2012) without compromising the immunostaining profile of different proteins. Thus, we first analyzed the distribution of DAGL α immunoreactivity in the somatosensory cortex of rat brain frozen sections using four polyclonal antibodies raised against peptides mapping to different antigenic sites on the DAGL α protein (Figure S1 and Table S1). Noticeably, immunohistochemical staining with all four anti-DAGL α antibodies resulted in labeling of nuclear profiles (Figure S1). However, the comparison of the immunofluorescence signals with that previously described (Yoshida *et al.* 2006; Uchigashima *et al.* 2007) (Figure S2), the availability of published data on their specificity (Yoshida *et al.* 2006; Uchigashima *et al.* 2007; Suárez *et al.* 2011) and the banding patterns observed by western Blot, led us to select the Af380 rabbit polyclonal antibody raised against the C-terminal tail of mouse DAGL α (Fig. 1a) for subsequent experiments. Thus, Af380 antibody was further tested for specificity by preabsorption with the immunizing peptide and by double immunofluorescence in DAGL α -HA-transfected HEK293 cells (Figure S3) (see Supporting results for further details).

To address whether perfusion of sodium sulfide before paraformaldehyde fixation used here caused artifactual results, we analyzed the distribution of DAGL α - and lamin B1 immunoreactivities in layer V of the adult rat somatosensory cortex by high-resolution fluorescence microscopy after either standard or sodium sulfide fixation. Consistent with the localization of DAGL α at post-synaptic sites (Bisogno *et al.* 2003; Yoshida *et al.* 2006; Uchigashima

et al. 2007), high-resolution fluorescence microscopy revealed that DAGL α -immunofluorescence was distributed throughout the neuropil as a bright punctate pattern, which was stronger after sodium sulfide fixation compared with the standard protocol. In addition, nuclear profiles stood out clearly against the surrounding neuropil in sodium sulfide-fixed tissue, whereas they were hardly distinguishable in cortical tissue fixed using the standard protocol (compare Fig. 1b, f, h and l). Under our conditions of immunostaining, lamin B1-immunoreactivity was virtually undetectable in sections of cortical tissue subjected to standard fixation, whereas strong immunoreactivity could be detected at the expected location in cell nuclei of cortical tissue subjected to sodium sulfide fixation (compare Fig. 1d, e, j and k). This later protocol resulted in a bright punctate DAGL α -immunostaining pattern internal to the nuclear lamina, as verified in orthogonal projections reconstructed from Z-stacked images (Fig. 1i and m). In contrast, staining was sparse inside the nuclei of sections of tissue processed by the standard method (Fig. 1c and g). To confirm that the distribution pattern of the immunolabeling provided by the Af380 antibody after sulfide fixation was consistent with the expected distribution of DAGL α , we extended the comparative analysis to cerebellum and hippocampus. In agreement with previous descriptions (Bisogno *et al.* 2003; Yoshida *et al.* 2006), DAGL α -immunoreactivity was virtually confined to Purkinje cell dendrites of the molecular layer under either fixation condition, although sodium sulfide fixation greatly improved the sensitivity of immunodetection compared to the standard protocol (Figure S4). In the hippocampus, both fixation procedures resulted in a punctate staining pattern throughout strata oriens, pyramidal, and radiatum. However, no obvious cytoarchitectonic arrangement of DAGL α immunolabeling could be observed under standard fixation, whereas immunopositive dendrite-like structures could be observed in sulfide-fixed sections (Figure S5). Again, lamin B1-immunoreactivity in both cerebellum and hippocampus was clearly detectable only under sodium sulfide fixation (Figures S4, S5). Nuclei of principal neurons, in both the cerebellum and the hippocampus, were also DAGL α immunoreactive. However, because DAGL α -immunofluorescence intensity in neuropil was considerably stronger in the cerebellum and the hippocampus than in the cortex, shorter exposure times used for image acquisition of cerebellar and hippocampal sections led to the appearance that no nuclear signal was detected.

DAGL α , and PLC β 1, 2 and 4 immunoreactivities are enriched in discrete foci within the nuclear matrix of adult neuronal nuclei

In order to determine whether DAGL α is expressed in nuclei of neuronal origin and to better define its distribution within the nucleus, double-labeling experiments were performed in

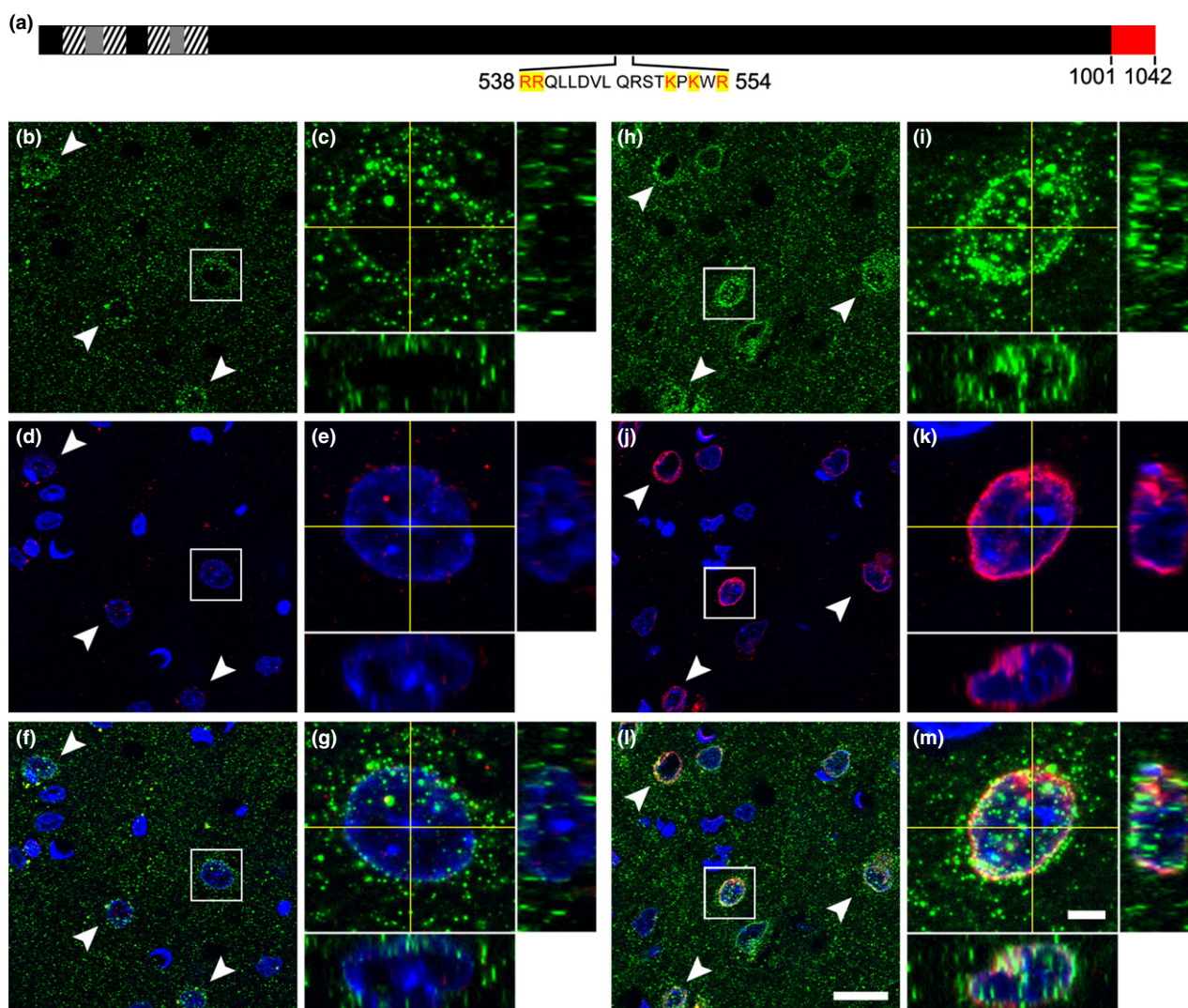


Fig. 1 (a) Schematic representation of the sequence of the human diacylglycerol lipase- α (DAGL α) protein (Uniprot, ID Q9Y4D2; available at <http://www.uniprot.org/>). Black, gray-shaded, and hatched areas correspond to cytoplasmic, extracellular, and transmembrane regions of DAGL α , respectively. The C-terminal portion colored in red (residues 1001–1042) corresponds to the amino acid sequence used as antigen to produce the polyclonal anti-DAGL α antibody used in this study. The sequence of a potential bipartite nuclear localization signal at residues 538–554 as predicted by Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) is shown. The basic residues (highlighted in yellow) are highly conserved in all mammalian species analyzed. (b–m) Micrographs of layer V of the adult rat somatosensory cortex processed for

double-immunofluorescence against DAGL α (green) and lamin B1 (red) combined with chromatin staining using the Hoechst's dye (blue), under either standard (b–g) or sodium sulfide (h–m) fixation. Arrows indicate DAGL α -immunopositive nuclear profiles. Identical staining and imaging conditions were used for both tissues. Micrographs are maximum intensity projections of four consecutive optical sections separated by 0.24 μ m, obtained using the structured illumination module (ApoTome) of a fluorescence microscope (Carl Zeiss Axio Observer) equipped with a XYZ motorized stage. (c, e, g, i, k, and m) are higher magnification views and orthogonal projections of the framed areas in (b, d, f, h, j, and l). Scale bars: 20 μ m in (l) (applies to b, d, f, h, j, and l); 5 μ m in (m) (applies to c, e, g, i, k, and m).

isolated nuclei. First, intact nuclei were immunostained for DAGL α and NeuN/Fox, a marker of post-mitotic neurons (Fig. 2a and b). Counter-staining with the Hoechst's chromatin staining revealed that only nuclei of neuronal origin were DAGL α positive (Fig. 2c). At high resolution, we observed that DAGL α was enriched in bright foci distributed throughout the nucleoplasm in subdomains poor in chroma-

tin staining (Fig. 2d and f), pointing to DAGL α as a component of the nuclear matrix. Double-immunofluorescence experiments with Af380 antibody combined with markers of the nuclear lamina and of different components of the nuclear speckles allowed us to better define the distribution of DAGL α within the nucleus. As shown in Fig. 2(g–i), no overlap could be observed between DAGL α

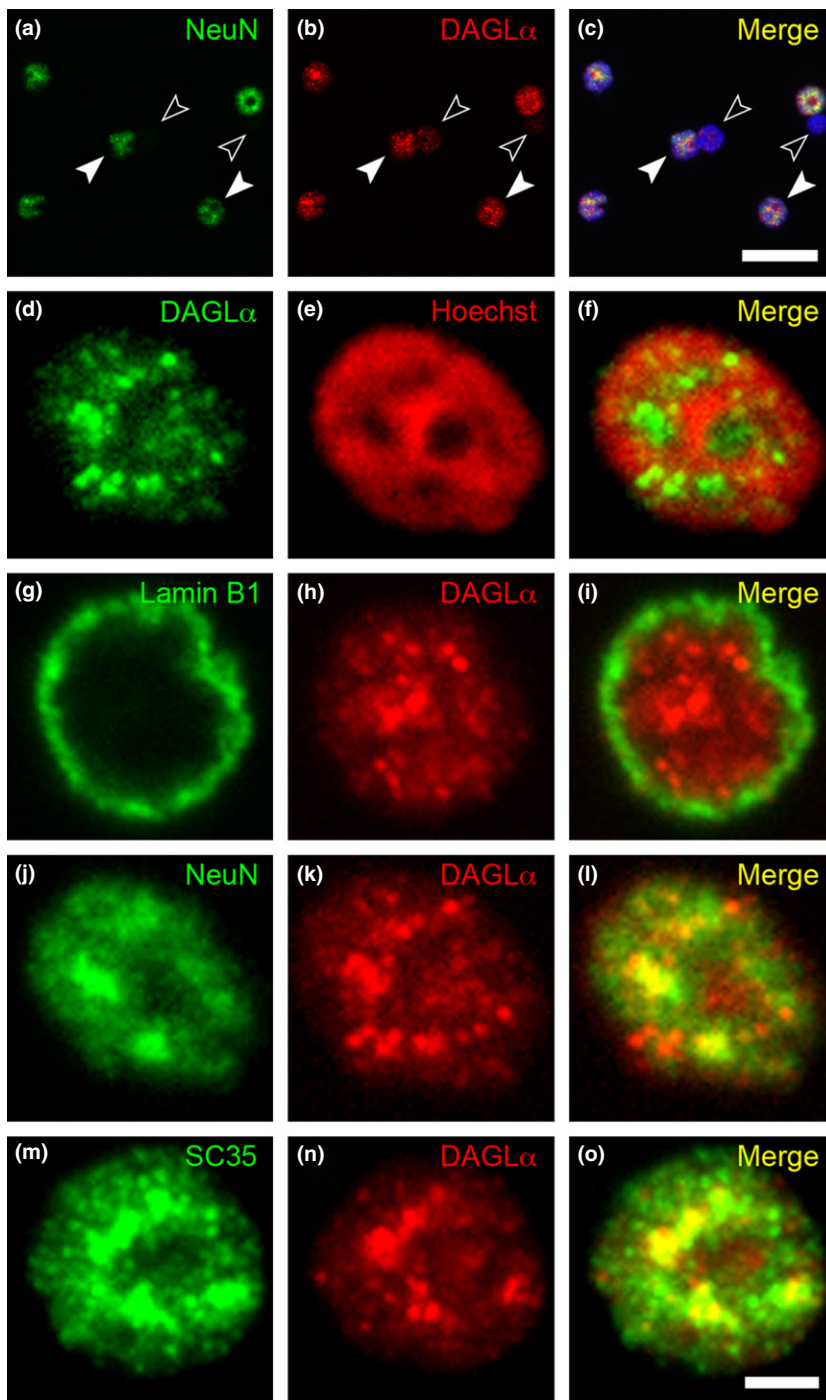


Fig. 2 (a–c) Panoramic micrographs of diacylglycerol lipase- α (DAGL α)-immunofluorescence using the Af380 antibody (red) combined with NeuN-immunofluorescence (green) and Hoechst staining (blue) in intact nuclei isolated from the adult rat brain cortex. Every NeuN-immunopositive nucleus exhibited strong DAGL α -immunoreactivity (filled arrowheads), whereas no immunostaining was observed in NeuN-negative nuclei (empty arrowheads). (d–o) High-power micrographs of isolated nuclei double stained with anti-DAGL α combined with Hoechst staining (d–f), and lamin B1 (g–i), NeuN (j–l) and SC-35 (m–o) immunostaining. All micrographs are maximum intensity projections of three consecutive 0.24- μ m-thick optical sections. Scale bars: 20 μ m in (c) (applies to a–c); 2.5 μ m in (o) (applies to d–o).

and lamin B1 signals, showing that DAGL α is internal to the nuclear lamina. In contrast, we found a high overlap between DAGL α - and the nuclear matrix component NeuN/Fox (Fig. 2j–l). Similar results were obtained when antibodies against DAGL α and SC-35 (a nuclear speckle marker) were combined (Fig. 2m–o), strongly suggesting that DAGL α is a component of nuclear speckles in cortical neurons of adult brain.

We have previously demonstrated that PLC β 1 is also located at similar discrete domains of nuclei from adult cortical neurons (Montaña *et al.* 2012). Here, we explored the possibility that other PLC β isoforms could be expressed in neuronal nuclei using PLC β isoform-specific antibodies. For this purpose, we first conducted western blot analysis on samples of intact nuclei isolated from the adult rat brain and confirmed that PLC β 1, 2 and 4 were

detected in isolated nuclei (Figure S6). Double-immunofluorescence experiments (Figure S7) confirmed that PLC β 1, 2 and 4 isoforms were enriched in the same subnuclear compartments as DAGL α (see Supporting Information for details).

DAGL α -immunoblot labeling is enriched in cortical isolated nuclei after sequential extraction with Triton X-100, DNase I, and high salt

To confirm the nuclear expression of DAGL α and to characterize its compartmentalization, nuclei were isolated from homogenates of adult rat cortex, treated with Triton X-100 followed by DNase I and high salt or RNase A extractions, and subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis. As shown in Fig. 3(a), preparations of intact nuclei were highly purified with no apparent debris or contamination by other organelles. After treatment with the non-ionic detergent Triton X-100, about 85% of the total nuclear protein was recovered in the nucleoid (Nu) pellet. Isolation of the nuclear matrix (NM) by subsequent digestion with DNase I followed by high salt resulted in ~50% protein loss from Nu fraction. Therefore, ~58% of the total nuclear protein was extracted by sequential treatment with Triton X-100 and DNase I. In its turn, RNase A removed ~55% of the protein contained in the Nu fraction. Therefore, ~64% of the total nuclear protein was extracted by sequential treatment with Triton X-100 and RNase A. The suitability of the subfrac-

tionation procedure was analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie Brilliant Blue staining (Figure S9) and immunoblot (Fig. 3b). To this end, we probed antibodies against binding immunoglobulin protein, a constituent of the endoplasmic reticulum and outer nuclear membrane (ONM), against the 62-kDa component (Nup62) of the nuclear pore complex (NPCx), histone H3, a chromatin-associated protein, and NeuN/Fox-3, an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. The efficiency of the protocol used to solubilize the proteins associated with the nuclear envelope became evident, as binding immunoglobulin protein immunoreactivity was almost undetectable in nuclei treated with Triton X-100 and was recovered in the Triton X-100 soluble supernatant (Fig. 3b). Incubation of nuclei with DNase I followed by high-salt extraction with 0.25 M (NH₄)₂SO₄ resulted in a marked decrease in the staining intensity of protein bands corresponding to linker (H1) and core histones (H2A, H2B, H3), whose apparent molecular masses in SDS-PAGE are in the range of 32–34 kDa and 15–17 kDa, respectively (Belgrader *et al.* 1991; Ren *et al.* 2001). Accordingly, staining of bands at these molecular masses was very dense in the DNase I supernatant (Figure S9). As expected, NM resulting from treatment of nucleoids with DNase I was largely devoid of histone H3 immunoreactivity, which was recovered in the DNase I supernatant (Fig. 3b). In contrast, RNase A-treated nucleoids were enriched in linker and core histones (Figure S9). In addition,

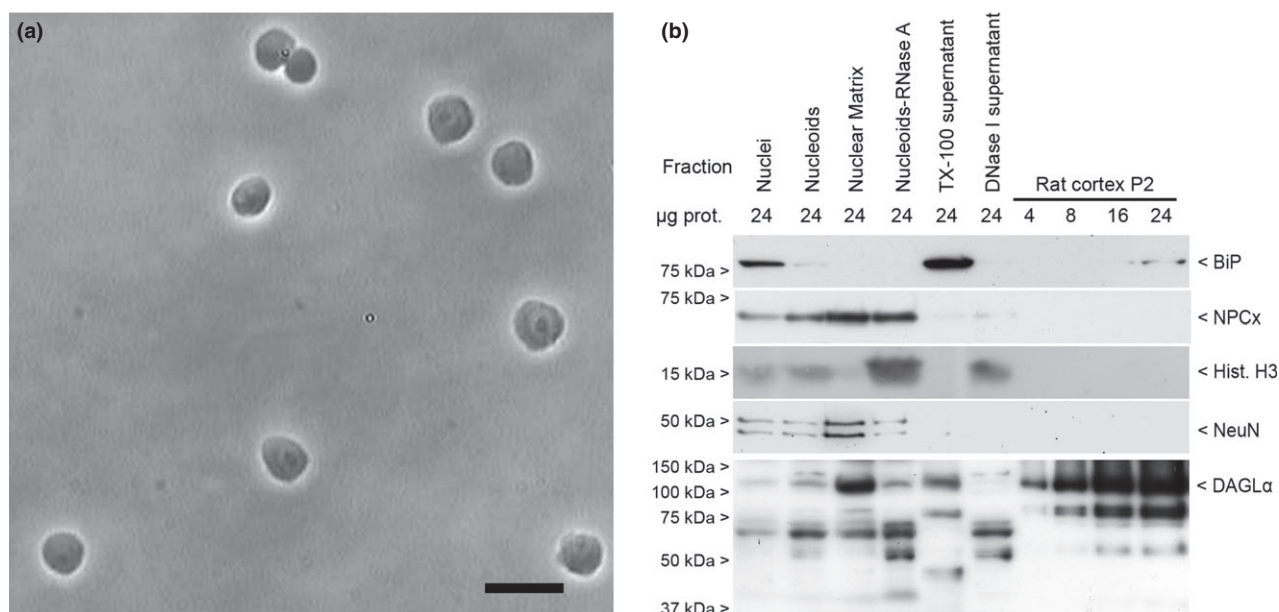


Fig. 3 (a) Representative image of phase-contrast microscopy of nuclei isolated from a homogenate of adult rat cerebral cortex. Scale bar: 10 µm. (b) Western blot analysis of isolated nuclei subjected to sequential fractionation and crude membranes (P2) obtained from homogenates of rat brain cortex run in parallel. Immunoblot against binding immunoglobulin protein (BiP), nuclear pore complex (NPCx),

histone H3 and NeuN/Fox-3 was performed to analyze the suitability of the subfractionation procedure. In both, nuclear subfractions and cortical membranes, immunoblot analysis using the Af380 antibody detected a clear band of the expected molecular mass of rat diacylglycerol lipase- α (DAGL α) (115 kDa) along with several smaller molecular mass bands.

clear differences could be observed in the western blot band pattern before and after RNase A treatment (Figure S9). Moreover, NeuN-Fox3 showed an opposite behavior to that observed for histone H3, which is in agreement with previous data indicating that a portion of NeuN-Fox3 is associated with the internal ribonucleoprotein network (Dent *et al.* 2010). Finally, as previously reported (Davis and Blobel 1986), the component of the nuclear complex Nup62 was resistant to solubilization with Triton X-100 and nuclease digestion. The maintenance of Nup62 after sequential removal of the nuclear envelope and nuclease digestion also indicated that integrity of nuclei was preserved during the fractionation protocol.

In crude membranes from rat cortex (P2), the anti-DAGL α rabbit polyclonal antibody Af380 recognized a major band slightly above the 100 kDa standard (consistent with the theoretical 115 kDa molecular mass of rat DAGL α) along with a less intense band slightly above the 75 kDa standard (Fig. 3b). In isolated nuclei, anti-DAGL α antibody recognized a weak band migrating at the same size as the major band found in P2 fraction, as well as a more intense band of ~ 68 kDa. Solubilization of the nuclear envelope with the non-ionic detergent Triton X-100 led to an enrichment of both bands and to the appearance of an additional band with an apparent molecular mass of ~ 55 kDa. Nonetheless, part of the signal corresponding to the upper band was recovered in the Triton X-100 supernatant, which showed a western blot band pattern similar to that in P2 fraction (Fig. 3b). However, because the same amount of Triton X-100 soluble and insoluble protein (Nu fraction) was loaded for immunoblot analysis, whereas the yield of protein recovered was ~ 5.7-fold higher in the Nu pellet, our results reveal that only a small portion of the nuclear DAGL α was non-ionic detergent sensitive. Noticeably, treatment of nucleoids with DNase I resulted in a marked increase in immunoreactivity of the putative full-length DAGL α , whereas the intensity of the bands at ~ 68 and 55 kDa remained almost unchanged and virtually disappeared, respectively. Accordingly, no signal was recovered above 100 kDa in the DNase I supernatant, whereas the signals at ~ 68 and 55 kDa were partially and completely recovered, respectively. In contrast with the effects of DNase I extraction, no enrichment was observed for the upper putative full-length DAGL α band as a result of treatment of nucleoids with RNase A. Thus, a large portion of the DAGL α protein appeared to be removed by digestion with RNase A, as DAGL α immunoreactivity remained unaltered after the extraction of more than 50% of proteins from nucleoids. Noticeably, the signals corresponding to lower molecular mass proteins were increased after the treatment of nucleoids with RNase A (Fig. 3b). Taken together, results from both immunofluorescence microscopy and western blot analysis in nuclear subfractions are highly consistent with the localization of DAGL α to the nuclear matrix.

2-AG production in purified intact nuclei from rat brain cortex

Previous data have demonstrated that incubation of intact nuclei at 30°C generates a pool of highly polyunsaturated DAG that, importantly, derives from the hydrolysis of endogenous phosphoinositides by a nuclear phosphatidylinositol- (PtdIns) specific PLC activity (Sun *et al.* 1997; D'Santos *et al.* 1999). We hypothesized that if co-compartmentalized PtdIns-PLC and DAGL activities actually exist, we could take advantage of this procedure to assess the nuclear levels of 2-AG by LC-MS. To optimize and to protect the endogenous levels of 2-AG in basal and stimulated conditions, all the experiments were made in the presence of the following inhibitors: D-609 (10 μ M), a known inhibitor of phosphatidylcholine (PtdCho)-PLC activity; R59949 (10 μ M), an inhibitor of DAG kinase (DAGK) activity; and NAM (10 μ M), an inhibitor of MAGL activity.

To get an accurate quantification of the endogenous levels of 2-AG by liquid chromatography and mass spectrometry, we developed a strategy based on isotope dilution combined with standard addition techniques (Figure S10). To activate PLC β , we studied the 2-AG accumulation in response to incubation of nuclear preparations with the putative PLC activator of the PLC β family m-3M3FBS or calcium ions. As shown in Fig. 4, the 2-AG basal values were around 60 pmol per mg of total nuclear protein, and were stimulated (100% over basal values) by the activator of the PLC β family m-3M3-FBS. The 2-AG accumulation in basal and stimulated conditions (m-3M3FBS 10 μ M) was linear to time (0–30 min, Figure S10b) and nuclear protein concentration (data not shown). In these conditions, 2-AG accumulation was m-3M3FBS concentration dependent, allowing us to estimate an EC₅₀ of approximately 5 μ M (Fig. 4a). Interestingly, the inactive analogue of the PLC β activator o-3M3FBS, used as negative control, did not modify 2-AG basal values (Fig. 4b).

Subsequently, we examined the calcium dependence of 2-AG accumulation by buffering calcium to different levels. The effect of free Ca²⁺ on 2-AG accumulation is shown in Fig. 5. Increasing concentrations of free Ca²⁺ stimulated the 2-AG accumulation in the nuclear fraction. Significant stimulation was obtained with 100 nM Ca²⁺ and maximal activity was obtained with 3 μ M Ca²⁺, whereas 2-AG accumulation was profoundly depressed in the presence of 3 mM EGTA and no added CaCl₂ (basal conditions). As shown in Fig. 5(a), the half-maximal activation of basal 2-AG accumulation, estimated by nonlinear regression analysis, was about 350 nM free Ca²⁺.

To inhibit PLC β and DAGL activities, we used edelfosine and THA, respectively. Interestingly, although edelfosine only diminished the basal 2-AG accumulation by a 20–25%, the effects of m-3M3FBS or calcium ions were completely inhibited by the inclusion of edelfosine (10 μ M) (Figs. 4b and 5b). Furthermore, the presence of THA (10 μ M) almost

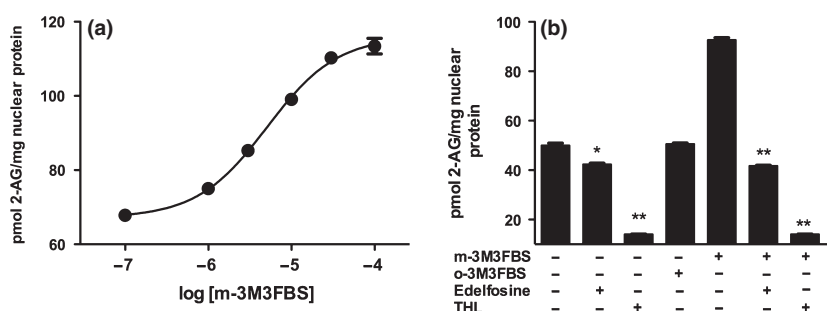


Fig. 4 (a) m-3M3FBS concentration dependence of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) accumulation over 30 min in isolated rat brain cortical nuclei. The value for 2-AG accumulation in basal conditions was 67.1 ± 0.7 pmol per mg of total nuclear protein. The m-3M3FBS compound increased 2-AG accumulation in a concentration-dependent manner: $E_{\max} = 116.1 \pm 1.0$ pmol/mg of total nuclear protein, $EC_{50} = 5.09 \pm 0.3$ μ M. (b) 2-AG accumulation in intact nuclei

from adult rat cortex over 30 min under either basal conditions or in the presence of the following compounds assayed at 10 μ M: m-3M3FBS, o-3M3FBS, edelfosine, and THL. All values are mean \pm SEM of three independent experiments done in duplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ versus corresponding basal values or m-3M3FBS values (unpaired two-tailed Student's *t*-test after significant ANOVA).

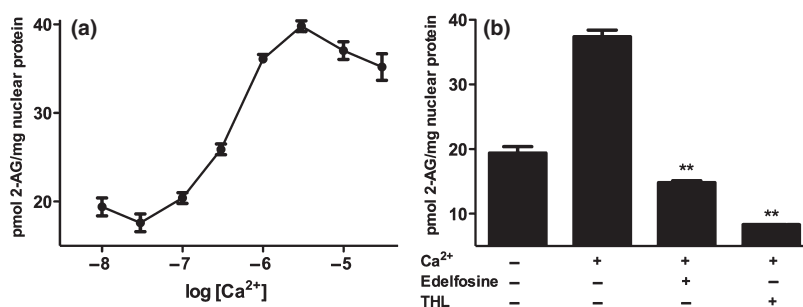


Fig. 5 (a) Calcium concentration dependence of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) accumulation over 30 min in isolated intact rat brain cortical nuclei. The value for 2-AG accumulation over 30 min in basal conditions (3 mM EGTA and no added CaCl₂) was 18.8 ± 0.7 pmol per mg of total nuclear protein. Calcium increased 2-AG accumulation in a concentration-dependent manner: $E_{\max} = 37.4 \pm 0.7$ pmol/mg of total nuclear protein, $EC_{50} = 0.357 \pm 0.08$ μ M. (b) Inhibition of the

calcium-dependent 2-AG accumulation by edelfosine and tetrahydrolipstatin (THA) in isolated rat brain cortical nuclei. Nuclei were incubated with no calcium (basal condition) or 10 μ M free calcium in either presence or absence of 10 μ M edelfosine or THL. All values are mean \pm SEM of three independent experiments done in duplicate. ** $p < 0.001$ versus corresponding basal 10 μ M free calcium values (unpaired two-tailed Student's *t*-test after significant ANOVA).

abolishes both the basal and stimulated (m-3M3FBS and Ca²⁺) 2-AG accumulation (Figs. 4b and 5b).

To provide information about the relative contribution of MAGL and DAGK activities on the observed nuclear levels of endogenous 2-AG, we performed additional experiments in which either the MAGL inhibitor NAM, the DAGK inhibitor R59949, or both were omitted. Interestingly, whereas the effect of the MAGL inhibitor alone only become evident when both inhibitors were combined, the DAGK inhibitor enhanced basal and m-3M3-FBS-stimulated 2-AG accumulation (Figure S11).

Discussion

This work provides for the first time a distribution map of DAGL α localization in neuronal nuclei from rat brain cortical neurons. In addition, this study shows useful and hitherto unknown evidence of the production of 2-AG in the

neuronal nuclear compartment, and its PLC β /DAGL α -dependent biosynthesis.

Polyclonal antibodies against different epitopes of DAGL α yielded positive immunoreactivity in cell nuclei of rat cortical sections. Interestingly, using classical paraformaldehyde fixation, other authors did not observe any nuclear DAGL α signal (Yoshida *et al.* 2006; Uchigashima *et al.* 2007; Suárez *et al.* 2011). We probed a different fixation protocol consisting of a brief perfusion with 0.37% of sodium sulfide buffer before the paraformaldehyde fixation, which has been widely used to perform Timm staining (Sloviter 1982) and described as a good method for improving immunoreactivity without compromising the immunostaining profile of different proteins (Mitchell *et al.* 1993). Here, we show that under these conditions, DAGL α immunoreactivity is greatly enhanced in subcellular localizations, which is consistent with previous reports, and becomes detectable in cortical nuclei. Moreover, lamin B1

immunoreactivity could be clearly detected only under sulfide fixation conditions. Indeed, we have previously observed (Montaña *et al.* 2012) that sulfide fixation enables detection of post-synaptic and nuclear PLC β 1 in free-floating sections, whereas immunostaining of a wide variety of cellular and subcellular markers such as NeuN/Fox-3, GFAP (Glial fibrillary acidic protein) or PSD95 is preserved or even improved.

Analysis by western blot and high-resolution fluorescence microscopy in intact nuclei revealed that DAGL α is localized to discrete subdomains of neuronal (NeuN-positive) nuclei known as nuclear speckles. This contrasts with the partition expected for the 4 TM domain-bearing DAGL α protein, whose canonical nuclear localization at the inner nuclear membrane (INM) could still explain 2-AG production in concert with PtdIns-specific PLC activity. In this regard, several models have been proposed for transmembrane (TM) protein trafficking to the INM. These involve diffusion from the endoplasmic reticulum to ONM followed by active or passive targeting to INM, with the nuclear pore acting as a gatekeeper that restricts passage at the contact region (Katta *et al.* 2014; for review). More recently, full-length cell surface receptor tyrosine kinases of the epidermal growth factor receptor family have been shown to be transported to the nucleus with additional requirements including endocytosis, endosomal sorting, and COPI (coat complex protein I) vesicle-mediate retrograde transport (Giri *et al.* 2005; Du *et al.* 2014). High-resolution microscopy analysis in intact nuclei revealed that DAGL α -immunofluorescence was largely confined to discrete domains of the nuclear matrix. Moreover, immunoblot analysis showed that the signal corresponding to the full-length DAGL α was resistant to extraction with detergent, DNase I and high salt, which is consistent with the partitioning behavior expected for a nuclear matrix protein (Berezney and Coffey 1974; Kaufmann *et al.* 1981; Barrack and Coffey 1982). Although the trafficking of TM proteins from the INM to the nucleoplasm remains largely unexplored, TM proteins could be excised from the INM by involving translocon protein-mediated mechanisms (Wang *et al.* 2010). An interesting yet speculative hypothesis is that TM proteins could be excised from the INM and translocated to the nucleoplasm by an endocytosis-like mechanism, thereby remaining membrane embedded. (Wang and Hung 2012). Whether these or other mechanisms account for nuclear matrix localization of DAGL α remains to be answered.

In addition, we detected a prominent lower molecular mass band with an approximate molecular mass of 68 kDa, which displayed opposite sensitivity to extraction by DNase I and RNase A compared with full-length DAGL α . The presence of this band could be due to proteolytic degradation during subfractionation but, alternatively, it could also result from proteolytic processing of DAGL α , leading to a C-terminal DAGL α fragment devoid of TM regions

but still retaining the catalytic domain and the potential NLS (Fig. 1a). Therefore, one could speculate that the soluble large cytoplasmic tail of DAGL α might be released by proteolytic cleavage, and then transported to the nuclear matrix using the canonical NLS-dependent import machinery. In this regard, such a mechanism has been described for the member of the epidermal growth factor family ErbB4 (Sardi *et al.* 2006).

In any case, our results clearly point at DAGL α being a component of the neuronal nuclear matrix. In addition, we show that DAGL α and potential upstream donors of DAG (PLC β 1, PLC β 2 and PLC β 4) are localized to the same discrete domains of neuronal (NeuN-positive) nuclei. Moreover, we have previously shown that PtdInsP2 colocalizes with PLC β 1 (Montaña *et al.* 2012). The localization of these components to the same subnuclear compartments raises the possibility that a PtdIns-PLC/DAGL signaling cascade could operate in the neuronal nucleus, thus adding a new element to the nuclear phosphoinositide cycle (Irvine 2003).

Our functional assay concurs in finding that in neuronal nuclei the activation of PLC β 1 is able to hydrolyze endogenous PtdIns to generate DAG that, in turn, is taken by a co-compartmentalized DAGL activity to produce 2-AG. Although, in search of one practical way to activate PLC β 1, we used the PLC activators m-3M3FBS (Bae *et al.* 2003) and calcium ions, both of which activate purified PLCs of the β , γ and δ families, our knowledge favors that are members of PLC β family which are preferentially involved in the biosynthesis of 2-AG. First, in the mammalian cerebral cortex, PLC β isozymes show a higher expression than members of the PLC γ and PLC δ families (Ross *et al.* 1989; Tanaka and Kondo 1994; Kim *et al.* 1997; Watanabe *et al.* 1998; López de Jesus *et al.* 2006; Montaña *et al.* 2012; present report). Second, the potency of m-3M3FBS and the Ca²⁺ concentration dependence of the response observed here is similar to that reported previously for the *in vitro* Ca²⁺-dependent hydrolysis of exogenous PtdInsP₂ by PLC β (Smrcka *et al.* 1991; Biddlecome *et al.* 1996) and, third, the m-3M3FBS- and Ca²⁺-stimulated 2-AG accumulation is sensitive to the synthetic lysophospholipid analogue edelfosine, which acts as a potent and selective PLC β inhibitor (Powis *et al.* 1992).

To optimize and to protect the produced 2-AG in basal and stimulated conditions, all the experiments were made in the presence of D609, a PtdCho-specific PLC inhibitor (Antmann 1996; Antony *et al.* 2001), R59949 an inhibitor of DAGK activity, and NAM, an inhibitor of MAGL activity (Burston *et al.* 2008) (see Fig. 6). Given that DAGL activity is sn-1 specific and acts on the overall pool of DAG species produced, and the occurrence of a PtdCho-specific PLC in neural cells is well established (Antony *et al.* 2000, 2001), we decided to include the compound D609 to increase the proportion of DAG species containing arachidonic acid at the sn-2 position. With the same aim, given that a high rate of

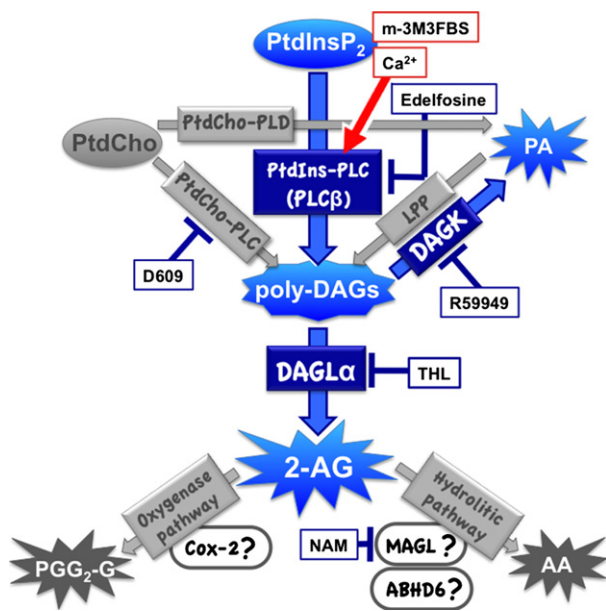


Fig. 6 Model for phospholipase C- β (PLC β)-diacylglycerol lipase- α (DAGL α) signaling cascade mediating 2-arachidonoylglycerol (2-AG) accumulation in isolated neuronal nuclei. The schematic illustration shows metabolites and pathways involved in 2-AG accumulation known to be co-compartmentalized in nuclear speckles (present study or previous reports, blue), as well as elements whose expression either in nuclei or in nuclear speckles has not been demonstrated (gray).

PA formation has been reported for neuronal nuclei from rabbit brain cortex (Baker and Chang 2001), we included R59949, an inhibitor of calcium-dependent type I DAGK isozymes (α , β and γ) *in vitro* (Jiang *et al.* 2000). Of course, other DAGK isozymes not sensitive to R59949 (Bunting *et al.* 1996; Jiang *et al.* 2000) are present in neuronal nuclei (Hozumi *et al.* 2003), but a conclusive determination of the responsible DAGK isozyme(s) was out of the scope of our study. Finally, given that the neuronal nuclear fraction has significant MAGL activity, the widely used MAGL inhibitor NAM (Burston *et al.* 2008) was included to protect produced 2-AG from hydrolysis.

In addition to DAG phosphorylation by DAGK, another source of PA could result from direct hydrolysis of PtdCho by a PtdCho-PLD (phospholipase D) activity and, given that its presence has been demonstrated in neuronal nuclei (Kanfer *et al.* 1996; Antony *et al.* 2000), the formation of DAG from PA by a lipid phosphate phosphatase coupled with a nuclear PtdCho-PLD may be relevant to explain the 2-AG basal values obtained in this work (Gaveglione *et al.* 2011). However, PtdCho contains relatively little arachidonic acid in position 2, whereas PtdIns typically contains the sn-1-stearoyl-2-arachidonoyl species (Exton 1994; Hodgkin *et al.* 1998). In any case, edelfosine (10 μ M) completely abolished m-3M3FBS- and calcium-stimulated 2-AG production, whereas it only was able to inhibit 20–25% of 2-AG basal

values. Additional pathways for 2-AG synthesis that do not involve DAGL activity have been proposed, such as generation from 2-arachidonoyl-containing phospholipids by sequential actions of phospholipase A1 and lyso-PLC, or by phosphatase-mediated conversion from 2-arachidonoyl lysophosphatidic acid (Piomelli 2003; Sugiura *et al.* 2006; Bisogno 2008). However, the fact that 2-AG accumulation (basal and stimulated by m-3M3FBS and calcium ions) was almost abolished by one recognized inhibitor of DAGL activity, THA, allows us to postulate a prominent role of the PLC β -DAGL cascade in the 2-AG production, at least in the neuronal nuclear matrix (Fig. 6).

The magnitude and time course of 2-AG signaling are thought to depend on the balance between the production and degradation of 2-AG. The most studied pathway for the control of 2-AG accumulation is via the hydrolytic enzymes that inactivate 2-AG (Karlsson *et al.* 1997; Dinh *et al.* 2002, 2004; Blankmann *et al.* 2007; Hashimoto-dani *et al.* 2007; Li *et al.* 2007; Marrs *et al.* 2010). However, although most studies have suggested that, in brain, 2-AG is degraded primarily by MAGL, there is evidence that other enzymes that can hydrolyze 2-AG are expressed in brain (Dinh *et al.* 2002, 2004; Blankmann *et al.* 2007). In particular, the recently described serine hydrolase α - β -hydrolase domain 6 (ABHD6) also controls the accumulation of 2-AG and its efficacy at cannabinoid receptors (Marrs *et al.* 2010). In this regard, our preliminary results suggest that MAGL activity is not the main responsible for 2-AG degradation in the nuclear compartment. Interestingly, when the DAGK inhibitor was omitted in our experiments a more dramatic effect was observed on 2-AG accumulation (Figure S11).

One facet of 2-AG biology now receiving increased attention is the study of 2-AG metabolism through the cyclooxygenase-2 (COX-2) pathway, with special focus on derived oxidation products, such as the cyclopentenone prostaglandins (Kozak *et al.* 2004; Surh *et al.* 2011). COX-2 is expressed by excitatory neurons at post-synaptic sites in rat cerebral cortex (Kaufmann *et al.* 1996; Slanina and Schweitzer 2005), and the COX-2 inhibition data are consistent with the hypothesis that COX-2 inactivates 2-AG and modulates its efficacy at CB1 cannabinoid receptors (Kim and Alger 2004; Slanina and Schweitzer 2005). In this sense, the cyclopentenone 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (15d-PGJ2) is particularly interesting. On one hand, it acts as a ligand for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), and increases PPAR γ transcriptional activity (Rockwell *et al.* 2008; Raman *et al.* 2011). On the other hand, the presence of an electrophilic carbon within its cyclopentene ring allows it to form covalent adducts with specific cysteine residues on proteins, and particularly with transcription factors (Surh *et al.* 2011). Therefore, diverse functions may be envisaged for nuclear DAGL α and its product 2-AG. Further research should shed

more light on the multiple emerging roles played by this highly bioactive molecule, as well as on the mechanisms that regulate DAGL α activity and localization in neuronal nuclei. Furthermore, the question of whether DAGL β acts in the nuclear compartment of adult cortical neurons must await more selective pharmacological blockers.

In conclusion, as summarized in Fig. 6, this study shows evidence for the presence of a PLC β /DAGL α -dependent mechanism for 2-AG biosynthesis in the neuronal nucleus, thus providing biochemical grounds that reinforce previous hypotheses that this monoacylglycerol might act as one of the physiological agonists at the nuclear PPAR γ receptor (Rockwell *et al.* 2006; O'Sullivan 2007) and/or as a precursor of cyclopentenone prostaglandins. In fact, recent data identify PPAR γ as a novel molecular target of nuclear PLC β 1 (Fiume *et al.* 2012). Future studies will have to be aimed at further understanding the molecular mechanisms underlying both 2-AG formation and its regulation, as well as at clarifying the physiological function of 2-AG in the neuronal nucleus and its possible coexistence with other proposed prostaglandins such as 15d-PGJ2.

Acknowledgments and conflict of interest disclosure

This work was supported by grants of the Basque Government (GIC/IT-589/13, SAIOTEK S-PE11UN124-125) and the Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental, CIBERSAM. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No potential conflicts of interest were disclosed. The authors wish to thank to Servicio General de Análisis, SGIKER for skillful technical assistance with LC-MS experiments.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Appendix S1. Supplementary Materials and methods.

Table S1. Primary antibodies used.

Table S2. Combinations of antibodies for double-immunofluorescence experiments.

Figure S1. (a) Schematic representation of the sequence of the human DAGL α protein (Uniprot, ID Q9Y4D2; available at <http://www.uniprot.org/>).

Figure S2. High-resolution fluorescence micrographs of layer V of rat somatosensory cortex double stained with different combinations of anti-DAGL α antibodies (a–d, f–i, k–n), and plots of fluorescence intensity (e, j, and o) along the white line drawn on high-magnification details of immunopositive nuclei (d, i, and n).

Figure S3. Specificity of the affinity-purified rabbit polyclonal antibody Af380 determined by preabsorption of the antibodies with the immunizing peptide (a and b) and by double immunofluorescence in HEK293 cells transiently transfected with a plasmid encoding for

the hemagglutinin-tagged (HA-tagged) human DAGL α (c–h).

Figure S4. Micrographs of adult rat cerebellum subjected to either standard (a–g) or sodium sulfide (h–n) fixation using identical imaging conditions for both tissues.

Figure S5. Micrographs of tissue sections at the level of the CA1 filed of the adult rat hippocampus subjected to either standard (a–d) or sodium sulfide (e–h) fixation, followed by double DAGL α /lamin B1-immunofluorescence combined with chromatin staining using the Hoechst's dye (blue).

Figure S6. Western blot analysis in nuclear (N) and membrane (P2) fractions obtained from homogenates of rat brain cortex.

Figure S7. A₁–C₁, A₂–C₂, A₃–C₃.

Figure S8. Specificity of the rabbit polyclonal anti-PLC β 2 and PLC β 4 antibodies.

Figure S9. Coomassie blue-stained SDS–PAGE of isolated nuclei (Nuclei) subjected to sequential fractionation by treatment with Triton X-100 (Nucleoids), followed by DNase I and high salt (Nuclear matrix) or RNase A extraction (Nucleoids RNase A).

Figure S10. (a) Illustration of the method of isotopic dilution combined with standard addition techniques to determine endogenous 2-AG levels in isolated intact rat brain cortical nuclei.

Figure S11. Basal and m-3M3FBS stimulated 2-AG accumulation in isolated rat brain cortical nuclei in the absence or presence of MAGL and DGK inhibitors.

References

- Antmann E. (1996) The antiviral, antitumoral xanthate D609 is a competitive inhibitor of phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Drugs Exp. Clin. Res.* **22**, 287–294.
- Antony P., Kanfer J. N. and Freysz L. (2000) Phosphatidylcholine metabolism in nuclei of phorbol ester activated LA-N-1 neuroblastoma cells. *Neurochem. Res.* **25**, 1073–1082.
- Antony P., Farooqui A. A., Horrocks L. A. and Freysz L. (2001) Effects of D609 on phosphatidylcholine metabolism in the nuclei of LA-N-1 neuroblastoma cells, a key role for diacylglycerol. *FEBS Lett.* **509**, 115–118.
- Bae Y. S., Lee T. G., Park J. C., Hur J. H., Kim Y., Heo K., Kwak J. Y., Suh P. G. and Ryu S. H. (2003) Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1043–1050.
- Baker R. R. and Chang H. Y. (2000) A metabolic path for the degradation of lysophosphatidic acid, an inhibitor of lysophosphatidylcholine lysophospholipase, in neuronal nuclei of cerebral cortex. *Biochim. Biophys. Acta* **1483**, 58–68.
- Baker R. R. and Chang H. Y. (2001) Phosphatidic acid is the prominent product of endogenous neuronal nuclear lipid phosphorylation, an activity enhanced by sphingosine, linked to phospholipase C and associated with the nuclear envelope. *Biochim. Biophys. Acta* **1534**, 110–120.
- Barrack E. R. and Coffey D. S. (1982) Biological properties of the nuclear matrix: steroid hormone binding. *Recent Prog. Horm. Res.* **38**, 133–195.
- Bavelloni A., Faenza I., Cioffi G., Piazzi M., Parisi D., Matic I., Maraldi N. M. and Cocco L. (2006) Proteomic-based analysis of nuclear signaling: PLC beta1 affects the expression of the splicing factor SRp20 in Friend erythroleukemia cells. *Proteomics* **6**, 5725–5734.
- Belgrader P., Siegel A. J. and Berezney R. (1991) A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix. *J. Cell Sci.* **98**, 281–291.

- Berezney R. and Coffey D. S. (1974) Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 1410–1417.
- Bertagnolo V., Mazzoni M., Ricci D., Carini C., Neri L. M., Previati M. and Capitani S. (1995) Identification of PI-PLC beta 1, gamma 1, and delta 1 in rat liver: subcellular distribution and relationship to inositol lipid nuclear signalling. *Cell. Signal.* **7**, 669–678.
- Biddlecome G. H., Berstein G. and Ross E. M. (1996) Regulation of phospholipase C- β 1 by Gq and m1 muscarinic cholinergic receptor. Steady-state balance of receptor-mediated activation and GTPase-activating protein-promoted deactivation. *J. Biol. Chem.* **271**, 7999–8007.
- Bisogno T. (2008) Endogenous cannabinoids: structure and metabolism. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 1–9.
- Bisogno T., Howell F., Williams G. *et al.* (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell Biol.* **163**, 463–468.
- Blankmann J. S., Simon G. M. and Cravatt B. F. (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* **14**, 1347–1356.
- Boronkov I. V., Loijens J. C., Umeda M. and Anderson R. A. (1998) Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3547–3560.
- Bunting M., Tang W., Zimmerman G. A., McIntyre T. M. and Prescott S. M. (1996) Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase teta. *J. Biol. Chem.* **271**, 10230–10236.
- Burston J. J., Sim-Selley L. J., Harloe J. P., Mahadevan A., Razdan R. K., Selley D. E. and Wiley J. L. (2008) N-arachidonyl maleimide potentiates the pharmacological and biochemical effects of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol through inhibition of monoacylglycerol lipase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**, 546–553.
- Cocco L., Gilmour R. S., Ognibene A., Letcher A. J., Manzoli F. A. and Irvine R. F. (1987) Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem. J.* **248**, 765–770.
- Crljen V., Visnjic D. and Banfic H. (2004) Presence of different phospholipase C isoforms in the nucleus and their activation during compensatory liver growth. *FEBS Lett.* **571**, 35–42.
- Davis L. I. and Blobel G. (1986) Identification and characterization of a nuclear pore complex protein. *Cell* **45**, 699–709.
- Dent M. A., Segura-Anaya E., Alva-Medina J. and Aranda-Anzaldo A. (2010) NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett.* **584**, 2767–2771.
- Dinh T. P., Carpenter D., Leslie F. M., Freund T. F., Katona I., Sensi S. L., Kathuria S. and Piomelli D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 10819–10824.
- Dinh T. P., Kathuria S. and Piomelli D. (2004) RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol. Pharmacol.* **66**, 1260–1264.
- Divecha N., Rhee S. G., Letcher A. J. and Irvine R. F. (1993) Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: phosphoinositidase C isoform beta 1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. *Biochem. J.* **289**, 617–620.
- D'Santos C. S., Clarke J. H., Irvine R. F. and Divecha N. (1999) Nuclei contain two differentially regulated pools of diacylglycerol. *Curr. Biol.* **9**, 437–440.
- Du Y., Shen J., Hsu J. L. *et al.* (2014) Syntaxin 6-mediated Golgi translocation plays an important role in nuclear functions of EGFR through microtubule-dependent trafficking. *Oncogene* **33**, 756–770.
- Exton J. H. (1994) Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 26–42.
- Farooqui A. A. and Horrocks L. L. A. (2005) Signaling and interplay mediated by phospholipases A2, C and D in LA-N-1 cell nuclei. *Reprod. Nutr. Dev.* **45**, 613–631.
- Farooqui A. A., Antony P., Ong W.-Y., Horrocks L. L. A. and Freysz L. (2004) Retinoic acid-mediated phospholipase A2 signaling in the nucleus. *Brain Res. Rev.* **45**, 179–195.
- Fey E. G., Krochmalnic G. and Penman S. (1986) The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J. Cell Biol.* **102**, 1654–1665.
- Fiume R., Ramazzotti G., Teti G., Chiarini F., Faenza I., Mazzotti G., Billi A. M. and Cocco L. (2009) Involvement of nuclear PLC beta 1 in lamin B1 phosphorylation and G2/M cell cycle progression. *FASEB J.* **23**, 957–966.
- Fiume R., Ramazzotti G., Faenza I., Piazza M., Bavelloni A., Billi A. M. and Cocco L. (2012) Nuclear PLCs affect insulin secretion by targeting PPAR γ in pancreatic beta cells. *FASEB J.* **26**, 203–210.
- Gao Y., Vasilyev D. V., Goncalves M. B. *et al.* (2010) Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J. Neurosci.* **30**, 2017–2024.
- García del Caño G., Montaña M., Aretxabala X., González-Burguera I., López de Jesús M., Barrondo S. and Sallés J. (2014) Nuclear phospholipase C- β 1 and diacylglycerol LIPASE- α in brain cortical neurons. *Adv. Biol. Regul.* **54**, 12–23.
- Gaveglia V. L., Pasquaré S. J. and Giusto N. M. (2011) Metabolic pathways for the degradation of phosphatidic acid in isolated nuclei from cerebellar cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 271–280.
- Giri D. K., Ali-Seyed M., Li L. Y., Lee D. F., Ling P., Bartholomeusz G., Wang S. C. and Hung M. C. (2005) Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol. Cell Biol.* **25**, 11005–11018.
- Hashimoto Y., Ohno-Shosaku T., Tsubokawa H., Ogata H., Emoto K., Maejima T., Araishi K., Shin H. S. and Kano M. (2005) Phospholipase C β serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* **45**, 257–268.
- Hashimoto Y., Ohno-Shosaku T. and Kano M. (2007) Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J. Neurosci.* **31**, 1211–1219.
- Hodgkin M. N., Pettitt T. R., Martin A., Mitchell R. H., Pemberton A. J. and Wakelam M. J. (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 200–204.
- Hozumi Y., Ito T., Nakano T., Nakagawa T., Aoyagi M., Kondo H. and Goto K. (2003) Nuclear localization of diacylglycerol kinase zeta in neurons. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 1448–1457.
- Irvine R. F. (2003) Nuclear lipid signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 349–360.
- Jiang Y., Sakane F., Kanoh H. and Walsh J. P. (2000) Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor R59949 among diacylglycerol kinase subtypes. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 763–772.
- Jung K. M., Mangieri R., Stapleton C., Kim J., Fegley D., Wallace M., Mackie K. and Piomelli D. (2005) Stimulation of endocannabinoid formation in brain slice cultures through activation of group I metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1196–1202.

- Jung K. M., Astarita G., Zhu C., Wallace M., Mackie K. and Piomelli D. (2007) A key role for diacylglycerol lipase- α in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization. *Mol. Pharmacol.* **72**, 612–621.
- Kanfer J. N., McCartney D., Singh I. N. and Freysz L. (1996) Phospholipase D activity in rat brain neuronal nuclei. *J. Neurochem.* **67**, 760–766.
- Karlsson M., Contreras J. A., Hellman U., Tornqvist H. and Holm C. (1997) cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases and haloperoxidases. *J. Biol. Chem.* **272**, 27218–27223.
- Katona I., Urban G. M., Wallace M., Ledent C., Jung K. M., Piomelli D., Mackie K. and Freund T. F. (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* **26**, 5628–5637.
- Katta S. S., Smoyer C. J. and Jaspersen S. L. (2014) Destination: inner nuclear membrane. *Trends Cell Biol.* **24**, 221–229.
- Kaufmann S. H., Coffey D. S. and Shaper J. H. (1981) Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope, and pore complex lamina. *Exp. Cell Res.* **132**, 105–123.
- Kaufmann W. E., Worley P. F., Pegg J., Bremer M. and Isakson P. (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 2317–2321.
- Kim J. and Alger B. E. (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat. Neurosci.* **7**, 697–698.
- Kim D., Jun K. S., Lee S. B., Kang N. G., Min D. S., Kim Y. H., Ryu S. H., Suh P. G. and Shin H. S. (1997) Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* **389**, 290–293.
- Kim J., Isokawa M., Ledent C. and Alger B. E. (2001) Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J. Neurosci.* **22**, 10182–10191.
- Kozak K. R., Prusakiewicz J. L. and Marnett L. J. (2004) Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 659–667.
- Lafourcade M., Elezgarai I., Mato S., Bakiri Y., Grandes P. and Manzoni O. J. (2007) Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS ONE* **8**, e709.
- Li W., Blankman J. L. and Cravatt B. F. (2007) A functional proteomic strategy to discover inhibitors for uncharacterized hydrolases. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 9594–9595.
- López de Jesús M., Zalduogui A., Ruiz de Azúa I., Callado L. F., Meana J. J. and Sallés J. (2006) Levels of G-protein α q/11 subunits and of phospholipase C- β (1-4), - γ , and - δ 1 isoforms in postmortem human brain caudate and cortical membranes: potential functional implications. *Neurochem. Int.* **49**, 72–79.
- Marrs W. R., Blankman J. L., Horne E. A. *et al.* (2010) The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat. Neurosci.* **8**, 951–957.
- Martelli A. M., Gilmour R. S., Bertagnolo V., Neri L. M., Manzoli L. and Cocco L. (1992) Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C β in Swiss 3T3 cells. *Nature* **358**, 242–245.
- Mitchell J., Best N., Sundstrom L. E. and Wheal H. V. (1993) The use of sodium sulphide-fixed brain tissue for immunocytochemical staining of activated microglia and reactive astrocytes. *Histochemistry* **99**, 91–94.
- Montaña M., García del Caño G., López de Jesús M., González-Burguera I., Echezarra L., Barrondo S. and Sallés J. (2012) Cellular neurochemical characterization and subcellular localization of phospholipase C- β 1 in rat brain. *Neuroscience* **222**, 239–268.
- Ohno-Shosaku T., Shosaku J., Tsubokawa H. and Kano M. (2002) Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 953–961.
- Ohno-Shosaku T., Matsui M., Fukudome Y., Shosaku J., Tsubokawa H., Taketo M. M., Manabe T. and Kano M. (2003) Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 109–116.
- Osborne S. L., Thomas C. L., Gschmeissner S. and Schiavo G. (2001) Nuclear PtdIns (4,5) P2 assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J. Cell Sci.* **114**, 2501–2511.
- O’Sullivan S. E. (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 576–582.
- Payraastre B., Nievers M., Boonstra J., Breton M., Verkleij A. J. and van Bergen en Henegouwen P. M. (1992) A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase and phospholipase C in the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **267**, 5078–5084.
- Piomelli D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 873–884.
- Powis G., Seewald M. J., Gratas C., Melder D., Riebow J. and Modest E. J. (1992) Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. *Cancer Res.* **52**, 2835–2840.
- Raman P., Kaplan B. L. F., Thompson J. T., Vanden Heuvel J. P. and Kaminski N. E. (2011) 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 glycerol ester, a putative metabolite of 2-arachidonoyl glycerol, activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Pharmacol.* **80**, 201–209.
- Ren X., Harms J. S. and Splitter G. A. (2001) Bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22 interacts with histones, and the carboxyl terminus of VP22 is required for nuclear localization (2001). *J. Virol.* **75**, 8251–8258.
- Rockwell C. E., Snider N. T., Thompson J. T., Vanden Heuvel J. P. and Kaminski N. E. (2006) Interleukin-2 suppression by 2-arachidonoylglycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol. Pharmacol.* **70**, 101–111.
- Rockwell C. E., Raman P., Kaplan B. L. and Kaminski N. E. (2008) A COX-2 metabolite of the endogenous cannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol, mediates suppression of IL-2 secretion in activated Jurkat T cells. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 353–361.
- Ross C. A., MacCumber M. W., Glatt C. E. and Snyder S. H. (1989) Brain phospholipase C isozymes: differential mRNA localizations by in situ hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 2923–2927.
- Sardi S. P., Murtie J., Koirala S., Patten B. A. and Corfas G. (2006) Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell* **127**, 185–197.
- Schulte K., Steingrüber N., Jergas B., Redmer A., Kurz C. M., Buchalla R., Lutz B., Zimmer A. and Schlicker E. (2012) Cannabinoid CB1 receptor activation, pharmacological blockade, or genetic ablation affects the function of the muscarinic auto- and heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **385**, 385–396.
- Slanina K. A. and Sweitzer P. (2005) Inhibition of cyclooxygenase-2 elicits a CB1-mediated decrease of excitatory transmission in rat CA1 hippocampus. *Neuropharmacology* **49**, 653–659.

- Sloviter R. S. (1982) A simplified Timm stain procedure compatible with formaldehyde fixation and routine paraffin embedding of rat brain. *Brain Res. Bull.* **8**, 771–774.
- Smrcka A. V., Hepler J. R., Brown K. O. and Sternweis P. C. (1991) Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* **251**, 804–807.
- Stella N., Schweitzer P. and Piomelli D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**, 773–778.
- Suárez J., Ortíz O., Puente N., Bermúdez-Silva F. J., Blanco E., Fernández-Llebrez P., Grandes P., Rodríguez de Fonseca F. and Moratalla R. (2011) Distribution of diacylglycerol lipase alpha, an endocannabinoid synthesizing enzyme, in the rat forebrain. *Neuroscience* **192**, 112–131.
- Sugiura T., Kishimoto S., Oka S. and Gokoh M. (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog. Lipid Res.* **45**, 405–446.
- Sun B., Murray N. R. and Fields A. P. (1997) A role for nuclear phosphatidylinositol-specific phospholipase C in the G2/M phase transition. *J. Biol. Chem.* **272**, 26313–26317.
- Surh Y. -J., Na H. -K., Park J. -M., Lee H. -N., Kim W., Yoon I. -S. and Kim D. -D. (2011) 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 1335–1351.
- Tabellini G., Bortul R., Santi S. *et al.* (2003) Diacylglycerol kinase-theta is localized in the speckle domains of the nucleus. *Exp. Cell Res.* **287**, 143–154.
- Tanaka O. and Kondo H. (1994) Localization of mRNAs for three novel members (beta3, beta4 and gamma2) of phospholipase C family in mature rat brain. *Neurosci. Lett.* **182**, 17–20.
- Tanimura A., Yamazaki M., Hashimoto Y. *et al.* (2010) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* **65**, 320–327.
- Thompson R. J. (1973) Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex. *J. Neurochem.* **21**, 19–40.
- Uchigashima M., Narushima M., Fukaya M., Katona I., Kano M. and Watanabe M. (2007) Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J. Neurosci.* **27**, 3663–3676.
- Wang Y. N. and Hung M. C. (2012) Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci.* **2**, 13.
- Wang Y. N., Yamaguchi H., Huo L., Du Y., Lee H. J., Lee H. H., Wang H., Hsu J. M. and Hung M. C. (2010) The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **285**, 38720–38729.
- Watanabe M., Nakamura M., Sato K., Kano M., Simon M. I. and Inoue Y. (1998) Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase C beta in mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 2016–2025.
- Yoshida T., Fukaya M., Uchigashima M., Kamiya H., Kano M. and Watanabe M. (2006) Localization of diacylglycerol lipase-alpha around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J. Neurosci.* **26**, 4740–4751.
- Yoshida T., Uchigashima M., Yamasaki M., Katona I., Yamazaki M., Sakimura K., Kano M., Yoshioka M. and Watanabe M. (2011) Unique inhibitory synapse with particularly rich endocannabinoid signaling machinery on pyramidal neurons in basal amygdaloid nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 3059–3064.
- Yoshino H., Miyamae T., Hansen G. *et al.* (2011) Postsynaptic diacylglycerol lipase mediates retrograde endocannabinoid suppression of inhibition in mouse prefrontal cortex. *J. Physiol.* **589**, 4857–4884.
- Zini N., Mazzoni M., Neri L. M., Bavelloni A., Marmiroli S., Capitani S. and Maraldi N. M. (1994) Immunocytochemical detection of the specific association of different PIC isoforms with cytoskeletal and nuclear matrix compartments in PC12 cells. *Eur. J. Cell Biol.* **65**, 206–213.

