

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

FARMAKOLOGIA SAILA

Fosfolipasa C β 1a/b-ren papera giza jatorrizko NTera2/D1 zelulen ziklo zelularren G1 fasearen modulazioan. Ekintza mekanismo potentziala desberdintze neuronal zuzentzeko.

AMAIA ISASTI IRIBAR

Vitoria-Gasteiz, 2021

Finantzazioa: Tesi hau EHU/UPVko Ikertzaileak Prestatzeko Kontratazio Deialdiko (2015) laguntzarekin egin da.

AURKIBIDEA

I. SARRERA	1
1. FOSFOINOSITIDOEKIKO ESPEZIFIKOA DEN FOSFOLIPASA Cβ (PLC β)..	3
1.1. PLC β FAMILIAKO ENTZIMEN EGITURA DOMEINUAK ETA HAUEN EKINTZAK.	5
1.1.1. PLC β isoentzimaren egitura zentrala	6
1.1.2. PLC β isoentzimaren C-Ternaleko domeinua (CTD). PLC β 1a/b splicing aldaerak.....	8
1.2. PLC β 1a/b-REN ZELULA BARNEKO KOKAPENA: PLCB1a/b NUKLEARRA	10
2. PLCβ1-AREN PAPERA ZELULAREN PROLIFERAZIOAN ETA DESBERDINTZAPEN NEURONALEAN	16
2.1. ZELULA EUKARIOTEN ZIKLO ZELULARRA ETA BERE ERREGULATZAILEAK.....	16
2.2. PLC β 1 ETA PROLIFERAZIOAREN ESTIMULUA	18
2.3. PLC β 1-AREN PAPERA DESBERDINTZAPEN NEURONALEAN.....	20
2.3.1. NSZ-ren garapeneko Neurogenesisia	20
2.3.2. PLC β 1-aren papera Neurogenesian	23
2.3.3. PLC β 1aren papera Desberdintzapen Neuronalean.....	25
II. HELBURUAK	29
III. MATERIALA	35
1. MATERIAL OROKORRA	37
2. MATERIAL ESPEZIFIKOA	37
2.1. ZELULA KULTURA	37
2.1.1. Erabili eta botatzekoak.....	37
2.1.2. Transfekzio medioak.....	38
2.1.3. Kultura medioak, osagarriak eta bestelako produktuak	38
2.2. Western Blot	39
2.3. Antigorputzak	39
2.3.1. Antigorputz primarioak.....	39
2.3.2. Immunofluoreszentziarako antigorputz sekundarioak eta fluoreszentziadun tindatzaileak	41
2.3.3. Western Blotterako antigorputz sekundarioak.....	41
2.3.4. Serum normalak	41
2.4. Biologia molekularra.....	41
2.4.1. Agarosa geleko elektroforesia.....	41
2.4.2. Bakterioen kultura.....	42

2.4.3. DNA purifikazioa	42
2.4.4. PCR eta klonajea	42
2.4.4.1. Errestrikzio entzimak (New England BioLabs, NEB).....	42
2.4.4.2. Errestrikzio entzimen bufferrak.....	43
2.4.5. Erabilitako DNA konstruktoak.....	43
IV. METODOAK.....	45
1. NT2 ZELULEN KULTURA, TRANSFEKZIO ETA DESBERDINTZAPENA....	47
1.1. NT2 ZELULEN KULTURA.....	47
1.2. TRANSFEKZIOA.....	47
1.2.1. DNA transfekzioa.....	47
1.2.2. siRNA transfekzioa	47
1.2.3. AraC bidezko NT2-en desberdintzapena.....	48
2. AHNSC-EN ISOLAMENDU, KULTURA ETA DESBERDINTZAPENA	48
2.1. AHNSC-EN ISOLAMENDUA.....	48
2.2. AHNSC-EN KULTURA.....	48
2.3. AHNSC-EN DESBERDINTZAPENA	49
3. IMMUNOFLUORESZENTZIA ENTSEGUAK	49
3.1. FIXAPENA	49
3.2. BRDU ANTIGENOAREN BERRESKURATZEA.....	49
3.2.1. IMMUNOFLUORESZENTZIA	49
3.2.2. MIKROSKOPIO BIDEZKO LAGINEN AZTERKETA.....	50
4. ZIKLO ZELULARRAREN ZINETIKA	51
4.1. NT2-EN NUKLEOKO BRDU METAKETAREN AZTERKETA. ZIKLO OSOAREN ETA S FASEAREN IRAUPENA.	51
4.2. FOSFOHISTONA 3-REN (PH3) MARKAKETAREN AZTERKETA. M FASEAREN ETA G2 FASEAREN IRAUPENEN KALKULUA	52
5. WESTERN BLOT.....	55
5.1. ZELULA HOMOGENATUEN PRESTAKETA	55
5.2. PROTEINA KUANTIFIKAZIOA ZELULA LAGINETAN: AZIDO BIZINKONINIKOAREN ENSTEGUA (BCA).....	55
5.3. LAGINEN PRESTAKETA ETA ELEKTROFORESIA	56
5.4. TRANSFERENTZIA ETA IMMUNOBLOT-A.....	57
5.5. Detekzioa.....	57
6. KLONAJEA.....	57
6.1. Prozedura orokorrak	58

6.1.1. Elektroforesia agarosa gelean.	58
6.1.2. DNA purifikazioa agarosa geleko elektroforesiaren ondoren.....	58
6.1.3. Plasmidoen transformazioa zelula kimikoki konpetenteetan	59
6.1.4. Plasmidoen anplifikaziorako bakterioen hazkuntza.....	59
7. PLCβ1a/b-aren lokalizazio nuklearreko mutanteen (M2b) eraketa.	59
7.1. Primerren diseinua eta overlap PCR	60
7.2. PCR produktua pCR-Blunt II klonaziorako bektorean txertatzea.....	62
7.3. pcDNA-PLC β 1 eta pCR-BluntII-M2b-ren digestioa.	62
7.4. Ligazioa.....	63
8. qPCR.....	64
9. Analisi estatistikoa	65
V. EMAITZAK	67
1. PLCβ1a/b-REN ESPRESIOA HELDUAROKO HIPOKANPOKO AMA ZELULA NEURONALEN DESBERDINTZE PROZESUAN	69
1.1. PLCB1a/b-ren mRNA mailen analisisa AHNSC-en desberdintze prozesuan	69
1.2. Immunofluoreszentzia bikoitzaren bidezko PLCB1-aren espresioaren analisisa AHNPC zelulen desberdintze prozesuan	71
2. PLCβ1-AREN PAPERAZIKLO ZELULARREAN.....	74
2.1. PLC β 1-REN GENE ISILPENAK NT2-EN ZIKLO ZELULARRAREN ZINETIKAN DUEN ERAGINA	75
2.1.1. BrdU metaketaren analisisa: T _C , T _S eta T _{G1+G2+M} parametroen kalkulua.....	75
2.1.1.1. BrdU metaketaren analisirako doikuntza entseguak: BrdU dosia eta markaketaren profila	75
2.1.1.2. BrdU metaketaren analisirako doikuntza entseguak: BrdU pulsuak.....	76
2.1.1.3. BrdU metaketaren azterketa PLC β 1 gene isilpena eragindako NT2-etan. 78	
2.1.2. T _{G2} eta T _M parametroen kalkulua PH3 markaketaren bidez.....	80
2.1.2.1. Hazkuntza faktorea	80
2.1.2.2. Indize mitotikoa	80
2.1.2.3. PH3-ren markaketaren azterketatik lortutako kurben analisisa	81
2.1.3. PLC β 1-aren isilpenaren eragina NT2 zelulen ziklo zelularren zinetikan: T _{G1} , T _S , T _{G2} , T _M eta T _C parametroen bateratzea.....	83
2.2. PLC β 1a ETA PLC β 1b-AREN GAINESPRESIOAREN ERAGINA NT2 ZELULEN ZIKLO ZELULARRAREN ZINETIKAN.	84
2.2.1. Proliferazio gaitasunaren azterketa	84
2.2.1.1. Ki67.....	84

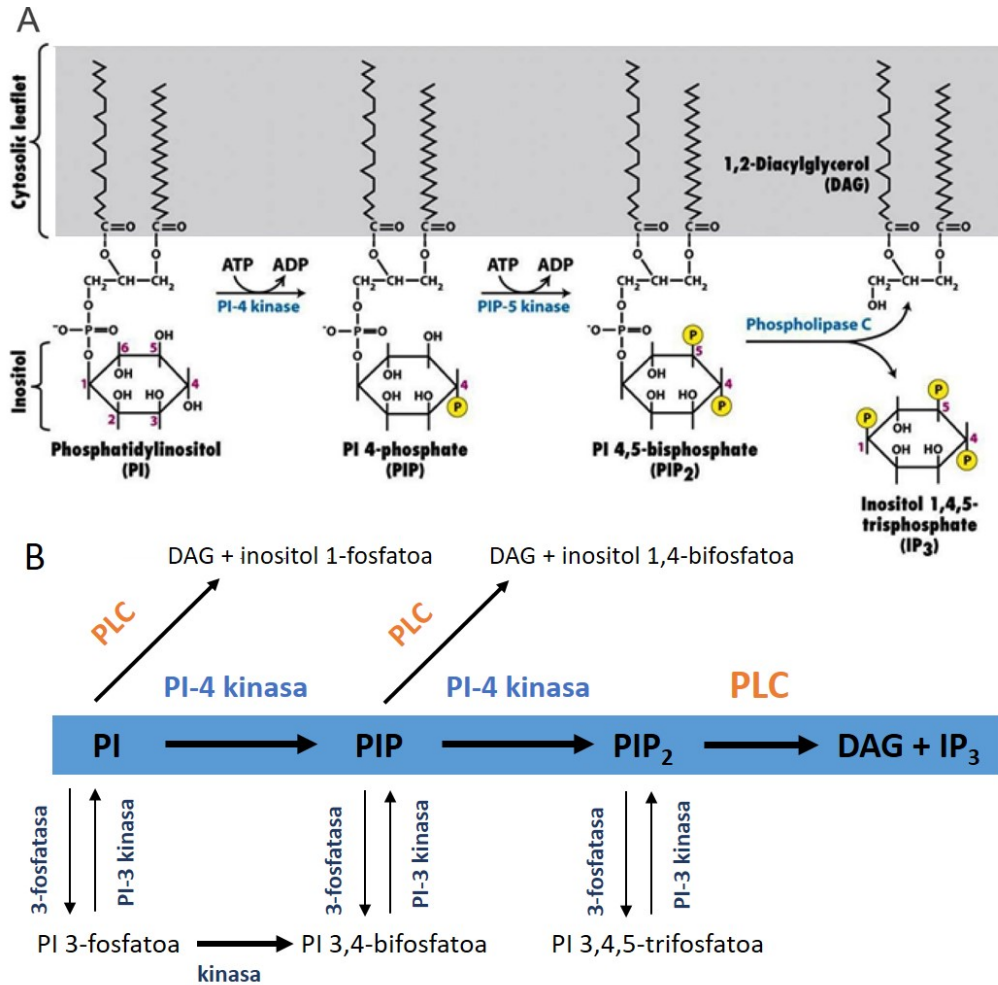
2.2.1.2. BrdU	87
2.3. PLCB1A/B-ren KOKAPEN NUKLEARREKO MUTANTEEN GAINESPRESIOAREN ERAGINA NT2 ZELULEN ZIKLOAREN ZINETIKAN. ...	89
2.3.1. PLCβ1-M2b konstruktuen balioztatzea.....	89
2.3.2. Proliferazio gaitasunaren azterketa PLCβ1a/b-aren kokapen nuklearreko mutanteak gainespresatzen duten NT2 zeluletan.....	91
2.3.2.1. Ki67.....	91
2.3.2.2. BrdU	93
3. PLCβ1-AREN PAPER A NT2-EN DESBERDINTZE PROZESUAN.....	95
3.1. PLCB1A ETA PLCB1B-AREN GAINESPRESIOAREN ERAGINA NT2 ZELULEN MORFOLOGIA ETA MARKATZAILE NEURONALEN ESPRESIOAN	95
3.1.1. PLCβ1a edo PLCβ1b gainespresatutako NT2 zelulek pairatzen dituzten aldaketen analisi morfologikoa.....	95
3.1.2. PLCβ1a edo PLCβ1b gainespresatutako NT2 zelulen markatzaile neuronalen espresioaren analisisa.....	97
3.2. PLCB1A ETA PLCB1B-AREN KOKAPEN NUKLEARREKO MUTANTEEN GAINESPRESIOAREN ERAGINA MARKATZAILE NEURONALEN ESPRESIOAN.....	100
3.3. PLCB1-AREN GENE ISILPENAREN ERAGINA ARAC-K BIDERATUTAKO NT2 ZELULEN DESBERDINTZE PROZESUAN.	103
3.3.1. siRNA bidezko PLCβ1-aren isilpena	103
3.3.2. shRNA bidezko PLCβ1-aren isilpena	104
VI. EZTABAIDA	107
1. PLCβ1-aren espresio mailak handituta daude saguen hipokanpoko hortz bihurguneko AHNSC zelulen desberdintzapen prozesuan.	109
2. PLCβ1-ak NT2 zelulen ziklo zelularraREN zinetikan eragiten du.....	112
3. PLCβ1a/b-REN PAPER A NT2 ZELULEN DESBERDINTZE PROZESUAN ...	118
VII. ONDORIOAK	123
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	127

I. SARRERA

1. FOSFOINOSITIDOEKIKO ESPEZIFIKOA DEN FOSFOLIPASA CB (PLC B)

Mintza plasmatikoko hartzaileek, bertako edo zitosoleko entzimen aktibitatea erregulatu dezakete zuzenki edo zeharka, eta honela, seinalea amplifikatzea helburu duten transdukzio sistemak jartzen dira abian. Entzima hauek, erreakzio substratu eta produktuen (bigarren mezulariak) zelula barneko kontzentrazioen aldaketa eragiten dituzte, modu oso azkarrean. Horrela, zelulaz kanpoko seinalea erantzun fisiologiko espezifikoa eragin ditzaken zelula barneko seinalean bilakatzen da. Mintz plasmatikoa dauden entzima guztien artean bi proteina familia dira zelula barneko komunikazio prozesuetan garrantzi berezia dutenak: adenilato ziklasa eta fosfoinositidoekiko espezifikoa den C fosfolipasa.

Fosfoinositidoekiko espezifikoa den C fosfolipasak (PIC edo PI-PLC ingelesezko deiturengatik; hemendik aurrera PLC erabiliko dugu hidrolisiaren testuinguruan ariko baikara beti) efektore bezala funtzionatzen du, askotariko estimulu fisiologiko (hormonak, neurotransmisoreak, hazkuntza faktoreak, immunoglobulinak etab.) hainbat erantzun zelularrekin lotzen, G proteinei lotutako hartzaileak (GPCR) aktibatzean, esaterako. PLC guztiek, aktibatzean, mintz plasmatikoko fosfatidil inositol 4,5-bifosfatoa (PIP₂) hidrolizatzen dute, glizerolaren hirugarren posizioan (sn-3) fosfodiester lotura apurtuz. Lotura apurtzearen ondorioz, bi bigarren mezulari sortzen dira; inositol 1,4,5-trifosfatoa (Ins 1,4,5-P₃ edo IP₃) eta diasilglizerola (DAG). IP₃-a solugarria da uretan eta erretikulu endoplasmatikoko hartzaileekin bat egitean, kaltzioa zelula barneko konpartimentuetatik askatzea eragiten du. DAG-a hidrofobikoa da eta mintz plasmatikoa barneko geruzan geratzen da. Bertan, proteina kinasa C-ren (PKC) hainbat isozima aktiba ditzake (1,2).



S.1.1. irudia: **A.** Fosfoinositidoen fosforilazioaren, PIP₂-aren hidrolisiaren eta honen produktuen (DAG eta IP₃) eskema. **B.** Fosfoinositidoen gainerako bide metaboliko posibleak eta 3-fosfatasa, PI-3 kinasa, PI-4 kinasa eta PLC entzimen aktibitatea. Lodish eta kolaboratzaileen (2000) lanetik moldatua.

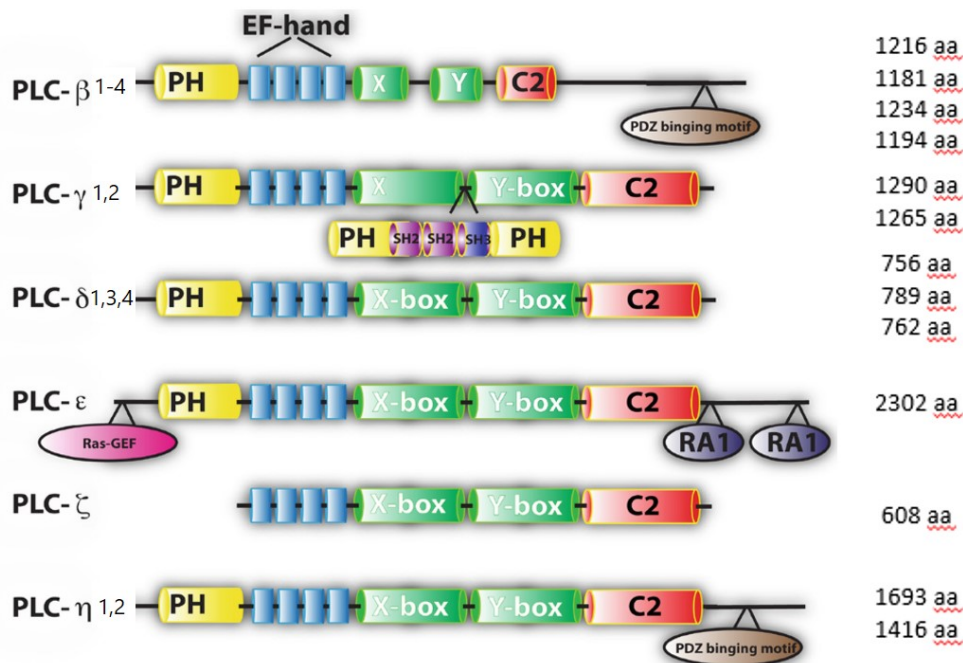
Azken urteetan, fosfoinositidoen sintesi eta hidrolisi zikloa zelularen nukleoan ere gertatzen dela, eta mintz zelularreko zikloarekiko independentea denaren ebidentzia argiak daude.

Smith eta Wells-ek (1983) deskribatu zuten lehen aldiz nukleoko fosfoinositidoen metabolismoa. Ondoren, Cocco eta kolaboratzaileek (1987), mintzik gabeko nukleoak fosfatidil inositol 4-fosfato (PIP) eta PIP₂ in vitro sintetizatzeko gai zirela frogatu zuten eta ondorioz, fosfoinositidoen metabolismoa nukleo barneko domeinuetan ere gertatzen zela (3,4). Egun, kokapen nuklear honen paper fisiologikoa guztiz definituta egon ez arren, ezaguna da fosfoinositidoen zikloko partaide askok (PIP₂ eta beste inositol fosfato batzuk) hainbat erantzun zelularretan parte hartzeaz gain, pre-mRNA-ren splicing prozesuan eta zelulen

desberdintze, proliferazio eta minbizi zelulen transformazioan ere inplikaturik daudela ikusi da (5,6).

1.1. PLC β FAMILIAKO ENTZIMEN EGITURA DOMEINUAK ETA HAUEN EKINTZAK.

Fosfoinositidoekiko espezifikoa den C fosfolipasa aktibitatea duten entzimen taldea oso anitza da bere egiturari eta banaketa zelularrari dagokionean. Egun, 13 PLC isoforma ezberdin ezagutzen dira ugaztunetan, splicing aldaerak kontuan izan gabe, eta 5 familiatan sailkatuta daude: lau PLC β , bi PLC γ , hiru PLC δ , bi PLC η , PLC ζ eta PLC ϵ (7–14). Hasiera batean, PLC α isoforma ere deskribatu zen baina PLC δ 1en atal proteolitikoa zela ohartu ziren aurrerago (15,16). PLCren isoforma hauek tamaina desberdina izan arren, guztien aminoazido sekuentzia oso antzekoa da.



S.1.2. irudia: PLC isozima familien domeinu funtzional eta egiturazkoen eskema orokorra eta entzima mota bakoitzaren sekuentziaren aminoazido kopurua. Guztiek dituzte komunean PH, EF esku, X-Y domeinu katalitiko eta C2 domeinuak. Bill C.A. eta Vines C.M. (2020) lanetik moldatuta.

PLC isoforma guztietan oso kontserbatuta dagoen aminoazido sekuentzia honetan lau domeinu nagusi desberdintzen dira: plekstrinaren homologia domeinua (PH), bata bestearen atzean doazen lau EF esku, triosa fosfato isomerasa (TIM)

SARRERA

motako domeinua, X eta Y izeneko bi zatik eta hauek lotzen dituen lotura guneak (X-Y lokailuak), eta C2 domeinua. TIM upelak izan ezik, gainontzeko domeinuek ohikoak ez diren funtzioak dituzte PLC proteinetan. PH domeinua, esaterako, afinitate eta espezifikotasun handiz lotzen da PIP2-ra. EF eskuek, bestalde, GPCR-en aktibazioaren ondorengo guanosina trifosfatoaren (GTP) hidrolisia gertatzeko euskarri funtzioa dute. C2 domeinuak hainbat seinaleztapen prozesutan parte hartzen du (16,17).

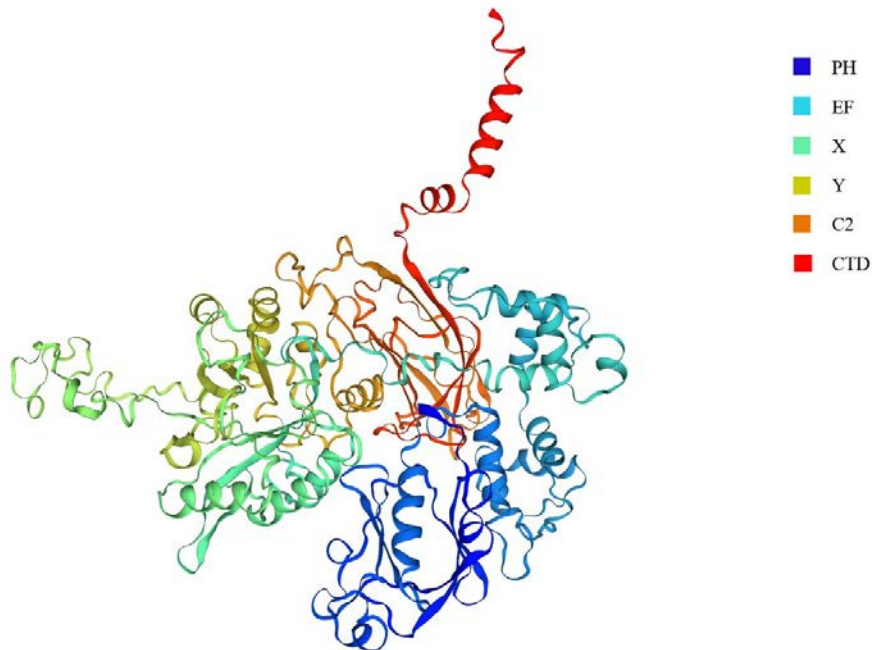
1.1.1. PLC β isoentzimaren egitura zentrala

PLC β proteinen egitura zentralak, gainontzeko PLC-etan ere aurkitzen diren domeinuz osatuta dago: PH domeinua, EF esku domeinua, X eta Y-k osatutako domeinu katalitikoa (TIM upela) eta C2 domeinua. PH domeinua bata bestearen gainean dauden zazpi β -laminaz osatutako sandwich modukoa da, alde batean C-terminaleko aminoazidoak dituen α -helize egituran eta tamaina eta aminoazido sekuentzia desberdinez osatutako hiru bihurgune dituen beste aldean (18). PLC δ isoformako domeinu hau PIP2-ri espezifikotasun eta afinitate handiz lotzen den arren, funtzio hori betetzen duten aminoazido gehienak falta dira PLC β -n eta ondorioz, loturaren afinitatea eta espezifikotasuna nabarmenki txikiagoak dira (19,20). Gainera, PH domeinua EF eta TIM domeinuaren X atalarekin kontaktu hertsian dagoenez, mintzeko lipidoekiko elkarrekintzek gune katalitikoaren orientazioa guztiz aldatuko luketela uste da (17,21–24).

Ohiko EF esku domeinuek bezala, PLC β -ko **EF domeinuek** Ca²⁺ lotzeko diseinatuta dauden bi helize dituzte (E eta F), lobulu itxurakoak, eta elkarri lotzeko bihurgune bat erdian (25). Alabaina, PLC isozimetako domeinu hauetan Ca²⁺ lotzen ez dela frogatu da. Izan ere, Waldo eta kolaboratzaileek PLC β familiako proteinen EF domeinuek G proteinen menpeko seinaleztapen bidean parte hartzen zutela deskribatu zuten (23). Ugaztunen lau PLC β isozimen hirugarren eta laugarren EF zatien artean dagoen kasetea da horren erantzulea, G α_q -ren aktibazio bidez ematen den GTP-ren hidrolisia estimulatuzko beharrezko egitura baitago bertan.

C2 domeinua, 8 β -lamina antiparalelotan tolesten da eta hiru bihurgune ditu katearen amaieretako batean, kaltzioaren lotura guneak eratzen dituen (26). TIM domeinuari hertsiki loturik dago, berarekin erabat paketatuz, gune katalitikoaren

osotasuna mantentzeko (21,27). Domeinu honen jarraian (C-terminalean) dauden aminoazidoek H α 1/H α 2 izeneko azalera handiko egitura osatzen dute eta G α q-rekin lotzeko kontaktu gune asko daude bertan. H α 1/H α 2 egitura soilik PLC β familiako entzimetan aurki dezakegu, hauek baitira G α q-rekin aktibatzen diren PLC motako isoentzima bakarrak. Era berean, C2 domeinuaren N-terminaleko sekuentzia zatia ere lotzen da G α q-ra (23,28).



S.1.3. irudia: PLC β 1a-aren hiru dimentsiotako egitura. Bertan agertzen dira PH domeinua N-terminalea, lau EF-esku bata bestearen jarraian, TIM upel katalitiko (X eta Y domeinuek eta hauen arteko lokailuak osatua), C2 domeinua eta C-terminaleko domeinua. Swiss model modelizazio web orritik moldatua.

Arestian aipatu bezala, **TIM domeinua** X eta Y izeneko bi erdiz eta hauek lotzen dituen X-Y lokailuaz osatuta dago eta entzimaren domeinu katalitikoa osatzen dute. Proteina osoan gehien kontserbatzen den domeinua da, izan ere, sekuentziaren %60-70a berdina da PLC entzima guztietan. X eta Y domeinuen sekuentziak, α -helize egitura hartzen du kanpoaldean eta β -laminak osatzen ditu barnealdean. Horrela egituratzen da lipasa funtzioa duen gune aktiboa. Barnealdean dauden Leu320, Tyr358, Phe360, Leu529 eta Trp555 aminoazido hondarrak hidrofobikoak direnez, mintzean erraztasun handiz txertatzen da domeinu

katalitikoa, PLC δ 1-an ikusi den bezala (27,29). Gune honetako aminoazido sekuentzia berdina da PLC isozima guztietan eta ondorioz, egitura honen orientazioa berdina dela pentsa daiteke.

X-Y lokailuak, bestalde, luzera eta ordena maila desberdinak ditu deskribatutako 4 PLC β -tan. Hala ere, lokailuaren C-terminaleko 12 aminoazidoek egitura berdina dute PLC β guztietan. Zati hau, entzimaren gune aktiborekin elkarrekintzan dagoena dela deskribatu da (22,23). PLC isoformetan egindako ikerketa biokimikoen emaitzek, X-Y lokailuak autoinhibizio funtzioa duela frogatu zuten, lokailuaren sekuentzian egindako aldaketa ezberdinek (delezioak, mutazioak,...) entzimaren aktibitatea nabarmenki igotzen dutela ikusi baita (22,23,30–35).

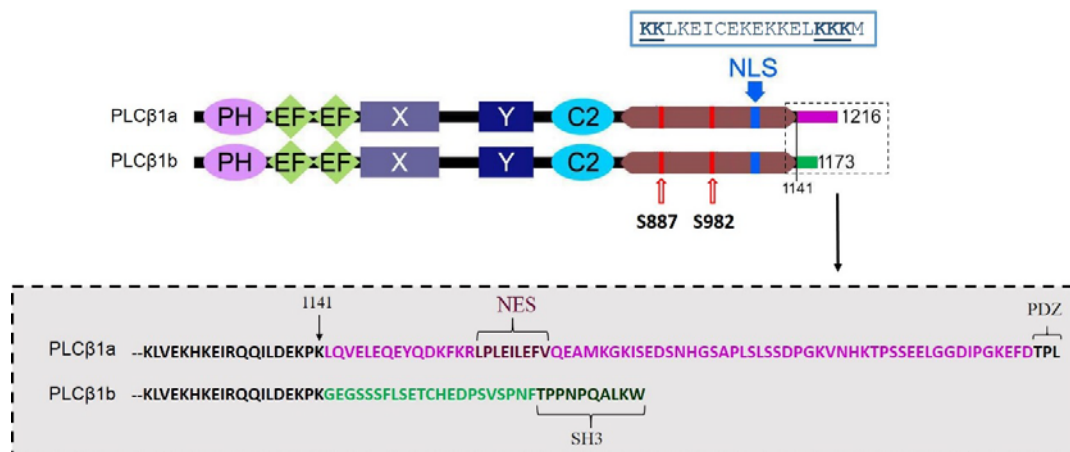
1.1.2. PLC β isoentzimaren C-Terminaleko domeinua (CTD). PLC β 1a/b splicing aldaerak

Aipatu dugun bezala, PLC β subfamiliak definitzen dituen elementua 400 aminoazido inguruko C-Terminaleko Domeinua (CTD) da, ez baita aurkitzen gainontzeko PLC isozimetan. Domeinu honi esker, PLC β isozima, G α q proteina heterotrimerikoetara lotutako GPCRren efektore nagusia da. CTDaren aminoazido sekuentziaren egitura sekundarioari dagokionean, %77,8-a α -helize eran, % 1,6a β -lamina eran eta %20,6a loop eran antolatzen da. C terminaleko domeinua, lisina eta arginina hondar basikoetan aberatsa da. Hondar hauetako asko, hiru eremu konkretutan taldekatuta daude eta gurpil helikoidal baten itxura hartzen dute (36). Ikerlari ugari azpimarratu dute PLC β -ren domeinu honen garrantzia. Izan ere, PLC β mintzari eta G α q-ri lotzeko eta G α q-ren aktibitate maximo basal eta estimulatua lortzeko ezinbestekoa zela frogatu da (37–42), ez ordea, Rac eta G β γ bidezko aktibaziorako (23,36,43,44). Gainera, PLC β isozimak, G α q proteina heterotrimerikoen efektorea izateaz gain, era berean, G α subunitatearen GTPasaren proteina aktibatzaileak (GAP) dira. G proteinei loturiko hartzailea (GPCR) aktibatzean, α subunitatea (α q, α 11, α 14, α 16) β γ -tik askatu eta PLC β -rekin lotzen da. Honek, PLC β mintzean kokatzea eta X-Y lokailua gune katalitikotik askatzea eragiten du. X-Y lokailurik gabe PLC β -k gune katalitikoa erabilgarri dauka PIP2-

ren hidrolisia burutzeko. PLC β -ren aktibatzaile nagusia $G_{\alpha q}$ subunitatea den arren, badaude funtzio bera betetzen duten beste elementu batzuk ere, hala nola, Gi proteinen $G_{\beta\gamma}$ subunitateak (45–48), pisu molekular baxuko Rho familiako Rac GTPasak (43,49–51) eta mintz plasmatikoko hainbat aldamio proteina (52–55).

PLC β 4 eta PLC β 1 isozimen kasuan, CTD domeinu honen muturrean transkripzio osteko aldaketak gertatzen direla deskribatu da eta ondorioz, proteina hauen splicing aldaera desberdinak sortzen direla. PLC β 1-ari dagokionez, arratoi garunean egindako lehen ikerketek bi PLC β 1 transkripzio mRNA desberdin zeudela deskribatu zuten, 1216 aminoazidoko polipeptidoa (PLC β 1a) ematen zuen transkripto, eta 1173 aminoazidoko polipeptidoa (PLC β 1b) ematen zuena (56,57). Urte batzuen ondoren, giza PLCB1 genearen analisi xehea burutu zuten Caricasole eta kolaboratzaileek eta gizakian ere PLC β 1-aren bi aldaera hauek zeudela frogatu zuten. PLCB1 20. kromosomaren beso laburreko 12. posizioan dago kodetuta eta eremu kodifikatzailea 35 introi handiz banatutako 36 exoi txikietan antolatzen da, 250 kb baino luzera handiagoa duena. Peruzzi eta kolaboratzaileek, bi proteinen sintesirako hiru cDNA zeudela deskribatu zuten, 7103 base parekoa, PLC β 1a proteinan (1216 aa) itzultzen dena eta 7221 eta 5966 base pareko bi, PLC β 1b proteinan (1173 aa) itzultzen dena (58). PLC β 1a eta PLC β 1bren arteko desberdintasuna C-terminaleko azken aminoazido hondarretan dago. Izan ere, PLC β 1b-k ez ditu PLC β 1a-k dituen azken 75 aminoazidoak, eta horien ordeaz, beste 32 aminoazido ditu.

Bestalde, PLC β 1a zein PLC β 1b-ren C-terminaletan Lokalizazio Nuklearrerako Seinale (NLS) bipartitua dago, hondar basikoetan aberatsa den bigarren eremuan, 1055. eta 1072. aminoazidoen artean. NLS sekuentzia (K/R)(K/R)X10-12(K/R)3/5 bezala definitzen da [(K/R) 3/5 –k jarraian dauden 5 aminoazidotatik gutxienez 3k lisina edo arginina izan behar duela esan nahi du] (59). Honela, Kim eta kolaboratzaileek egindako ikerketan azaldu zenez, eremu honetako 1056, 1063 eta 1070 lisina molekulak isoleuzinaz ordezkatzean (cDNA M2b mutantea deiturikoa), PLC β 1 nukleora sartzea galarazten zela frogatu zuten (39). Halaber, PLC β 1a-k, NLS-tik aminoazido batzuetara C-terminalaren sekuentzian, Nukleotik Kanporatzeko Seinalea (NES) du, baina PLC β 1b-k ez.



S.1.4. irudia: PLCβ1a eta PLCβ1b-aren sekuentzia osatzen duten domeinuen eskema, CTD domeinuko erregulazio guneekin; S889 eta S982 fosforilazio guneak eta NLSren kokapena. Bestetik, bi splicing aldaeren C-terminaleko aminoazido sekuentziak eta bakoitzean aurkitu daitezkeen erregulazio eta elkarrekintza guneak: NES-ren kokapena eta PDZ eta SH3 elkarrekintza guneak.

Azkenik, PLCβ1a-ren C-terminaleko azken 3 aminoazido hondarrek (-T-P-L-COOH) dentsitate postsinaptikoko (PDZ) domeinura lotzeko sekuentzia osatzen dute (60). PLCβ1b-ren azken 3 aminoazidoen sekuentzia ez da berdina. Gainera, PLCβ1a ez bezala, PLCβ1b, Shank3 izeneko mintz plasmatikoko aldami proteinari lotzeko gai da C-terminaleko azken 32 aminoazido sekuentziari esker. Zehazki, Shank3-ren SH3 domeinura lotzen da. Shank3 dentsitate postsinaptikoko proteina da eta neurotransmisoreen hartzailak, kanal ionikoak eta neuronon mintzeko beste proteinak zitoesketoko egiturekin lotzea da bere funtzioa (61). Honela, ikerketen arabera, PLCβ1a eta PLCβ1b-ren C-terminaleko azken aminoazidoen arteko desberdintasun hauek, PLCβ1-aren bi aldaeren zelula barneko kokapena baldintza lezake. Hau da, PLCβ1-aren bi aldaeren zelula barneko kokapena desberdina izan daiteke eta hori, C-terminaleko aminoazido sekuentziaren eta zelulako konpartimentu desberdinetan eman daitezkeen elkarrekintzen menpe egongo litzateke. Izan ere, kardiomiotoetan PLCβ1a zitosolean eta mintzean espresatzen dela deskribatu da, eta aldiz PLCβ1b zitosolean soilik (53,62).

1.2. PLCβ1a/b-REN ZELULA BARNEKO KOKAPENA: PLCβ1a/b NUKLEARRA

Aipatu dugun bezala, PLC aktibitate entzimatiakoaren substratoak diren fosfoinositidoak nukleoaren mintzeko eta matritzeko osagaiak direnaren ebidentzia

sendoak ditugu. Smith eta Wells-ek (63) deskribatu zuten lehen aldiz arratoien gibelesko zeluletan, mintz plasmatikoa bezala, mintz nuklearrean ere gertatzen zela fosfoinositidoen metabolismoa. Ondoren, Cocco eta kolaboratzaileek (64), fosfoinositidoen sintesi eta hidrolisi ziklo hau nukleoaren barne domeinuetan ere existitzen zela frogatu zuten. Izan ere, MEL zelulen mintzik gabeko nukleoek, PIP eta PIP2 sintetizatu zezaketen, in vitro (3,4). Are gehiago, PIP2-aren % 50 eta fosfoinositidoen metabolismoan inplikaturiko entzimen (DAG kinasa, PIP-5 kinasa eta PIP-4 kinasa kasu) % 80 mintzik gabeko nukleoetan mantentzen zen (63)(88). Hau da, fosfoinositido gehienak nukleoaren mintzean baino, matrize nuklearrean daudela frogatu da. Nukleo-barneko gune hauek mintz nuklearretik eta honen inbaginazioetatik urrun kokatzen dira, kromatinaren arteko pikor moduko egituretan. Gune hauei, 'nuclear speckles' edo 'orbain nuklearrak' deitzen zaie beren itxuragatik eta bertan mRNA prozesamendua gertatzen dela iradokitzen dute hainbat ikerketen emaitzek. Izan ere, transkribatu ondorengo pre-mRNA splicing prozesua gertatzeko hainbat faktore daudela deskribatu zen, hala nola, nukleoko ribonukleoproteina txikiak (snRNP) eta RNA polimerasa II-ren forma hiperfosforilatua (65–67). Gainera, interfasean zehar PIP2-ak SC-35 splicing faktorearekin, RNA polimerasa II hiperfosforilatuarekin, snRNA-rekin eta snRNP-rekin kolokalizatzen duela frogatu zen orbain hauetan, baina ez mitosian (68).

Ebidentzia hauetatik abiatuta, hainbat ikerketa lerro zabaldu ziren nukleoko fosfoinositidoen funtzioa eta erregulazioa aztertzeko helburuarekin (69–75). Esaterako, fosfoinositido nuklearren metabolismoaren erregulazioari dagokionez Swiss 3T3 fibroblasto zeluletan intulina-motako 1 hazkuntza faktorearen bidezko estimulazio mitogenikoak (IGF-1) nukleoko fosfoinositidoen mailen jaitsiera eta DAG mailen igoera eta ondoren, PKC α -ren translokazioa nukleora eta aktibazioa eragiten zuela frogatu zen (69)(76–78). Gainera, ikerkuntza horretan, IGF-1-arekin bat egin arren arren aktibatzen ez zen IGF-1-aren hartzailea espresatzen zuten 3T3 zelula klonetan, IGF-1-aren presentzian nukleoko inositidoen mailetan aldaketarik ez zegoela, eta erantzun mitogenikoa galtzen zela ikusi zen (79). Honek, nukleoko fosfoinositidoak ziklo zelularren erregulazioan parte hartzen zutela erakusten zuen.

Fosfoinositidoaz gain, PLC β 1 ere aurki daiteke nukleo mailan eta baita PIP kinasak, DGK ζ , PLC δ 4, PI-3 kinasak C2 α , PTEN eta SHIP2 ere (3,80,81). Gainera, PLC β 1-ak, nukleoko matrizean kokaturiko 'orbain nuklearrak' deituriko gune konkretu horietan DGK θ eta PIP2-arekin kolokalizatzen duela frogatu da (82). Zehazki, Martelli eta kolaboratzaileek deskribatu zuten lehenengo aldiz PLC β entzimaren presentzia nukleoan, IGF-1-ak eragindako PIP eta PIP2-aren hidrolisi azkarraren erantzulearen bila jardun zutenean. Izan ere, Swiss 3T3 zelulak IGF-1-arekin tratatzean nukleoko PLC β -ren aktibitatea 2-3 aldiz handitzen zela demostratu zuten. Gerora, ikerlari talde desberdinek PLC β 1 isoforma, zenbait lerro zelular eta ehunen nukleoan ere espresatzen zela baieztatu zuten (83–86). Are gehiago, egun badakigu, PLC β 1-a nukleoko PLC isozima guztien artean ugariena dela eta PIP2-aren hidrolisiaren erantzule nagusia dela, bertan PLC β 2, PLC β 3 eta PLC β 4 ere aurki ditzakegun arren (87,88).

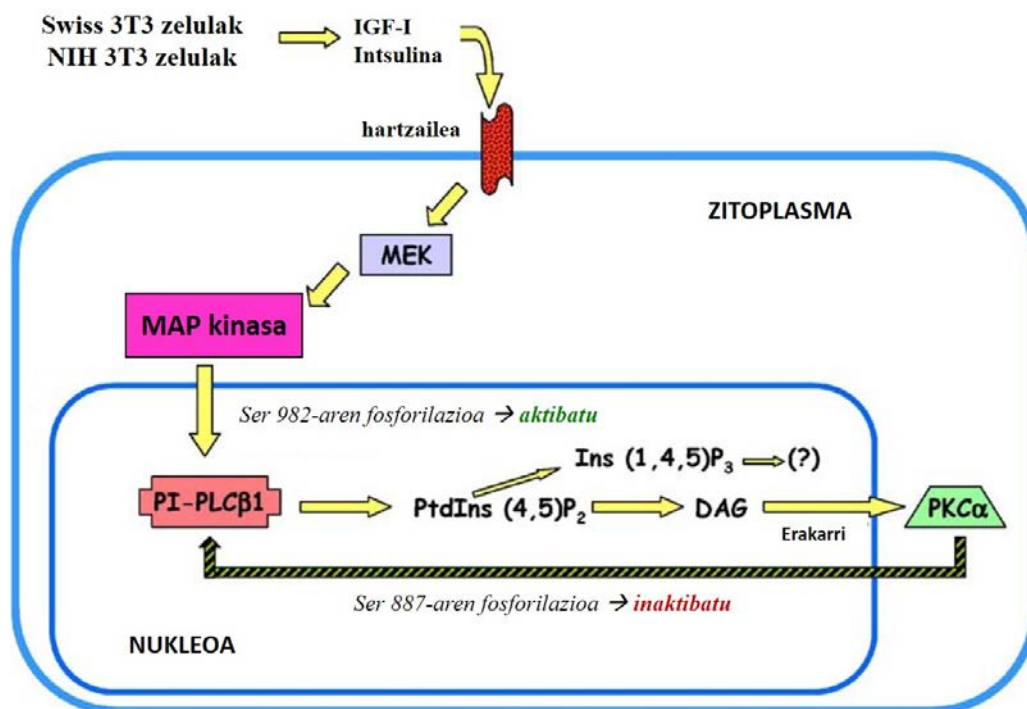
PLC β 1-aren nukleoko eta zelulako beste konpartimentuen arteko banaketa erlatiboari dagokionean, analizatzen den zelula motaren arabera, oso desberdina da. Adibidez, lehen aipaturiko Swiss 3T3 zeluletan eta SaOS-2 osteosarkoma zeluletan nukleoan bakarrik espresatzen dela deskribatu zen (84,89). Divecha eta kolaboratzaileek, bestalde, arratoien gibelesko zelulen nukleoko PLC β 1 proportzio totalaren %2 zela soilik ikusi zuten (83). Dena dela, deskribatzen den PLC β 1-aren zelula motaren araberrako banaketa zelularraren aldakortasun honen oinarrian, PLC β 1a eta PLC β 1b splicing aldaera bakoitzaren zelula barneko lokalizazio desberdina egon daiteke. Izan ere, aurreko atalean azaldu den bezala (1.1.2 atala), PLC β 1a eta PLC β 1b-ren C-terminalean, haien lokalizazio nuklearra baldintzatzen duten eremuetan desberdintasun garrantzitsuak badituzte. PLC β 1a aldaerak NLS eta NES seinaleztapen eremuak ditu bere C-terminalean baina PLC β 1b-k NLS du soilik.

Era berean, badira emaitza hauek ulertzeko kontuan hartzeko beste hainbat aldagai metodologiko ere. Esaterako, nukleoak isolatzeko prozedura esperimental desberdinak erabili izana, edota ikerkuntzetan erabilitako PLC β 1a/PLC β 1b splicing aldaera desberdinenganako antigorputzen espezifikotasuna. Izan ere, aurrerago egindako ikerketek, arratoien gibelesko zeluletan PLC β 1b nukleoan espresatzen zela deskribatu zuten, beste konpartimentuetan ia detektagarria ez zen bitartean (90–93).

Divecha eta kolaboratzaileek 1993ko ikerketan erabilitako antigorputzak eskusiboki PLC β 1a aldaera markatzen zuela iradokitzen du honek (83).

Nukleo barneko PLC β 1-aren aktibitatearen erregulazioari dagokionez, Swiss 3T3 zeluletan deskribatuenez, PLC β 1-aren aktibitate entzimatikoa bere sekuentziako bi aminoazidoren fosforilazio/defosforilazioaren menpe egongo litzateke. Zelula hauetan IGF-1-aren estimulu mitogenikoak MAP kinasak nukleora sartzea eragiten du eta honekin batera bertako PLC β 1-aren 982. aminoazido hondarraren fosforilazioa, eta aktibazioa eragingo luke. Zehazki, IGF-1 estimulazioak nukleoko DAG-aren sintesia eta PKC α -ren nukleorako translokazioa eragiten zuela ikusi zen (78). Baina, zelula hauek aldeztatik zitoeskeletoa despolimerizatzen zuten koltxizina tratatzean, eta ondorioz MAP kinasaren nukleorako translokazioa galarazten zenean, PLC β 1-aren aktibazioa galtzen zen. Azkenik, 2001ean, Xu eta kolaboratzaileek MAP kinasak zehazki PLC β 1 nuklearraren aktibazioa bere serina 982 fosforilazioaren bitartez eragiten zuela frogatu zuten. PLC β 1-aren sekuentziako 982. aminoazidoan serina ordez glizina (S982G) zeukan PLC β 1-aren mutantea gainespresatzean IGF-1-ak eragindako fosfoinositidoen zikloaren estimulazioa, eta eragin mitogenikoa galarazten baitziren. Serina 982, PLC β 1-aren bi aldaeretan aurkitzeak, Pro-Ser-Ser-Pro motifaren barruan kokatuta, MAP kinasak bideratutako PLC β 1 aktibazioa bi aldaeretan gertatzen dela iradokitzen du (94).

Bestetik, talde berak, Swiss 3T3 zelula klonak IGF-1-arekin tratatzean PKC α -k PLC β 1-aren serina 887 fosforilatzen eta inaktibatzen zuela deskribatu zuen. Maila berean, Go6976 PKC α -ren inhibitzaile selektiboak, IGF-1-ak estimulatutako nukleoko PLC β 1-aren aktibitatea handitzen zuela frogatu zen, baita serinaren ordez alanina zeukan (S887A) PLC β 1 mutantea edo PKC α -ren dominante negatiboa gainespresatzean ere (95).



S.1.5. irudia: IGF-1ak estimulatutako saguen fibroblastoen nukleoko PLCβ1-aren aktibitate entzimatiakoaren erregulazio mekanismoak. PLCβ1 entzimaren aktibazioa eta inaktibazioa 982 eta 887. aminoazido hondarren fosforilazioaren menpe dago. Cocco et al. (2006) artikulutik moldatua.

IGF-1-aren bidezko aktibazioaz gain, PLCβ1 nuklearraren aktibitatearen beste erregulatuzaileak ere deskribatu dira. O'Malley eta kolaboratzaileek mGluR5 hartzaile metabotropikoak nukleoan ere aurki zitezkeela frogatu zuten, HEK zelula eta kortexeko eta mesentzefaloko zeluletan. Are gehiago, zelula hauen nukleo isolatuei glutamatoa gehitzean Ca²⁺ oszilazioak agertzen ziren, mGluR5-aren antagonista selektiboa den MPEP-arekin edo EGTA-arekin blokeatzen zirenak (96). Urte batzuk beranduago, mGluR5 hartzailea aktibatzean ikusitako erantzuna PtdIns-PLC aktibitatearen menpekoea zela frogatu zuen talde berak. Izan ere, nukleoak aurrez U73122 PLC inhibitzaile ez-selektiboarekin edo ET-18-OCH₃ PtdIns-PLC inhibitzailearekin tratatuz gero ez zen Ca²⁺ oszilaziorik gertatzen hartzailea aktibatzean. Ez hori bakarrik, zeluletan siRNA bidezko PLCβ1-aren espresioaren blokeoa induzitzean ere blokeatzen ziren Ca²⁺ oszilazioak eta baita Rianodina eta IP₃ hartzaileak blokeatzean ere. Hori dela eta, mGluR5-aren aktibazioaren ondoriozko Ca²⁺ oszilazioak, PLCβ1-aren menpeko PIP₂-aren hidrolisi produktu den IP₃-aren bitartez gertatzen zirela ondorioztatu zen (97). Bi ikerketa hauek nukleoko PLCβ1 mintz plasmatikoko PLCβ1-aren modu berean

aktibatu daitekeela erakusten dute, baina mintzeko PLC β 1-aren transdukzio mekanismoekiko modu independentean, hau da, nukleoan bertan dauden hartzaileen bitartez. Dena den, azaldu den nukleoko hartzaile metabotropikoen ondoriozko PLC β 1-aren aktibazioa mintz nuklearrean gertatzen zela deskribatu zen eta lehen azaldu dugun bezala, nukleoko PLC β 1-aren inguruan eginiko ikerketa gehienek matrize nuklearreko speckles-etan dagoela erakutsi dute (82,98,99).

2. PLCB1-AREN PAPERA ZELULAREN PROLIFERAZIOAN ETA DESBERDINTZAPEN NEURONALEAN

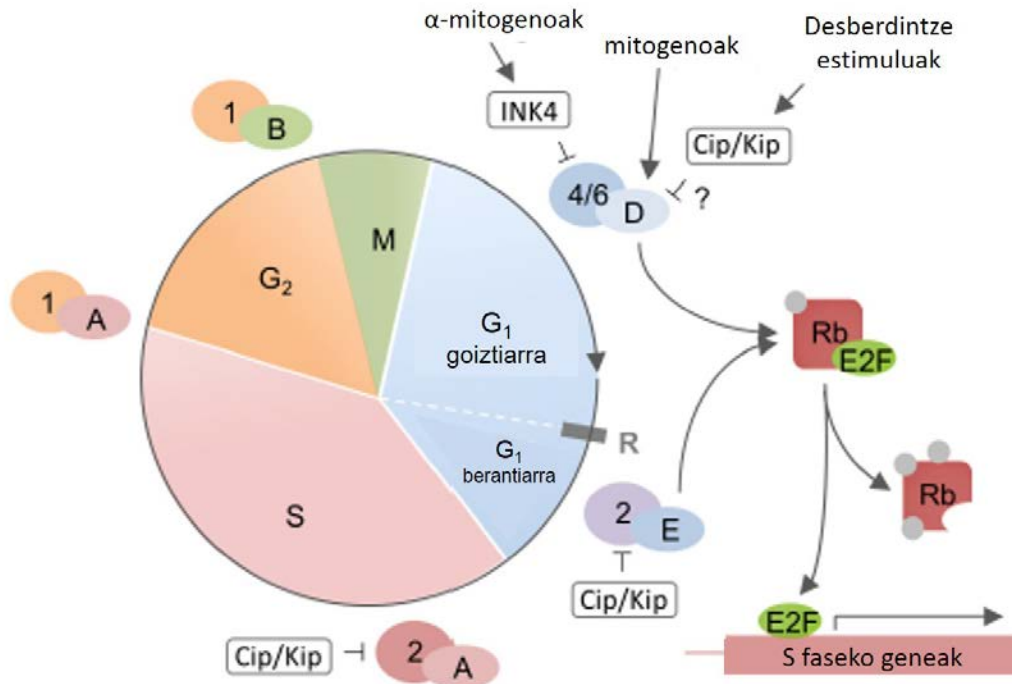
Nukleoko fosfoinositidoen metabolismoa deskribatu zuten lehenengo ikerketek, prozesu hauek ziklo zelularrean inplikaturik egon zitekeela aditzera ematen zuten (64,69,70,75,78,89). Gerora egindako ikerketek PLC β 1-ak zelulen proliferazioan ez ezik, desberdintze prozesuetan ere eragin dezakeela deskribatu dute (58,100,109,110,101–108). Izan ere, jarraian azalduko dugun bezala, bikoizten jarraitu edo ziklo zelularretik irtetzeko hautua ziklo zelularrean eta bere erregulatuzaileen menpe dago. Kieszentzian, apoptosian eta seneszentzian ez ezik, desberdintze prozesuan ere proliferatzen ari diren zelulak ziklotik irteten dira, G₁ fase goiztiarrean, eta G₀ izeneko fasean sartzen dira (111).

2.1. ZELULA EUKARIOTEN ZIKLO ZELULARRA ETA BERE ERREGULATZAILEAK

Zelula eukarioten ziklo zelularra bi fase nagusitan banatzen da, interfasea eta zatiketa fasea. Interfaseak, era berean, hiru fase ditu: G₁, S eta G₂ faseak. G₁ fasea hazkuntza fasea da, zelula zatitu ondoren hasten dena eta faserik luzeena da. Zelulak tamaina egokia lortzen duenean bikoizteari utzi eta ziklotik irten daiteke (G₀ fasea) edo zikloan aurrera egin dezake proliferatzen jarraitzeko. Ziklotik irtetzean, aldi baterako egon daitezke G₀ fasean, kieszentzia egoeran, edo desberdindu eta zelula post-mitotiko bilakatu daitezke. Zikloan aurrera egiten badu, zelula DNAREN erreplikaziorako prestatzen da G₁ fase amaieran. DNA bikoizten den faseari S deritzen. Nukleoko DNA guztia bikoiztu ondoren, G₂ fasera igarotzen da zelula, non zatiketarako prestatuko da. Zatiketa zelularrean, lehenik S fasean bikoiztu den DNAREN zatiketa gertatzen da Mitosian, eta jarraian zelularen banaketa gertatzen da Zitokinesian. Zatiketa zelularra azkar gertatzen da eta, askotan, prozesu guztiari Mitosi fasea edo M fasea deitzen zaio. M fasea amaitzean zelula alaba bakoitza G₁ fasean sartzen da (S.2.1.. irudia).

Ziklo zelularra, oso erregulatuta dagoen prozesua da. Bertan, ziklinek, ziklina menpeko kinasek (CDK, *cyclin dependent kinase*) eta ziklina menpeko kinasen inhibitzaileek (CKI) hartzen dute parte. CDK-k serina/treonina kinasak dira eta

beren funtzio katalitikorako ziklina bezalako azpi-unitate erregulatzailen lotura eta CDK-aktibatzaile kinasen (CAK, *CDK-activating kinase*) fosforilazioa behar dituzte (112–115). CDK-en eta CAK-en espresio maila altua da eta zikloaren fase guztietan mantentzen dira (116,117). Ziklina mailek, aitzitik, zikloaren fasearen araberrako gorabeherak dituzte, zelula fase batetik bestera igarotzea ahalbidetzen duena (118–120).



S.2.1. irudia: Ugaztun zelulen ziklo zelularren progresioa, bere 4 faseekin (G1, S, G2 eta M). Errestrikzio puntuak (R) G1 banatzen du, estimulu mitogenikoekiko sentikorra den G1 fase goiztiarra eta estimulu mitogenikoekiko sentikorra ez den G1 fase berantiarra. Fase batetik besterako bidea ziklina eta ziklina menpeko kinasek erregulatzen dute. 4/6-D, CDK4/6 - D ziklina; 2-E, CDK2 - E ziklina; 2-A, CDK2 - A ziklina; 1-A, CDK1 - A ziklina; 1-B, CDK1 - A ziklina. Urbach eta Witte-etik (2019) moldatua.

Zehazki, G1 fasean zehar, ugaztun zelulak kanpo-ingurunetik edo zelula barnetik jaso ditzaketen seinale desberdinak, zuzenki aipatutako zikloaren erregulatzailen desberdinen eragingo dute, fase honen zinetika eraldatuz. Honela, inguruneko mitogeno edo hazkuntza faktoreak bezalako seinaleek G1 faseko progresioa eta zelularen zatiketa bultzatzen dute. Horretarako, D ziklinen espresioa induzitzen da G1 fasearen hasieran (118,121,122). D ziklinak CDK4 edo CDK6-ra lotuko dira eta D-CDK4/6 konplexua osatuko dute. D-CDK4/6 konplexua

SARRERA

erretinoblastoma proteina (Rb) fosforilatzen hasiko da. Rb, p107 eta p130 bezala, pocket proteina da eta tumore supresore funtzioa du. Bere forma aktiboak (hipofosforilatuak) ziklo zelularren progresioa blokeatzen du E2F transkripzio faktorearen inhibizioa eragitearen ondorioz (123). Izan ere, E2F-k, S fasea gertatzeko beharrezkoak diren geneen transkripzioa eragiten du.

Rb molekulek fosforilazio maila altua lortzen duten heinean, E2F askatuko dute. Era berean, D ziklina mailen jaitsiera emango da eta E ziklinaren sintesia hasikoa da. Sintetizatzen den E ziklina CDK2ra lotuko da eta konplexu honen aktibazioak G1 faseko errestrikzio puntua markatuko du. Une honetatik aurrera zelulak zikloan jarraitu eta bikoizteko mekanismoak jarriko dira martxan, faktore mitogenikoen beharrik gabe. E ziklina-CDK2 konplexuak Rb proteina gehiagoren fosforilazioa eragingo du. Honen ondorioz E2F transkripzio faktorea askatuko da eta honek, G1/S trantsiziorako beharrezkoak diren geneen transkripzioa eragingo du, hala nola, α DNA polimerasa eta E eta A ziklinena (112,113,124–127).

A ziklina CDK2-ra lotzearekin batera E2F bideratutako geneen transkripzioa gelditu eta zelula S fasean sartzea eragiten du (128,129). S fasearen amaieran A ziklina CDK1-ekin elkartzen da eta G2 fasera igarotzea ahalbidetzen du (130,131). Azkenik, B ziklinak-CDK1 konplexua sortzen da, M faseko faktore sustatzailea deiturikoa (132,133). Konplexu hau mitosirako beharrezkoak diren zelula barneko egitura berrantolatzeaz eta zitokinesiaz arduratzen da. Zelularen banaketa eman ondoren, B ziklinaren degradazioa ematen da, eta berriz hasiko da zikloa, G1 faseri hasiera emanez (119,134).

2.2. PLC β 1 ETA PROLIFERAZIOAREN ESTIMULUA

Cocco eta kolaboratzaileek 1987an mintzik gabeko MEL zelulen nukleoekin egindako ikerketan, proliferatzen ari ziren eta desberdindu ziren zelulen PIP2 maila desberdina zela deskribatu zuten, nabarmenki handiagoa zelarik desberdindutako zeluletan (64). Ondoren egindako zenbait ikerketek deskribatu zuten, nukleoko PLC β 1 aktibitatearen igoera zelulen proliferazioarekin erlazionatuta zegoen zelula eredu batzuetan. Gainera, igoera hau, ziklo zelularreko bi une zehatzetan gertatze zela ikusi zen. Alde batetik, nukleoko PI, PIP eta PIP2 fosfoinositidoen jaitsiera

(135), PLC β 1 aktibitatearen (136–138) eta DAG produkzioaren igoerak (139), deskribatu zen G1/S trantsizioan. Igoera hau, interkromatinari asoziatutako PLC β 1-aren aktibitatearena zen eta ez mintz nuklearrarekin asoziatutako PLC β 1-arena (138).

Bestetik, PLC β 1 aktibitatearen beste piko bat G2/M fasean ematen zen (137,140,141). Kasu honetan, PI-PLC aktibitatearen igoera, mintz nuklearrean emango litzateke, eta DAG menpeko PKC β II aktibazioa eta mintz nuklearreko kinasa honen substratu den B1 laminaren fosforilazioa eta mintz nuklearraren deskonposaketa (mitosiko prozesua), eragingo luke HL-60 zeluletan (140). Fiume eta kolaboratzaileek MEL zeluletan egindako ikerketan ere ondorio berdintsuetara iritsi ziren. Ikerketa honen arabera, PLC β 1-aren aktibitatearen igoeraren eraginez B1 lamina fosforilatzen zen eta zelulak G2/M fasean aurrera egitea ahalbidetzen zuen horrek. Kasu honetan, ordea, PKC α zen erantzulea, PKC β II ez baita espresatzen MEL zeluletan. Gainera, JNK-k (Jun N-Terminal Kinasa, mitogenoz aktibatutako proteina kinasa mota bat) PLC β 1-arekin kolokalizatzen zenez nukleoplasman, eta zitosolean ere espresatzen zenez, estimulu mitogenikoak eragina nukleora translokatu eta PLC β 1 aktibatzen zuela iradoki zuten (99).

MEL zelulekin jarraituz, DMSO-rekin desberdintzera induzitzen zirenean PLC β 1-aren espresioaren jaitsiera ematen zela deskribatu zen. Are gehiago, PLC β 1-aren gainespresioak, baina ez NLS-rik ez zuen, eta beraz kokapen nuklear gabeko PLC β 1 mutantearenak, DMSO-k eragindako desberdintzapena galarazten zuen (142). Ebidentzi hauek guztiak, PLC β 1-aren nukleoko espresioa eta bere aktibitate katalitikoaren estimuluarekin erlazionatzen dituzte, MEL, HL-60 eta arratoien gibel zeluletan. Gainera, G1 faseko progresioa eta S faserako trantsizioa kromatinari asoziatutako PLC β 1-aren eraginez gertatzen denez eta G2/M-ko progresioaren erantzule mintz nuklearreko PLC β 1 denez, une bakoitzean funtzio hori betetzeko bide desberdinak hartzen direla iradokitzen dute emaitzek.

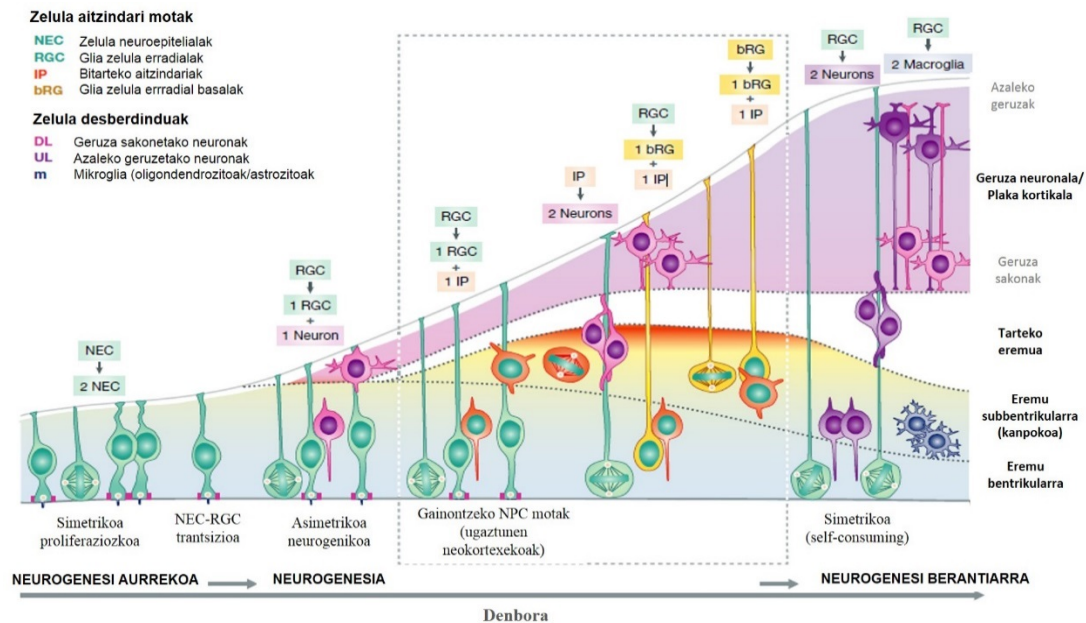
Ziklo zelularrean eragiteko mekanismoak ikertu nahian, talde berak bi urte beranduago argitaratutako ikerketan, PLC β 1 eta CDK-ren arteko erlazioa deskribatu zuten. Gogora ekarri dezagun, erregulatzailerik hauek G1 faseko bi puntu kontrolatzen dituztela: fase goiztiarra, D ziklina (D1, D2, D3) eta CDK4 edo CDK6-ak, eta G1 fase berantiarra E ziklina eta CDK 2-ak (121). Faenza eta

kolaboratzaileek, MEL zeluletan egindako PLCβ1a eta PLCβ1b-ren gainespresioak D3 ziklinaren eta CDK 4-ren igoera eragiten zuela frogatu zuten, baina ez E ziklina eta CDK2-rena. NLS-an mutazioak zituen PLCβ1 (M2b) gainespresatzean ordea, ez zegoen aldaketarik aipatutako ziklinen eta CDK-ren espresioan. Mutaziorik gabeko bi PLCβ1-en gainespresioak, bestalde, pRb-ren fosforilazioa eta E2F1 transkripzio faktorearen askapena eragiten zuen (91). Honek guztiak, MEL zeluletan nukleoko PLCβ1-ak ziklo zelularrean aurrera jarraitzea bultzatzen duela adierazten du, G1 fase goiztiarreko D3 ziklina eta CDK-ren erregulazioan eraginda.

2.3. PLCβ1-AREN PAPER A DESBERDINTZAPEN NEURONALEAN

2.3.1. NSZ-ren garapeneko Neurogenesisia

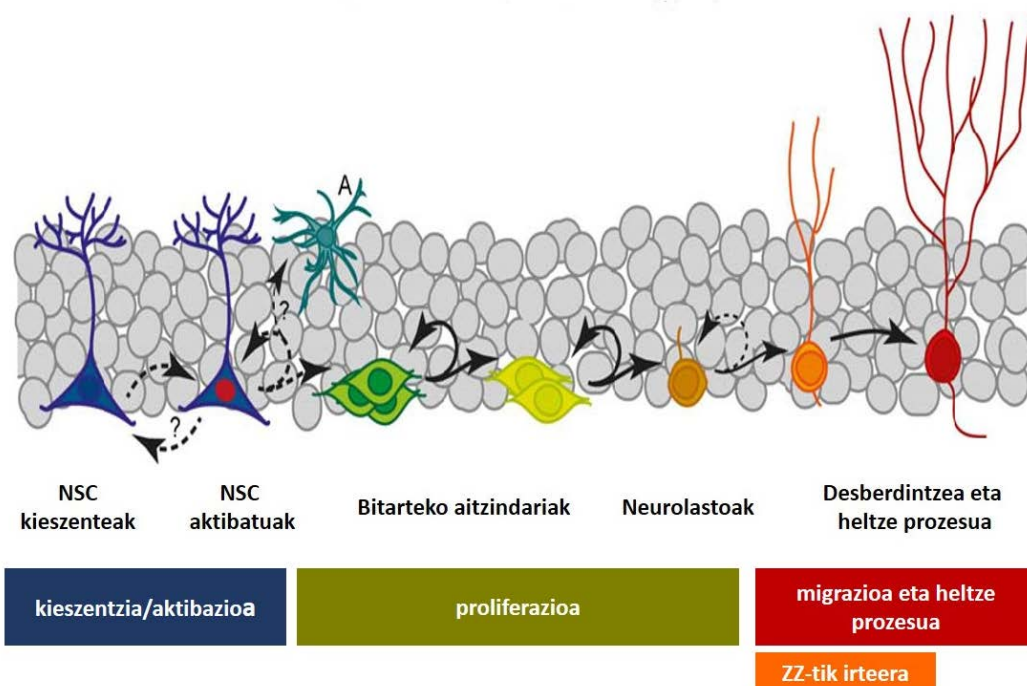
Ornodunen NSZ-aren garapenaren aldi goiztiarrean, ektodermoko zeluletatik plaka neurala sortzen da notokordak induzituta. Jarraian, plaka neuronalaren inbaginazioz hodi neurala garatzen da. Hodi neuralaren horma epitelio pseudoestratifikatua osatzen duten zelula neuroepitelialez (NEC, neuroepithelial cells) osatuta dago (143–145).



S.2.2. irudia: Animalia ornodunen garai enbrionarioko NSZ-eko neurogenesisaren garapenaren eskema orokorra. NPC mota garrantzitsuenak eta hauen ondorengo posible batzuk iruditkatzen dira. Pariaden eta Huttner-en (2014) errebisio lanetik moldatua.

Neurogenesiaren hasieran, zelula neuroepitelial hauek zelula glial radialak (RGCs, radial glial cells) bilakatzen dira. RGC-ak NSZko aitzindari nagusiak dira, hauetatik sortzen baitira bertako neurona eta glia zelulak (146,147). Gune apikaleko RGC-ek zatiketa asimetrikoa burutzen dute, ia eskusiboki, eta bertatik beste RGC bat eta desberdintasun maila handiagoko zelula bat sortzen dira. Desberdintza maila handiagoko zelula, neurona edo bitarteko aitzindaria (IP, intermediate progenitor) izan daiteke. Era berean, IP-en zatiketarik bi neurona sortzen dira eta, modu honetan, neurona kopurua handituz doa. IP-ak gune subbentrikularrean aurkitzen dira nagusiki eta neuronak, sortu ahala gorago dauden geruzetara (eremu basala) migratzen dute RGC-en zuntzei jarraituz (148–151). Espeziaren eta garun eremuaren arabera, beste RGC mota batzuk ere sortzen dira, gune apikalean zein subapikaleko kokapena dutenak. Esaterako, primateen neokortexeko garapenaren aldi berantiarretan, kanpoko eremu subbentrikularrean kokatzen ziren bRG-ak (basal RGC) aurkitu zituzten (152–156).

Nerbio sistemaren garapena amaitzen denerako aitzindari gehienak neurona edo glia zeluletan heldu bilakatu diren arren, badaude bikoizteko gaitasuna mantendu duten aitzindariak ere ugaztunen helduaroan. Aitzindari hauek, oso proportzio txikian mantentzen dira eta haien kokapena garuneko bi gune konkretutara mugatzen da: hipokanpoko hortz bihurgunearen eremu subgranularra (SGZ, subgranular zone) eta albo-bentrikuluen eremu subbentrikularra (SVZ, subventricular zone) (157–162). Gizakian helduaroko neurogenesia ematen denaren eztabaida handia dagoen arren, azken ikerketek hortz bihurguneko SGZ-ean bikoizteko gaitasuna duten zelulak daudela frogatu dute (163)



S.2.3. irudia: Helduaroko hipokanpoko SGZko neurogenesiko aitzindarien progresioaren eskema. Urbach eta Witte-etik (2019) moldatua.

Hortz bihurtzeko SGZ-ean esaterako, kieszentzia egoeran mantentzen diren ama zelula neuronalak (NSC) daude eta noizean behin zatiketa simetrikoa burutzen dutena populazioa berritzeko (164). NSC hauek, aktibatzen direnean, bitarteko aitzindariak sortzen dituzte (IP) zatiketa asimetrikoaren bidez. Era berean, IP hauek hainbat aldiz bikoizten dira ondoren, anplifikazio sistema modura. IP zeluletatik neuroblastoak, sortzen dira jarraian, neurona izaera duten zelula heldu gabeak. Azkenik, neuroblastoak migratzen hasten dira geruza granularrean zehar eta bikoizteko gaitasuna galtzen dute. Une honetatik aurrera, zelulen heltze prozesu morfologiko eta funtzionala lortzeko mekanismoak jarriko dira abian eta garuneko hainbat zirkuitutan integratuz joango dira (157,165,166). Bestalde, NSC-etatik aitzindari neuronalak ez ezik astrozitoen aitzindariak eta ondoren astrozito helduak ere sortzen dira (159).

Laburbilduz, azaldu ditugun desberdintze neuronal edo neurogesiaren lehenengo urratsetan, sarri bikoizten diren eta desberdintze maila baxua duten aitzindariak ditugu alde batetik, eta aitzindari hautatik eratorritako zelula neurogenikoak bestetik, bikoizteari utzi eta desberdintze prozesua jasango dutenak. Prozesu hau guztia behar bezala gerta dadin, ziklo zelularren gaineko erregulazio

egokia izatea oso garrantzitsua da. Arestian aipatu dugun bezala, ziklo zelularren G1 fasean egiten da bikoiztera jo edo ziklotik irtetzeko hautua, fase honen aldi goiztiarrean, hain zuzen, zelula kanpo estimuluekiko sentikorra baita (2.1 atala).

G1 fasearen erregulazioa eta desberdintze neuronalarekin jarraituz, azken urtetako ikerketen arabera, desberdintzapen prozesua eta ziklo zelularren iraupena erlazionatuta daudela uste da. Esaterako, Takahashi eta kolaboratzaileen ikerketan, neokortexaren eremu bentrrikularreko zelula neuroepitelialen G1 fasea geroz eta luzeagoa zela deskribatu zuten garapenean aurrera egin ahala (167). Ildo beretik, zatiketa asimetriko neurogenikoa ematen zuten RGC-en G1 fasearen iraupena proliferaziozko zatiketa simetrikoa ematen zuten baina luzeagoa zela frogatu zen (168). Arai eta kolaboratzaileek egindako ikerketan, IP zeluleen G1 fasea RGC-ena baina luzeagoa zela deskribatu zuten.

2.3.2. PLC β 1-aren papera Neurogenesian

Gaur egun jakina da, PLC β 1 garunaren garapenean inplikaturik dagoela baina neurogenesiarene edo desberdintze neuronalarekin baino, neuronen heltze prozesuarekin erlazionatu izan da, neurona helduen eta haien arteko konexioen eraketan parte hartzen baitu. Ebidentzia honen lehen aztarna Kind eta kolaboratzaileen deskribatu zuten. Zehazki ikerketa honek, PLC β 1-a katu jaioberri eta gazteen ikusmen kortexeko neuronetan helduarokoan baino maila altuagoan espresatzen zela deskribatzen zuen (100–102). Gizakian egindako PLC β 1-aren espresioaren analisisiek, garun helduan mRNA zein proteina mailak handiak direla baina fetu garunetan ia ez dela espresatzen erakutsi zuten (58,103,104). Gainera, PLC β 1-aren aktibitatea neurtu duten ikerketak bat datoz emaitza hauekin. Honela, jaiotza osteko giza garunetan, fetu laginekin alderatuta, GTP γ S estimulazioaren ondorengo (karbakolarekin edo gabe) aktibitatea handiagoa ematen zen (104).

Bestetik, Kim eta kolaboratzaileek PLC β 1(-/-) saguak jaio eta egun batzuetara, konbulsio jarraiak edo status epilepticus-a jasan ostean, hiltzen zirela deskribatu zuten (169). Ondoren, sagu hauetan gertatzen ziren konbulsio hauen oinarrian egon litekeen mekanismoa deskribatu zen. Ikusi zutenaren arabera, PLC β 1(-/-) saguak mossy zuntzen proiektzio aberranteak garatzen zituzten eta hipokanpoaren

endekapena zutela frogatu zen jaiotza osteko garai goiztiarrean (170). Bestalde, mGluR hartzaileen bidez aktibatutako PLC β 1-aren mintz plasmatikoko seinaleztapen bidea garun kortexeko 'barrel' edo 'upel' egituren garapenean inplikaturik dagoela frogatu zen. Izan ere, PLC β 1(-/-) edo mGluR-5(-/-) knockout saguek ez zituzten kortex somatosensorialeko IV. geruzako egitura hauek modu egokian garatzen (171). Gainera, egitura hauen garapeneko sinapsien eta arantza dendritikoen eraketa ez zen behar bezala burutzen PLC β 1(-/-) saguetan eta ondorioz, kortexeko zirkuitaria ez zen modu egokian garatzen (172). Beste PLC β 1(-/-) knockout eredu bateko saguek konbulsio espontaneorik garatzen ez zuten arren, eskizofreniaren antzeko portaerak zituzten, hala nola, aktibitate motorearen handipena, jokabide sozial arrunten galera, hainbat gaitasun kognitiboren urritasuna, antsietate maila txikiagoa,... (173–175).

Gizakian ere, PLCB1 genearen asaldurak kuadro fisiopatologiko berdintsuak eragiten dituela deskribatu izan da. PLCB1 genearen promotorean eta 1, 2 eta 3. exoietan delezio homozigotikoa zuen pazienteak konbulsio tonikoak, espasmoak eta heriotza jasan zituen haurtzaroko lehen hilabeteetan (176). Bestetik, kortex prefrontaleko PLC β 1-aren espresio eskasia (177) edo PLCB1 genearen delezioa deskribatu dira eskizofrenia diagnostikatutako gaixoetan (178).

Deskribatutako garunaren garapenean zehar PLC β 1-aren espresio eta aktibitatearen inguruko ebidentzia hauek, PLC β 1-ak jaiotza ondorengo kortexaren garapenean eta neuronen aktibitate menpeko heldze prozesuan bai, baina desberdintzapen neuronalean ez lukela inplikaio handirik izango, iradokitzen dute. Dena dela, kontuan hartu behar dugu, aipatutako ikerketetan erabilitako prozedura metodologikoak direla eta, lortutako ebidentziak gehien batean mintz plasmatikoko PLC β 1-ari, eta ez nuklearrari, egotzi litzaizokela. Kontuan hartzekoa da, garun kortexean PLC β familiako lau isoformak espresatzen direnez (104), lauak NLS dutenez (179) eta beraz nukleoan ere espresatzen direnez (180), onargarria izango litzateke desberdintzapen neuronalean mintz plasmatikoko PLC β 1-aren gabezia, bere kokapen nuklearrak konpentsatu dezakela pentsatzea. Hori dela eta, azken urteetan, asko dira desberdintzapen neuronalean PLC β 1-ak duen inplikazioan sakondu duten ikerketak.

2.3.3. PLC β 1aren papera Desberdintzapen Neuronalean

PLC β 1-ak desberdintzapen prozesuan izango lukeen papera aztertzeko, zelula lerro desberdin erabili izan dira. Zehazki, isoentzima hau desberdintzapen prozesuaren erregulazioarekin erlazionatzen zuen lehenengo aurkikuntza zelula eredu ez-neuronaletan izan zen, C2C12 zeluletan hain zuzen ere. Muskulu eskeletikoko C2C12 zelulen desberdintze prozesuan nukleoko PLC β 1a eta PLC β 1b-ren espresioaren eta aktibitatearen igoera zegoela deskribatu zuten Faenza eta kolaboratzaileek. Igoera hau, Troponina muskulu helduaren markatzailearen igoera baino 24h lehenago ematen zen. Gainera, kokapen nuklear gabeko M2b mutantearen gainespresioak miotutu multinukleatu (multinucleated myotube) helduen bilakaera galarazten zuen (105). Bestalde, C2C12 zelulen desberdintze prozesuan zitoplasmako PLC β 4 mailen jaitsiera ematen zen, PLC β 3ren maila zitoplasmatiko zein nuklearrak berdin mantentzen zirelarik (106). Hare gehiago, talde berak, zelula hauen desberdintze prozesua bideratzeko PLC β 1, edo PLC γ , gainespresatzea nahikoa zela frogatu zuten, eta gainespresio horrek D3 ziklinaren mailen igoera eragiten zuela eta isilpenak, aldiz, desberdintzea eta D3 ziklinaren igoera galarazten zituela (181).

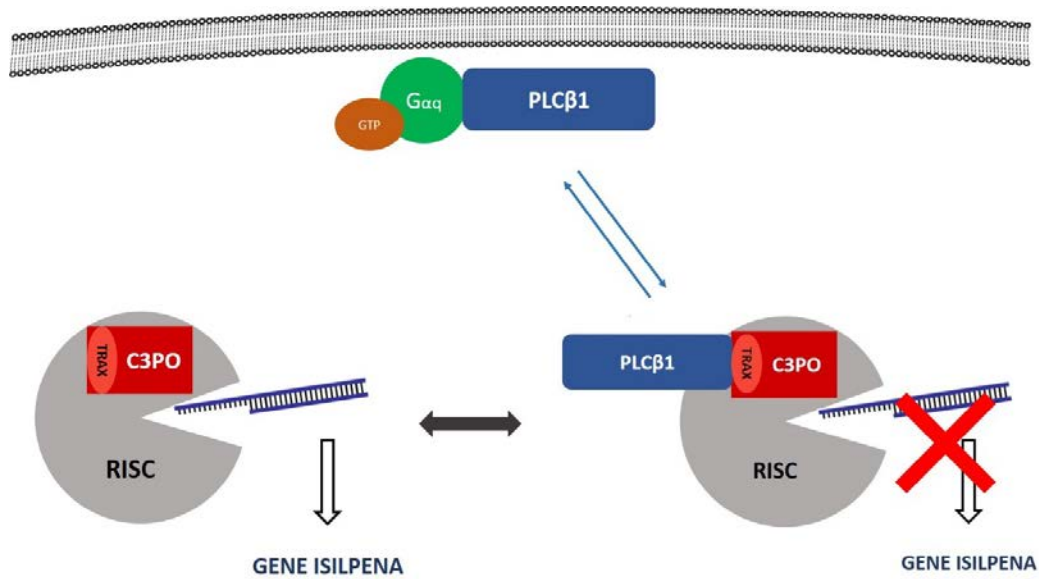
PLC β 1-a eta ziklina D3-a lotzen dituen mekanismo molekularrak argitu nahian, Ramazzotti eta kolaboratzaileek aktibitate katalitikorik gabeko PLC β 1 gainespresatu zuten C2C12 zeluletan intsulinarekin desberdintze prozesua induzitu aurretik. Aktibitate katalitikorik gabeko PLC β 1 gainespresatzean D3 ziklinaren mRNA mailak txikiagoak ziren, katalitikoki aktiboa zen PLC β 1-arekin alderatuz. Gainera, PLC β 1-aren aktibitate katalitikoak D3 ziklinaren promotorearen aktibaziorako eta geneen transkripzioan eragiteko ezinbestekoa zela frogatu zuten eta hau c-Jun/AP-1 bitartez gertatzen zela (182).

C2C12 zeluletan gain, O'Carroll eta kolaboratzaileek buruturiko ikerketaren arabera, 3T3-L1 adipozitoetan ere, desberdintze prozesua PLC β 1-aren espresio proteikoa eta aktibitatearen igoerarekin erlazionatu da. Zehazki, prozesuaren bi unetan ematen zen aktibitatearen igoera. Lehengoa, desberdintzea induzitu eta 5 minutura gertatzen zena, pERK eta PKC α -ren menpekoa zen. Bigarrena, desberdintze prozesuaren bigarren egunean gertatzen zena, ez zegoen pERK eta PKC α -ren ekintzez erregulatuta eta aurreko kasuan ez bezala, PLC β 1-aren sintesia

eta nukleorako translokazioa beharrezkoak ziren. ERK bidezko fosforilazioa (PLC β 1-S982G) eta nukleorako translokazioa (PLC β 1-M2b) galarazten duten mutanteetako bat gainespresatzea nahikoa zen desberdintzapena ez emateko, eta horrek, zelula hauen desberdintzapenerako PLC β 1-aren bi unetako aktibitatea ezinbestekoa zela adierazten zuen. Ez hori bakarrik, bitako edozein mutanteen gainespresioak desberdintzapen prozesuan ematen zen D3 ziklinaren igoera eta CDK4-aren espresio basala blokeatzen zituen guztiz, bigarren egunetik aurrera (107).

Beste zelula fenotipo desberdinetan bezala, zelula eredu neuronaletan ere aztertu da PLC β 1-aren desberdintzapen prozesuan parte hartzea. Desberdintzapen neuronalean PLC β 1-aren inplikazioa aztertu zuen lehen ikerketa 2002-an egin zen PC12 zelula lerroan. Bortul eta kolaboratzaileek egindako ikerketaren arabera, PLC β 1-aren bi barianteren, PLC β 1a eta PLC β 1b, espresio maila ez zen aldatzen Hazkuntza Faktore Neuronalak (NGF) induzitutako PC12 zelulen desberdintzapen prozesuan. Gainera, PLC β 1a zein PLC β 1b-ren gainespresioak ez zuen aldaketarik eragiten zelula hauen ziklo zelularrean eta proliferazioan. Ikerketa honetan ikusitako PLC β 1 gainespresioaren eragin ezaren arrazoia, entzimaren nukleora sartzeko ezintasuna zela iradoki zuten (183).

Alabaina, urte batzuk beranduago, PC12 zelulen desberdintzapen prozesuan PLC β 1-aren espresio maila handitzen zela eta PLC β 1-aren gene isilpenak desberdintzapena galarazten zuela deskribatu zuen beste ikerketa talde batek (108,109). Scarlata eta kolaboratzaileek egindako azken ikerketa honetan, halaber, G α q eta Translinari asoziatutako X faktorea (TRAX) ere aztertu zituzten. Emaitzen arabera, PC12 zeluletan PLC β 1-ak TRAX-aren bitartez eragingo luke desberdintze prozesua (108). TRAX-a 33kDa-ko proteina bat da, translinari lotuta kate bakarreko DNA eta RNA lotzeko konplexua eratzen duena (184). Konplexu honek, C3PO bezala ere ezagutzen dena, interferentziazko RNAREN gain aritzen den RISC-aren (RNA induced silencing complex) aktibitatea handitzen du (185). PLC β 1-aren eta TRAX-aren arteko lotura zitoplasman ematen da, PLC β 1 mintzeko G α q-ri asoziatuta ez dagoenean (186). Horrela, PC12tan egindako ikerketaren arabera, PLC β 1-a izango litzateke C3PO-rekin bat egin eta RNA bidezko geneen isilpena ekiditearen erantzule (108).



S.2.4. irudia: PLCβ1-aren mintz plasmatikoko eta zitoplasmako kokapena PC12 zeluletan. Zitosolean C3PO konplexuari lotzen da, TRAXari lotzearen ondorioz eta interferentziako RNA bidezko gene isilpena modulatzeko du.

Ildo beretik, Garwain eta kolaboratzaileek, PLCβ1-aren gene isilpenak PC12 eta SK-N-AH zelula neuronalen proliferazioa nabarmenki handitzen zuela deskribatu zuten, aztertu ziren zelula ez-neuronaletan proliferazioa gutxitzen zelarik. PC12 zeluletan, PLCβ1 isildu osteko proliferazio handipena neuronan espezifiko den CDK16-ren bitartez ematen zela frogatu zuten (109). Dena dela, PC12 zelulekin aurretik egindako ikerketa taldeak ez bezala (183), talde honek PC12 zelulen desberdintze prozesuan, nukleoko PLCβ1 baino, zitoplasmako PLCβ1 inplikatzen zuten.

PLCβ1-aren eragina aztertu den beste zelula eredu neuronalak NTERA2/D1 (NT2) zelula lerroa da. NT2 lerro zelularra, giza testikulu-teratokartzinoman jatorria duen birika metastasitik lortutako TERA2 zelula lerrotik eratorria da (187,188). Giza enbrioi kartzinoman jatorria duen Ntera2/D1 (NT2) zelulak azido erretinoikorekin (RA/NT2N) edo zitosina β-D-arabinofuranosidoarekin (AraC/NT2N) tratatuz lortzen da NT2N eredu neuronalak (188,189). AraC bidezko NT2 zelulen desberdintzea gure taldeak karakterizatu du orain dela gutxi. Tratamendu honekin, NT2 zelula aitzindariak, epe laburrean (6 egun) eta eraginkortasun handiz neurona postmitotiko bilakatzeko gai dira, neurona

desberdinduentzat onartutako irizpide orokorrak betetzen baitituzte (190). NT2 zelula tratatu gabeek, zelula epitelialen aitzindarien ezaugarriak dituzte, baina tratamenduaren ostean, ezaugarri horiek galdu eta neurona izaera hartzen dute (189,191,192). RA zein AraC bidezko desberdintze-prozesua amaitzean, NT2ak zelula postmitotiko bilakatzen dira (NT2N). Hau da, tratamenduaren osteko NT2N zelulek ez dute bikoizteko gaitasunik, eta gainera, lortutako izaera neuronala epe luzean mantentzen dute. NT2 zelula-lerrotik eratorritako NT2N zelulen azterketa morfologikoan, zelula horiek neuronon oinarritzko ezaugarriak dituztela deskribatu da. Bi luzakin mota bereizi daitezke: zelularen gorputzetik irteten diren luzakin luze eta estuak (axoi itxurakoak) eta oinarri lodiagoa duten eta mehetuz eta adarkatuz doazen beste batzuk (dendrita itxurakoak) (189).

Hortaz, lerro hilezkor honek, desberdintze neuronalean ematen diren aldaketa biokimiko eta molekularrak ikertzeko aukera ematen du, alde batetik, azterketa biokimikoetarako zelula populazio homogenoen kantitate handia behar delako eta bestetik, kultura primarioko neuronek ez bezala, bektore ez-biralekin gene transferentzia erraz, seguru, azkar eta merkea burutzea ahalbidetzen duelako.

Esan bezala, badira NT2 zelulen desberdintzapen neuronalaren prozesuan PLC β 1-aren garrantzia aditzera ematen duten ebidentziak. Novak eta kolaboratzaileek, NT2ak NT2N neurona helduetan desberdintzean G $\alpha_{q/11}$, PLC β 1 eta PLC β 4 isoformen espresio mailaren eta PLC aktibitatearen igoera ematen zela deskribatu zuten (193). Are gehiago, gure taldeko emaitzek, amaierako zelula desberdinduetan ez ezik, NT2en desberdintzapen prozesuan zehar ere PLC β 1en espresioaren igoera izugarria ematen zela eta igoera hori, BIII-tubulina edo NF200 bezalako markatzaile neuronalen espresioaren igoeraren aurretik hasten zela frogatu zen, RA zein AraC-rekin tratatutako zeluletan (194).

II. HELBURUAK

Sarreran azaldu dugun moduan, nukleoko fosfoinositidoen metabolismoa eta PLC β 1 isoentzimaren presentzia deskribatu zenetik, zelula barneko kokapen honetako haien funtzioa zein den jakin nahian ibili dira ikerlari asko. Orain arte pilatu diren ebidentziek fosfoinositidoen metabolismoa eta, batez ere, PLC β 1-aren jarduna ziklo zelularren erregulazioarekin eta zelulen proliferazio zein desberdintze estimuluekin erlazionatu dute (58,64,103–110,69,70,75,78,89,100–102).

Desberdintze neuronalari dagokionean, PLC β 1-ak prozesu honetan izan dezaken inplikazioa ez da asko ikertu. Hala ere, badaude bide horretatik doazen hainbat ebidentzia. Alde batetik, garunaren garapenean inplikaturik egon daitezela deskribatu da (58,103,104,170–172). Bestetik, zitosoleko PLC β 1-ak, PC12 eta SK-N-AH lerro neuronalen desberdintze prozesuan parte hartzen duela eta egoera desberdindua mantentzeko beharrezkoa dela frogatu da orain dela gutxi (109,110). Eragin hau bideratuko luketen mekanismoei erreparatuz, PLC β 1-ak ziklo zelularreko erregulatzailen modulazioa eragin dezakela (91,109,181,182), gene isilpena inhibitu dezakela (108,110) eta nukleoko transkripzio guneetan kokatzen dela ikusi dugu (65,66,195,196).

Azkenik, PLC β 1-ak bi splicing aldaera dituela azaldu dugu. a eta b aldaeren C-terminaleko amaierako aminoazido sekuentzia desberdina da eta bakoitzaren zelula barneko kokapenean eragin dezakela ikusi dugu. Orain arteko ikerka gehienek ez dute bi aldaeren arteko bereizketarik egin eta baliteke bi populazioek funtzio edo eragin berdina ez izatea.

Ikerlan honetan giza jatorrizko NT2 zelula eredu erabili da, AraC-ren bitarte modu azkar eta eraginkorrean desberdindu daitezela erakutsi delako eta, ondorioz, desberdintze neuronalean ematen diren aldaketa biokimiko eta molekularrak ikertzeko aukera ematen duelako (190). Gainera, NT2 zelulen desberdintze eredu PLC β 1a-k zein PLC β 1b-k parte hartzen dutela frogatu du gure taldeak (194).

Hau guztia kontuan izanik, hona hemen tesi honetarako jarri diren helburuak:

1. Saguen Helduaroko Hipokanpoko Ama Zelula Neuronalen desberdintzapen neuronalaren prozesuan PLC β 1a/b-ren mRNA eta espresio proteikoa aztertzea.

2. Giza jatorrizko NT2 zeluletan, PLC β 1a/b-k izan dezaken ziklo zelularraren erregulazioko papera aztertzea

2.1. PLC β 1-aren gene isilpenak NT2-en ziklo zelularraren zinetikan duen eragina aztertzea

2.2. PLC β 1a eta PLC β 1b-ren gainespresioak NT2 zelulen ziklo zelularraren zinetikan duen eragina aztertzea.

2.3. PLC β 1a/b-ren kokapen nuklearreko mutanteen gainespresioak NT2 zelulen zikloaren zinetikan duen eragina aztertzea.

3. Giza jatorrizko NT2 zeluletan, PLC β 1a/b-k duen desberdintzapen neuronaleko papera aztertzea.

3.1. PLC β 1a eta PLC β 1b-ren gainespresioak NT2 zelulen morfologia eta markatzaile neuronalen espresioan duen eragina aztertzea.

3.2. PLC β 1a eta PLC β 1b-ren kokapen nuklearreko mutanteen gainespresioak NT2 zelulen markatzaile neuronalen espresioan duen eragina aztertzea.

3.3. PLC β 1-aren gene isilpenak AraC-k bideratutako NT2-en desberdintze prozesuan duen eragina aztertzea

III. MATERIALA

HELBURUAK

1. MATERIAL OROKORRA.

- Azido Azetiko Glaziala (Panreac, 211008.1211)
- Azido Borikoa (Panreac, 131015)
- Azida Sodikoa (Panreac, 122712)
- Azido Klorhidrikoa (Panreac, 141975).
- Behi albumina serikoa (Sigma, A3608).
- Bromofenol Urdina (Sigma, 11.439-1).
- DL-Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, 43815).
- EDTA (Sigma, ED).
- Filtro-Papera (Bio-Rad, 165-0962).
- Gelatina (Panreac, 142060)
- Glizerola (Sigma-Aldrich, G8773).
- Glizina (Bio-Rad, 161-0724).
- Isopentanoa.
- Metanol Absolutua (Sigma-Aldrich, 32213).
- Mowiola (Calbiochem, 17951).
- P-fenilendiamina 1,4-bentzediamina hidrokloruroa, PPD (Sigma-Aldrich, P1519).
- Paraformaldehidoa (Panreac, 141451).
- 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).
- Tris[Hidroximetil]aminometanoa (Trizma® Base, Sigma-Aldrich, T1503).

2. MATERIAL ESPEZIFIKOA

2.1. ZELULA KULTURA

2.1.1. Erabili eta botatzekoak

- 0.22 μm -ko poro tamainako xiringen filtroak (Millipore, SLGP05010).

MATERIALA

- 15 eta 50 ml-ko zentrifugatzeko hodiak (Corning, 430791 eta 430291).
- 25, 75 eta 150 cm²-ko azalerako zelula kulturarako botilak/ontziak (Corning, 3055, 430725 eta 430824).
- 5, 10 eta 25 ml-ko pipetak (Corning, 4487, 4487 and 4489).
- 6, 12 eta 24 putzuko kultura ontziak (Corning, 3516, 3513 eta 3526).
- 13mm-ko diametroko beirazko estalki zirkularrak (MENZEL, CB00130RA1)
- 18mm-ko diametroko beirazko estalki zirkularrak (MENZEL, CB00180RA1)
- Zelula arraspa/karrakailua (Corning, 3011).
- 96 putzutako EIA/RIA Plakak (Corning, 3590).

2.1.2. Transfekzio medioak

- DharmaFECT 1 Transfection Reagent (Dharmacon, T-2001-02)
- Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, 11668027)

2.1.3. Kultura medioak, osagarriak eta bestelako produktuak

- Citosina β -D-arabinofuranosidoa (AraC, Sigma-Aldrich, C1768).
- BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (Gibco, 354234).
- 5-bromo-2'-deoxyuridine. BrdU (Thermo Fisher, B23151)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, ATCC, 30-2002™).
- Phosphate Buffered Saline 10X (Lonza, 17-517Q).
- Fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, F6178).
- OptiMEM™ (Life Technologies, 51985-034).
- Poly-D-lysine hydrobromide (Sigma-Aldrich, P6407).
- Penicillin 10.000 U/mL, Streptomycin 10.000 μ g/mL (Lonza, 17-602E).
- Zelula kulturaren erabiltzeko dimetil sulfoxidoa, DMSO (ATCC, 4-X™)
- Zelula kulturaren erabiltzeko ur desionizatua (Sigma-Aldrich, W3500)
- Tripsina-EDTA (% 0,05), fenol gorria (GIBCO, 25300-054).
- Neurobasal-A (Gibco, 10888-022).
- Hazkuntza faktore epidermala, EGF (Tebu-Bio, AF-100-15-A).
- Fibroblastoen hazkuntza faktorea 2, FGF2 (Tebu-Bio, 167100-18B-B).
- Glutamax (Gibco, 35050-061).
- B27 (Gibco 17504044)

- Laminina (Sigma L2020)
- ACCUTASE™ (Steam Cell Technologies, #07920)

2.2. 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).
- Comassie Urdina (Bio-Rad, 161-0400).
- ECL Clarity™ Western Sustratua (Bio-Rad, 170-5060).
- Errebelatzailea (Sigma-Aldrich, 7042).
- Filme fotosentikoren fixatzailea (Sigma-Aldrich, P7167).
- Fenilmetilsulfonilo fluoruroa (PMSF, Sigma-Aldrich, P7626).
- Iodozetamida (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).
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787).
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, P1379-500ML).
- Urea (Sigma-Aldrich, U5378).
- β-mercaptoetanola (Sigma-Aldrich, M-7522).

2.3. Antigorputzak

2.3.1. Antigorputz primarioak

MATERIALA

Itua	Diluzioa		Hostalaria / Klonalitate a	Isotipo a	Antigenoa	Erreferentzia
	IF/IH C	WB				
β-aktina	-	1:5000 / 1:2000 0	Sagua/ monoklonal a	IgG1	β-aktinaren terminalaren duen epitopoa	N- amaiera Sigma-Aldrich, A5441
β-III- Tubulina	1:1000	1:3000 0	Oiloa/ poliklonala	Serum a	Giza eta arratoien β-III- Tubulinan kontserbatzen diren hiru eremuren peptido sintetikoa	Abcam, ab41489
BrdU	1:2000	-	Arratoia/ monoklonal a	IgG2a	BrdU molekula kimikoa	Novus- Biologicals, NB500-169
Ki67	1:2000	-	Untxia/ monoklonal a	IgG	Giza Ki67-ren C- terminaleko 2300-2400 aminoazidoei dagokien peptido sintetikoa.	Abcam, ab16667
PH3	1:1000	-	Untxia/ monoklonal a	IgG	Giza H3-ren Ser10-en inguruko hondarren aurkako fosfopeptido sintetikoa	Cell Signaling, #3377
GFP	1:1000	1:2500	Ahuntza/ poliklonala	Serum a	Sagu entzimaren muturraren 42 aminoazidoei dagokien peptidoa (NM198114)	DAGLα karboxi 42 DGLα-Go- Af1080-1 Frontier Science, DGLα-Go- Af1080-1
NF200	1:2000	1:1000 0	Oiloa/ poliklonala	IgY	Behiaren purifikatua	NF200 Abgent, AN1146
PLCβ1 (N-ter)	-	1:8000	Sagua/ monoklonal a	IgG1	Giza PLCβ1ren 4-159 arteko aminoazido sekuentzia	BD Transduction Labs., 610924
PLCβ1 (D-8)	1:250/ 1:1000	-	Sagua/ monoklonal a	IgG2b	Arratoiaren PLCβ1ren 831-1063 arteko aminoazido sekuentzia	Sta Cruz Biotech., sc- 5291
PLCβ1 (G12)	1:250/ 1:1000	-	Untxia/ poliklonala	Serum a	PLCβ1a bariantearen espezifikoa den C- terminala	Sta Cruz Biotech., sc- 205
PLCβ1 (R233)	1:250	-	Untxia/ poliklonala	IgG	Giza PLCβ1ren 831- 1063 arteko aminoazido sekuentzia	Sta Cruz Biotech., sc- 9050

2.3.2. Immunofluoreszentziarako antigorputz sekundarioak eta fluoresentziadun tindatzaileak

- Alexa Fluor 568 Goat anti-Rabbit (Invitrogen, A11036).
- Alexa Fluor 568 Goat anti-Mouse (Invitrogen, A11031).
- Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit (Invitrogen, A11034).
- Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse (Invitrogen, A11029).
- Alexa Fluor 488 Donkey anti-Goat (Invitrogen, A11055).
- DyLight 549 Donkey anti-Rabbit (Jackson Immuno Research, 711-506-152).
- DyLight 549 Donkey anti-Mouse (Jackson Immuno Research, 715-506-151).
- DyLight 649 Donkey anti-Mouse (Jackson Immuno Research, 715-496-151).
- DyLight 649 Goat anti-Chicken (Jackson Immuno Research, 103-495-155).
- Cy 5 Donkey anti-Rabbit (Jackson Immuno Research, 711-176-152).
- DyLight 488 Donkey anti-Chicken (Jackson Immuno Research, 703-486-155).
- Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich).

2.3.3. Western Blotterako antigorputz sekundarioak

- Anti-rabbit IgG HRP conjugate (Amersham, NA934).
- Anti-mouse IgG HRP conjugate (Amersham, NXA931).
- Anti-Goat IgG HRP conjugate (Sigma-Aldrich, A5420).
- Rabbit anti-Chicken IgY HRP conjugate (Sigma-Aldrich, A9046).

2.3.4. Serum normalak

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

2.4. Biologia molekularra

2.4.1. Agarosa geleko elektroforesia

MATERIALA

- Agarosa (D1 Low EEO, Conda, 8016).
- 100 bp-ko DNA ladder-a (Nippon Genetics, MWD100).
- 1kb-ko DNA ladder-a (Nippon Genetics MWD1).
- 1kb-ko DNA ladder-a (Thermo Scientific, SM1163).
- Pisu/tarte baxuko DNA ladder-a (Thermo Scientific, SM1203).
- GelRed azido nukleikoen tindatzailea 10000X (Biotium, 41003).

2.4.2. Bakterioen kultura

- Anpizilina Sodio Gatza (Sigma-Aldrich, A9518).
- Kanamizina Sulfato Osagarria (OXOID, SR0092).
- Bakterioen kulturarako LB Agar (Lennox) medioa solidoa (Conda, 1083).
- Bakterioen kulturarako LB Broth (Lennox) medioa likidoa (Conda, 1231).
- Petri ontzi esterilak (Kord, 905).
- ONE Shot TOP 10 Chemically Competent E. Coli (Invitrogen, C4040).

2.4.3. DNA purifikazioa

- NucleoBond® Xtra Midi Plus (Machery Nagel, 740412.50).
- Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up (Machery Nagel, 740609.250).
- NucleoSpin® Plasmid (Machery Nagel, 740588.250).

2.4.4. PCR eta klonajea

- KAPA HiFi PCR Kit, including high-fidelity Taq polymerase, buffers and dNTPs (KAPA Biosystems, KK2101).
- PCR hoditxoak (Bio-Rad, TCS0803).
- T4 DNA Ligasa (Takara, 2011A).
- 10X T4 DNA Ligasa Buffer-a (Takara, 2011A).
- Zero Blunt TOPO PCR Cloning Vector (Invitrogen, P/N 46-0757).

2.4.4.1. Errestrikzio entzimak (New England BioLabs, NEB)

Entzima	Itu zekuentzia (5'→3')	Erreferentzia
BglII	GCCNNNN [^] NGGC	R0143S

PmlI	CAC [^] GTG	R0532S
XhoI	C [^] TCGAG	R0146S
XmaI	C [^] CCGGG	R0180L

2.4.4.2. Errestrikzio entzimen bufferrak.

- NE Buffer 1 (New England Biolabs, B7001S).
- NE Buffer 2 (New England Biolabs, B7002S).
- NE Buffer 3 (New England Biolabs, B7003S).
- NE Buffer 4 (New England Biolabs, B7004S).

2.4.5. Erabilitako DNA konstruktoak

- pCDNA3.0-n klonaturiko PLC β 1 konstruktoak¹
 - pCDNA plasmido hutsa, kontrol negatiboa
 - pCDNA-PLC β 1a
 - pCDNA-PLC β 1b
 - pCDNA-PLC β 1a-M2b
 - pCDNA-PLC β 1b-M2b
- pSuperior.gfp/neo-n (Origene) klonaturiko PLC β 1-shRNA konstruktoak¹, EGFP reporter genea daramate.
 - shRNA01 → Scramble shRNA, kontrol negatiboa
 - shRNA-87 → PLC β 1-shRNA
 - shRNA-89 → PLC β 1-shRNA
 - shRNA-97 → PLC β 1-shRNA
 - shRNA-99 → PLC β 1-shRNA
- Small interfering RNAs (siRNA). ON-TARGET plus SMART pools, Dharmacon.
 - Non-target siRNA, kontrol negatiboa (D-001810-10-20)
 - PLC β 1 siRNA, giza PLC β 1 kodetzen duen mRNA-ren aurka (L-010280-00-0020)

¹ PCR eta klonazio bidez gure laborategian sortuak

IV. METODOAK

1. NT2 ZELULEN KULTURA, TRANSFEKZIO ETA DESBERDINTZAPENA

1.1. NT2 ZELULEN KULTURA

Giza teratokartzinomatik eratorritako NTERA2-D1 (NT2) zelulak (ATCC®, CRL-1973™), FBS %10an eta penizilina/estreptomizina (100 U/ml – 100 µg/ml) osagarri gisara duen DMEM® medio osoan inkubatu ziren 37°C-tara % 5-ko CO₂-a duen atmosfera hezean. Immunofluoreszentzia bidez aztertu ziren entseguetarako, aurrez PDL eta Matrigelaz trataturiko beirazko estalkietan erein ziren.

1.2. TRANSFEKZIOA

1.2.1. DNA transfekzioa

PLCβ1-ren isilpenerako shRNA plasmidoen eta gainespresiorako PLCβ1a/b eta lokalizazio nuklearreko mutanteen plasmidoen transfekzioa burutzeko, NT2 zelulak %70 konfluentziara heltzean Lipofectamine 2000-rekin transfektatu ziren, antibiotiko eta serumik gabeko medioan fabrikatzailearen argibideak jarraituz eta DNA 1 µg-ko 2 µL Lipofectamine ratioan. 0,5, 1 eta 2.5 µg DNA erabili ziren 24, 12 eta 6 putzuko plakako putzu bakoitzeko, hurrenez hurren. 4 orduz transfekzio medioan inkubatu ostean, medioa xurgatu eta medio osoan inkubatu ziren hurrengo egunetan.

1.2.2. siRNA transfekzioa

NT2 zelulen siRNA bidezko PLCB1 genearen isilpenerako gizakiarekiko espezifikokoak diren ON-TARGET plus SMART Pool siRNA (hemendik aurrera PLCβ1 siRNA) erabili zen (ikus materialen atala), gene beraren aurka doazen lau siRNA desberdinek osatuta dagoena. Kontrol moduan, ON-TARGET plus Non-targetin Control siRNA Pool (hemendik aurrera non-target siRNA) erabili zen, gizakiaren, saguen eta arratoien geneekin ia elkarrekintzarik ez duen lau siRNAz osatua dagoena. Transfekziorako DharmaFECT 1 Transfection Reagent erabili zen. Transfekzio nahastea prestatzeko fabrikatzailearen protokoloa jarraitu zen eta %70-80 konfluentziara zeuden zelulei gehitu zitzaizen antibiotikorik gabeko medio osoan,

METODOAK

siRNAen amaierako kontzentrazioa 25 nM-koa izanik. Hurrengo egunera arte inkubatu ziren transfekzio medioan zelula kulturen ohiko baldintzetan.

1.2.3. AraC bidezko NT2-en desberdintzapena

Zitosina β -D-arabinofuranosidoa (AraC) bidezko NT2 zelulen desberdintzapena gure ikerketa taldeak zehaztutako protokolutik moldatu zen (190). NT2 zelulak siRNA edo shRNA-rekin transfektatu eta 24 ordutara, % 80-90ko konfluentzian zeudela, AraC 20 μ M zuen hazkuntza medio osoarekin 72 ordu gehiagoz inkubatu ziren fijatu aurretik.

2. AHNSC-EN ISOLAMENDU, KULTURA ETA DESBERDINTZAPENA

2.1. AHNSC-EN ISOLAMENDUA

Lehenik sagu helduen disezioa burutu zen, ahalik eta baldintza esterilenetan. Ondoren, matrice extrazelularra digeritzen duen PDD (Papain, Dispase, DNase) soluzio entzimatikoa gehitu eta Pasteur pipetak erabiliz mekanikoki disgregatu ziren zelulak. Intereseko AHNSC-ak desberdintutako zelula, mielina eta matrice extrazelularretik banatzeko Percoll-a (%22an) gehitu eta zentrifugazioa buru zen elementuak dentsitate gradientearen arabera banatzeko. AHNSC-ak pelletean zeudenez, hau gainjalkinetik banandu eta hazkuntza medioan birsuspenditu ziren. Azkenik, PDL-az eta lamininaz trataturiko putzuetan erein ziren. Bi egunetik behin medioaren %50 medio prestatu berriarekin ordezkatzeko zen. Zelulak pixkanaka proliferatzen joan ziren eta 10 egunen buruan hazkuntza esponentzian zeuden (197).

2.2. AHNSC-EN KULTURA

Sagu helduen hipokanpotik isolatutako ama zelula neuronalak, B27 %2an eta Glutamax %1an osagarri gisara duen Neurobasal-A medioan (medio basala) inkubatu ziren, bFGF eta EGF-ren (20 ng/ml-ra biak) presentzian (hazkuntza medioa) eta aurrez aipaturiko tenperatura eta atmosfera baldintzetan. Kasu honetan,

PDL eta lamininarekin tratatzen zen alde zurretik zelulekin kontaktuan egongo zen substratua, plastikoa zein beira izan (197).

2.3. AHNSC-EN DESBERDINTZAPENA

AHNSC-ak desberdintzeko 40000 zelula erein ziren 24ko putzu bakoitzean eta bi egunez hazten utzi hazkuntza medioan. Indukziorako hazkuntza medioa desberdintzapen medioarekin ordezkatu zen, hau da, 5 ng/mL bFGF zituen medio basalarekin. Bi egunetik behin aldatu zitzaien medioaren %50 eta hazkuntza faktorerik gabeko medio basal berriarekin ordezkatu zen. Protokolo hau denbora luzeagoan mantendu daitekeen arren, gure kasuan 2, 4 eta 6. egunean fijatu ziren zelulak (197).

3. IMMUNOFLUORESZENTZIA ENTSEGUAK

3.1. FIXAPENA

Fixapenerako, zelulei medioa xurgatu eta paraformaldehidoa %4an duen fosfato bufferrean (PB 0,1 M, pH 7,4) inkubatu ziren 5 minutuz inguru tenperaturan. Ondoren, PBS-rekin garbitu ziren 3 aldiz eta 4°C-tara gorde immunofloreszentzia esperimenduekin hasi arte.

3.2. BRDU ANTIGENOAREN BERRESKURATZEA

BrdU-ren immunofloreszentzia bidezko markaketa aztertu beharreko kasuetan, antigenoa berreskuratzeko prozedura burutu zen immunofloreszentzia egin aurretik. Lehenik, PBS-T bufferrean (Tritoi X100, % 0,01) inkubatu ziren 20 min IT. Zelulak permeabilizatu ondoren, HCl 1N soluzioan inkubatu ziren 37 °C 40 minutuz. Jarraian, azido borikoarekin (0,1M pH 8,5) inkubatu ziren 10 minutuz IT inguru azidoa neutralizatzeko. Amaitzeko bi garbiketa egin ziren PBS-T bufferrarekin.

3.2.1. IMMUNOFLUORESZENTZIA

Immunofloreszentzia burutzeko gelatinadun histologia bufferra erabili zen: 0,1M PBS, pH 7,4, osagarri moduan gelatina % 0,22 eta saponina % 0,05 zituena. Lehenik, fixatutako zelula laginak blokeo bufferrean inkubatu ziren (BSA % 1ean eta sekundarioak sortu ziren animalia espeziaren serum normala % 1ean zituen

METODOAK

gelatina bufferra) ordu batez, inguru tenperaturan. Jarraian, intereseko antigenoak ezagutuko zituen antigorputz primariodun (ikus antigorputz primarioen taula diluzioetarako) blokeo bufferrean inkubatu ziren hurrengo egunera arte 4°C-tan. Hurrengo egunean, gelatina bufferrarekin 10 minutuko 3 garbiketa egin ostean, fluoroforodun antigorputz sekundariodun inkubatu ziren ordu betez inguru tenperaturan, blokeo bufferrean 1:400 diluituta. Erabilitako antigorputz sekundario guztiak espezie desberdinen aurka adsorbatuak izan ziren nahigabeko elkarrekintza ez-espezifikoak saihesteko. Nukleoak tindatzeko Hoeschst 33342 erabili zen 0,1 ug/mL-tan gelatina bufferrean. Azkenik, estalkiak beirazko porten gainean muntatu ziren Mowiol muntaia medioa erabiliz. Mowiolari prestakinen koloregabetzea ekiditeko PDD errektiboa gehitu zitzaion kasu guztietan.

3.2.2. MIKROSKOPIO BIDEZKO LAGINEN AZTERKETA

Irudi guztiak Carl Zeiss Axio Observer.Z1 epifluoreszentziako mikroskopioarekin egin/loritu (adquirir) ziren, HXP120C haluro metalikoko lanpara erabiliz argi iturri moduan eta erresoluzio altuko kamera monokromatiko (AxioCam Mrm, 1388 x 1040 pixel) batekin. Aparatu guztiak Carl Zeiss MicroImaging Inc (Gottigen, Alemania) etxe komertzialekoak dira. Epifluoreszentzia irudi konbentzionalak 20 x Plan-Apochromat objektiboarekin (NA 0,8) atera ziren. Erresoluzio handiko irudiak lortzeko ApoTome argi egituratuko modulua eta XYZ platina motorizatua eta 63 x Plan-Apochromat objektiboa (NA 1,4 erabili ziren). Sekzio optikoak eskuratzeko Zeiss ApoTome-a erabili zen eta 0,01 μm^2 pixel tamainako irudiak atera ziren. Honako filtro hauek erabili ziren: 49 DAPI (Ex G 365, Em BP 445/50) Hoescht markaketarako, 38 HE eGFP (Ex 470/40, Em 525/50) Alexa Fluor 488 –rako, 43 HE Cy3 shift free (Ex 550/25, Em 605/70) Alexa Fluor 568 eta DyLight 549 –rako eta 50 Cy 5 (Ex 640/30, Em 690/50) Alexa Fluor 647 eta Cy 5-erako. Irudiak Zeiss Axio Vision 4.8 software erabiliz digitalizatu ziren. Kanal bakoitzari pseudokolore bat ezarri zitzaion eta doikuntza txikiak egin zitzaizkien ImageJ softwarea (NIH, Bethesda, MD, USA) erabiliz. Azkenik, irudiak TIFF formatuan gorde eta Adobe Photoshop CS6-rekin (San Jose, CA, USA) batu eta izendatu ziren.

4. ZIKLO ZELULARRAREN ZINETIKA

4.1. NT2-EN NUKLEOKO BRDU METAKETAREN AZTERKETA. ZIKLO OSOAREN ETA S FASEAREN IRAUPENA.

Zelulen ziklo zelularra aztertzeko aukera bat, hauen nukleoan denboran zehar BrdU nola metatzen den aztertzea da. Metodologia hau oso erabili izan da animalien enbrioi garaiko zein jaio ondorengo NSZ-ren garapena aztertzeko (198,199). Bestalde, zelulen kulturak aztertzeko ere erabili izan da (200–202). Bi kasutan, teknika hau BrdU molekulak timidina nukleotidoarekiko duen analogian oinarritzen da. Bikoizketa gaitasuna duten zelulek, ziklo zelularren S fasean daudenean DNA bikoizten dute. Une horretan BrdU molekulak eskuragarri badaude ingurune zelularrean, timidina izango balitz bezala txertatzen dira DNA-n. Zelula S fasean irtetzean ere bertan mantenduko da eta immunofluoreszentzia bidez markatu ahal izango da.

Esperimentua burutzeko, lehenengo PLC β 1 siRNA eta non-target siRNA-rekin transfektatu ziren NT2 zelulak 6 putzuetako plakan, bina putzu baldintza bakoitzeko. Hurrengo egunean, baldintza bakoitzeko bi putzuetako zelulak guztiak batu eta 24 putzuko plakaren 20 putzutuan erein ziren PDL eta Matrigelarekin tratatutako beirazko estalkien gainean eta gau osoan hazten utzi ziren ohiko baldintzetan. Hurrengo egunean, zelulek % 60ko konfluentzia zutela, BrdU gehitu zitzaien medioan, 20 ug/mL-ra diluituz putzu bakoitzean. Ondoren, denbora tarte desberdinak igaro ahala zelulak fixatu ziren aldi bakoitzean bi putzutako estalkiak hartuaz. Honako denbora tarteak finkatu ziren: 0,5/1/2/3/4/6/8/12/24/32h.

BrdU eta Ki67 markatzeko immunofluoreszentzia entsegua egin ondoren, 5x5ko argazki mosaikoak egin ziren mikroskopioarekin (azalera) eta Zeiss Axio Vision 4.8 softwarearen laguntzarekin. Denbora puntu bakoitzeko bi estalki zeuden eta estalki bakoitzeko 3 argazki mosaiko lortu ziren.

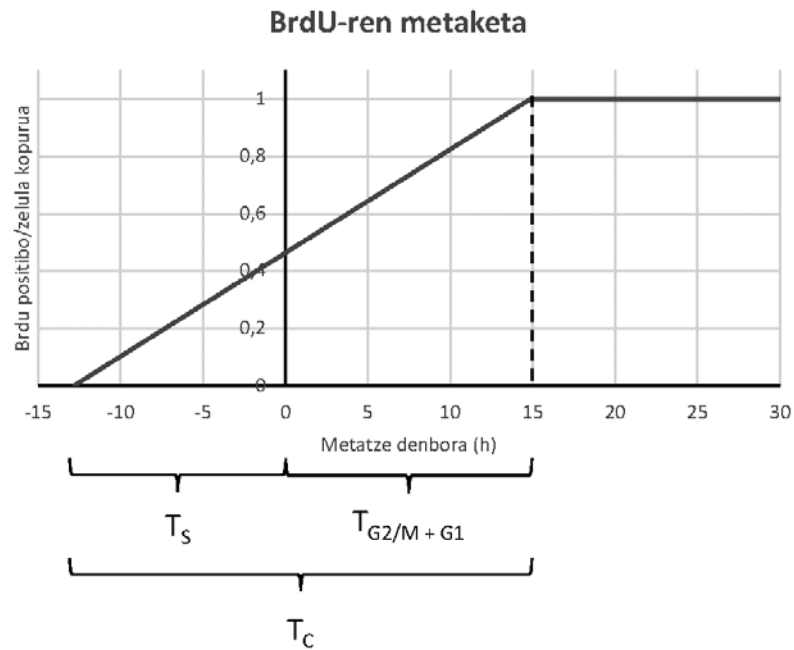
Nukleoren kontaketarako ImageJ softwareko Cell Counter plugging-a erabili zen. Lehenik nukleo guztietatik (Dapi markaketa) proliferatzen zeuden zelulen (Ki67 markaketa) ratioa kalkulatu zen Hazkuntza Frakzioa (HF) parametroa lortzeko. Jarraian, Dapi/Ki67 markaketa zuten nukleoak kontatu ziren alde batetik, eta, zenbatutako nukleo horietatik BrdU markaketa positiboa zutenak bestetik. Datu

METODOAK

horiekin BrdU-ren Markaketa Indizea kalkulatu zen, $MI = \text{nukleo BrdU+}/\text{proliferatzen dauden zelulak (Ki67 positiboak)}$. Estalki bakoitza hartu zen kontaketarako unitate bezala, hau da, 3 mosaikoetatik kontatutako Dapi/Ki67 nukleo guztien eta BrdU markaketa zutenen arteko ratioa kalkulatu zen. Horrela, denbora puntu bakoitzeko bi balio lortu ziren eta hauen batezbestekoa egin zen puntuak grafikoan irudikatu eta analisi estatistikoa burutzeko.

Lortutako zuzenaren ekuaziotik parametro hauek lortzen dira:

- S fasearen iraupena (T_S): zuzenak X ardatza mozten duen puntua ($y = 0$), balore absolututan.
- G2/M eta G1 faseen iraupena ($T_{G2/M+G1}$): $y = 1$ puntuan X-ak duen balioa.
- Zikloaren iraupen osoa (T_C): $T_S + T_{G2/M+G1}$



M.1. irudia. BrdU metaketaren entseguan lortzen den zuzenaren adierazpen grafikoa eta T_C , T_S eta $T_{G2+M+G1}$ parametroak.

4.2. FOSFOHISTONA 3-REN (PH3) MARKAKETAREN AZTERKETA. M FASEAREN ETA G2 FASEAREN IRAUPENEN KALKULUA

Aurreko ataleko esperimentuan bezala, lehenik NT2 zelulak transfektatu ondoran (6ko plakako putzu bat erabilia baldintza bakoitzeko) eta hurrengo egunean zelulak 24 putzuko plakan erein ziren PDL eta Matrigelarekin trataturiko

estalkien gainean. Kasu honetan, baldintza esperimental bakoitzeko 10 putzutan erein ziren, 5 denbora puntu finkatu baitziren alde aurretik: 1/2/4/6/8 h lehen esperimentuan eta 2/4/6/8/10 h bigarren eta hirugarrenean (lehenengo esperimentuko emaitzen arabera moldatu ziren). Hurrengo goizean, 20 μ M BrdU-rekin ordu betez inkubatu ziren eta medioa aldatu zitzairen ondoren. Jarraian, aipatutako denbora desberdinetan finkatu ziren zelulak, hasierako puntua (T0) BrdU pultsua jartzen zen unea zela kontuan harturik.

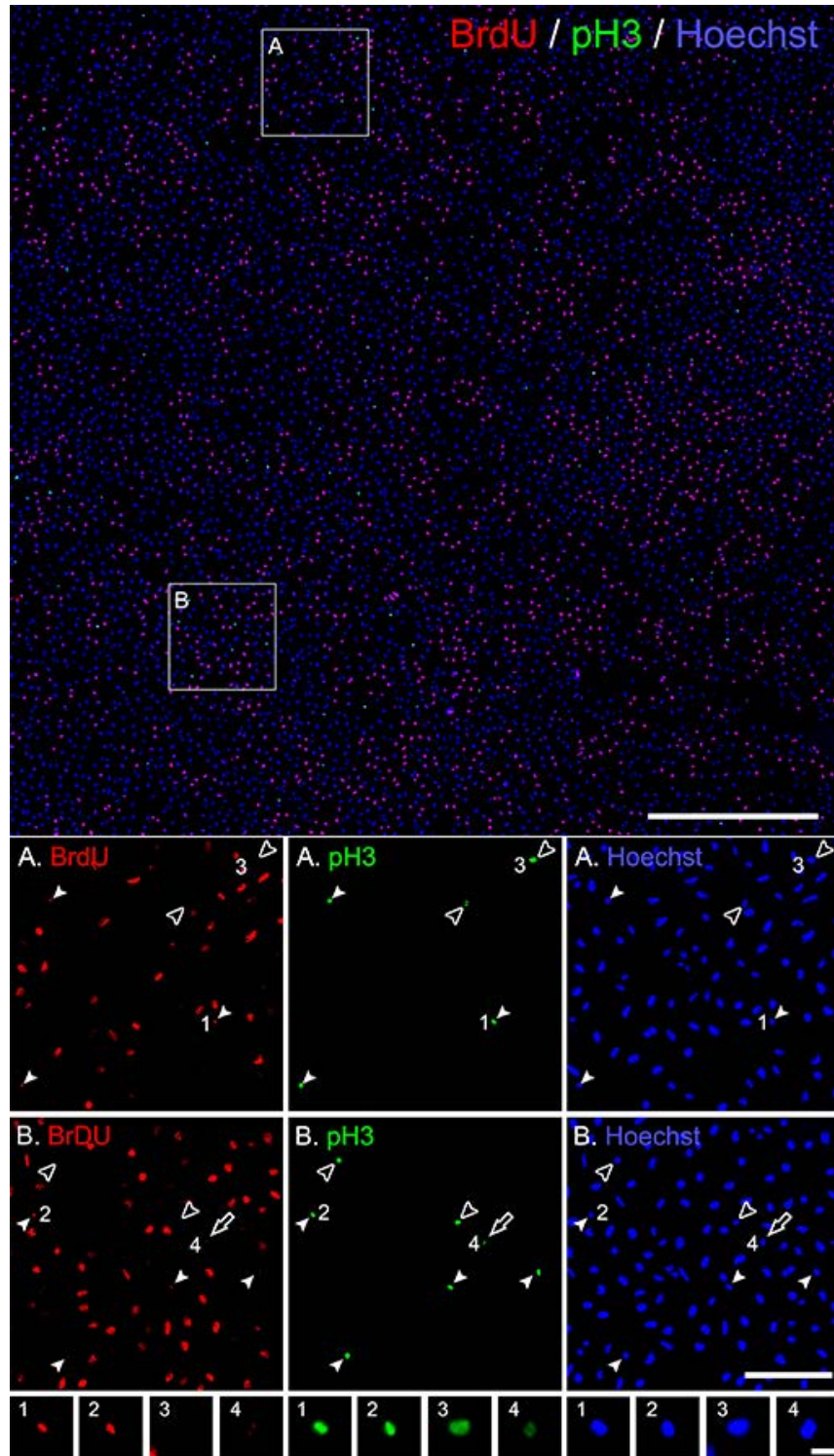
Ondoren immunofluoreszentzia entsegua burutu zen BrDU eta PH3-ren aurkako antigorputzekin. Jarraian, argazki mosaikoak egin eta intereseko nukleoen kontaketa egin zen ImageJ-ko Cell Counter plugginarekin (M.2. irudia). Alde batetik nukleo guztien artean zeuden PH3 nukleo positiboak kontatu ziren Indize Mitotikoa (IM) kalkulatzeko. Aipatu beharra dago, PH3 interfasearen amaieran (G2 amaieran) modu lausoan espresatzen hasten den arren, eta nukleo horiek ez direla positibotzat hartzen. Profasean sartzean, nukleoen markaketa oso bizia da eta kromatinaren trinkotzea ikus daiteke (203).

IM-rekin eta aurreko atalean lortutako parametroekin M fasearen iraupena (TM) kalkula daiteke ekuazio honen bidez:

$$TM = Tc \times \frac{IM}{HF}$$

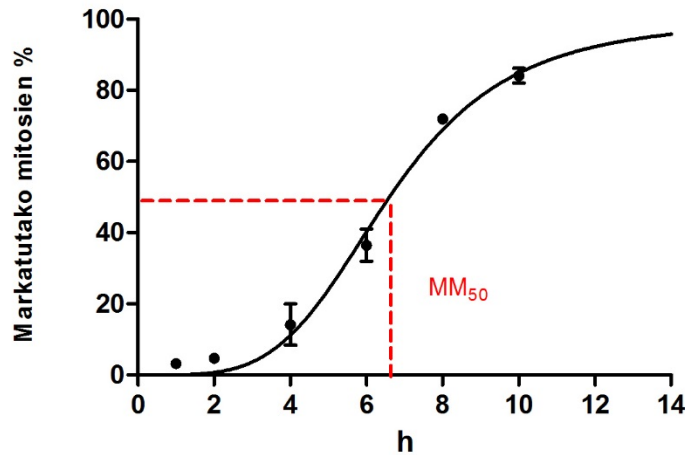
Bigarrenik, G2 fasearen iraupena kalkulatzeko denbora puntu bakoitzean BrdU positiboen artean zenbat ziren PH3 positiboak kontatu ziren (M.2. irudia). Puntuak sigmoide batera doitu ziren GraphPad Prism softwarearekin. Hau izan zen erabilitako ekuazio matematikoa:

$$Y = Bottom + (Top - Bottom) \times \frac{X^n}{(MM50^n + X^n)}$$



M.2. irudia. M eta G2 fasearen iraupena kalkulatzeko erabilitako NT2 zelulen nukleoan immunfluoreszentzia entsegu bikoitza, mitosiaren markatzailea den PH3-ren aurkako antigorputzarekin (berdea), BrdU-ren aurkako antigorputzarekin (gorria) eta Hoechst nukleoan tindatzailearekin (urdina) markatuta. Goiko irudian, prestakin bateko argazkiekin osatutako mosaikoa; behean, PH3 positibo eta negatiboen zoom handiagoko irudiak.

Non Bottom = 0,0 eta Top = 100,0 bezala finkatu ziren. Ekuazio honetatik MM50 parametroa kalkulatu zen, hau da, mitosi markatuen erdira iristeko behar den denbora. Parametro hau, zelula guztien TG2 –ren batez besteko denboraren baliokidetzat hartzen da (erreferentziak).



M.3. irudia. Mitosi markatuen ehunekoen kurba eta MM₅₀ parametroa.

Azkenik, G1 fasearen iraupena ziklo osoaren iraupenari gainontzeko faseen iraupena kenduz kalkulatzen da.

$$TG1 = TC - (TS + TG2 + TM)$$

5. WESTERN BLOT

5.1. ZELULA HOMOGENATUEN PRESTAKETA

Aztertu beharreko zelulak PBS-rekin bi aldiz garbitu eta karrakailu batekin jaso ziren PBS garbian. Zentrifugatu (abiadura) ondoren, gainjalkina xurgatu eta zelula pelleta -80°C-tara gorde zen entsegu egunera arte. Western blot bidezko proteinen azterketarako zelula homogenatua prestatzeko, zelula pelletak lisi buffer X-ean bireseki eta XX tamainako xiringatik pasarazi ziren hiru aldiz.

5.2. PROTEINA KUANTIFIKAZIOA ZELULA LAGINETAN: AZIDO BIZINKONINIKOAREN ENSTEGUA (BCA).

METODOAK

Metodo honen bitartez proteina kantitateak determinatu ahal izateko abcam-en BCA proteina-kuantifikazio kit-a (abcam, ab102536) erabili genuen. Patroi zuzena egiteko kit-eko BSA soluzio estandarra (stock 10 mg/ml) erabili genuen X taulan agertzen den moduan seriean egindako diluzio ezberdinekin 0,5 eta 0,0156 mg/ml kontzentrazio tartean. Lagin problemaren kasuan, laginak diluitu genituen patroi zuzena barruan sartu zitezkeen kontzentrazio estimatu batera (bi puntu berdin lagin bakoitzeko) eramanaz.

Saiodia	Abiatze disoluzioa	Buffer (μ l)	Kontzentrazioa (mg/ml)
6	6 μ l (stock)	120	0,5
5	8 (120 μ l)	120	0,25
4	7 (120 μ l)	120	0,125
3	6 (120 μ l)	120	0,0625
2	5 (120 μ l)	120	0,03125
1	4 (120 μ l)	120	0,015625

96ko plaka baten putzu bakoitzean, BSA disoluzio estandarren edo laginaren 50 μ l eta kit-ak dakartzan agente kupriko eta BCA (1:50) nahasketa baten 100 μ l gehitu zitzaizkien. Nahasketa hauek astiro eraginez ordubetez 37°C-tara inkubatu genituen. Ondoren, 562 nm-tako absorbantziak neurtu ziren Tecan® (Sunrise) ekipoarekin. Horrela, laginen kontzentrazioa kalkulatu genuen patroi zuzenaren puntuen erregresio linealaren bitartez.

5.3. LAGINEN PRESTAKETA ETA ELEKTROFORESIA

Lan honetarako burututako Western blot-ak aldeztuak diren deskribatuta dauden bezala burutu dira, aldaketa txikiak batzuk egin diren arren. (Garro et al., 2001; López de Jesús et al., 2006; Montana et al., 2012). Zelula homogenatuak desnaturalizatzeko UREA 4X desnaturalizazio bufferra (300 mg urea; 50 mg SDS; 120 mg DTT; 500 μ l 100 mM Tris-HCl; pH 8,0; 6 μ l bromofenol urdina %1 -p/b-) erabili zen eta kontzentrazio egokia lortzeko behar adina glizerol (% 10-12) eta H₂O gehitu zitzaizkien. Ondoren 100°C-tan inkubatu ziren 5 minutuz.

Desnaturalizatutako laginak, SDS-poliakrilamida gel gradientean (SDS-PAGE) kargatu (%7 eta 10 artean, intereseko proteinen pisu molekularren arabera) eta elektroforesia burutu zen. Horretarako Mini Protean II gel (BioRad, Hércules, CA, USA) ekipoa erabili zen 100 V 2h inguruz.

5.4. TRANSFERENTZIA ETA IMMUNOBLOT-A

Proteina gelean zehar pisu molekularren arabera banatutakoan, oreka handiagoa lortzeko asmoz, metanol puruarekin aktibatutako PVDF (polyvinylidene fluoride, polibinilideno fluoruroa) mintz batera transferitu ziren gau osoan zehar inkubatuz 4°C-tara 30 Vko korronea aplikatuz. Horretarako, Mini TransBlot (BioRad, Hércules, CA, USA) ekipoa erabili zen. Hurrengo egunean, mintzak ur distilatuarekin garbitu eta guztiz lehortu arte utzi ondoren, proteinak mintzean ondo fixatzeko metanol puruarekin behidratatu eta azido azetiko %7 (b/b) eta metanol %10 (b/b) soluzio fixatzailean inkubatu ziren 15 minutuz, ingurune tenperaturaran eta agitazioan. Jarraian, PBS-T garbiketa bufferrarekin (0,2 M PB; pH 7,5; % 0,1 Tween 20 -b/b-) garbitu eta blokeo bufferrean (0,2 M PB, pH 7,5; % 0,2 Tween 20 -b/b-, esne-hauts gaingabetua % 5 -p/b-, BSA % 0,5 -p/b-) inkubatu ziren ordu betez eta ingurune tenperaturan, lotura-toki inespezifikokoak estaltzeko. Ostean, antigorputz primarioak inkubatu ziren esne-hautsik gabeko blokeo bufferrean diluituta (ikus taula) gau osoan zehar 4°C-tara, agitazio arinean. Hurrengo goizean, mintz bakoitzari PBS-T tanpoiarekin 10 minutuko 3 garbiketa egin zitzaizkion eta, antigorputz primarioa sortua den espeziea ezagutuko duen errefau-peroxidasarekin (HRP) konjokatutako antigorputz sekundarioan inkubatu ziren 90 minutuz eta inguru tenperaturan, esne-hautsa daraman blokeo bufferrean (1:10000 diluzioan).

5.5. Detekzioa

Lortutako immunomarkaketaren erbelaketarako, Clarity Western ECL sistema (BioRad) fabrikatzailearen argibideen arabera erabili genuen. Sortutako kimilumineszentzia seinalea X-izpi filmean zuzenean eskuratu edota ImageQuant 350 (GE Healthcare) sistemaren bitartez eskuratu eta digitalizatu genuen (190).

6. KLONAJEA

6.1. Prozedura orokorrak

6.1.1. Elektroforesia agarosa gelean.

Agarosa gelak prestatzeko (% 0,8 eta 1,5 bitartean, DNA zatien luzeraren arabera), behar adina agarosa pisatu eta TAE 1X-an (40 mM Tris-azetato, 1mM EDTA) nahastu zen, guztiz disolbatu arte irakinda 60°C inguruan. DNA laginak kaleetan kargatzeko 5X tindatzailearekin diluitu ziren. Kargatu ostean, 90-135 V artean burutu zen elektroforesia 20-45 minutu artean, DNA zatien luzeraren arabera, banda guztiak elkarrengandik ondo bereizi ahal izateko. Gel txikien elektroforesirako (lortutako konstruktoen egokitasuna aztertzeko digestioen ostean esaterako) Wide Mini-Sub Cell GT System (BioRad) aparatua erabili zen eta gel handientzat (purifikatu beharreko DNA zatien gelen kasuan) Mupid® One Electrophoresis System (Eurogentec). Elektroforesia TAE 1X buffer hotza erabiliz burutu zen eta DNA laginez gain, 100 bp edota 1 kb-ko DNA ladderra kargatu ziren laginen DNA zatien pisua ezagutzeko.

Elektroforesi osteko DNAREN tindaketa GelRed azido nukleikoen tindatzailearekin egin zen, etxe komertzialak adierazitako diluzioan inkubatuz 30-60 minutuz. DNA banden UV transiluminazio bidezko bistaratzea/ikustea eta irudien eskuratzea ImageQuant 350 Digital Image System (GE Healthcare) aparatuarekin burutu zen.

6.1.2. DNA purifikazioa agarosa geleko elektroforesiaren ondoren

UV argian ikusten ziren intereseko DNA bandak hartzeko, bisturi garbi batekin banda dagoen lekuan agarosa gela zatitu eta eppendorf garbi batean gorde ziren. Geletik DNA purifikatzeko Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up kit komertziala erabili zen, amaierako eluzioko pausura arte DNA zutabeen atxikirik mantentzean oinarritzen dena. Eluziorako 30-50 µL eluzio bufferra edo H₂O ultrapurua erabili ziren.

DNA kontzentrazioa neurtzeko NanoDrop ND-1000 espektrofotometroa erabili zen. Espektrofotometro honek absorbantzia 260 nm-ko uhin luzeran neurtzen du eta proteina eta beste ezpurutasunen kontaminazioa dagoen edo ez aztertzeko 260/280 nm-ko eta 260/230 absorbantzien ratioa kalkulatzeko dituen,

hurrenez hurren. Balioak ontzat eman ziren r260/280 1,7-1,9 tartean eta r260/230 2,0 eta 2,2 tartean bazeuden.

6.1.3. Plasmidoen transformazioa zelula kimikoki konpetenteetan

Lehenik One Shot TOP 10 E. coli zelula konpetenteak desizoztu ziren izotzetan. Ondoren, ligazio produktuaren 5 uL eta desizoztutako 25 uL bakterio nahastu ziren, kontu handiz pipeteatuz diametro handiko pipeta punta esterilekin. Nahastean 30 minutuz izotzetan mantendu ostean, 30 segunduko shock termikoa xxxx zitzaien 42° C-ko bainuan murgilduz. Bainutik izotzetara atera ondoren, bakteriak 250 uL LB medio esterilera gehitu eta ordu betez inkubatu ziren 37° C-tan, agitazioan. Amaitzeko, bakterio hauek anpizilina edo plasmidoa erresistentea izango den beste antibiotiko bat duen LB agar plakan erein ziren eta hurrengo egunera arte inkubatu 37° C-tan. Purifikatutako plasmidoen kasuan, bakterioei gehitu aurretik diluzio bat egin zen, plasmidoaren kontzentrazioa nabarmenki handiago izaten baita.

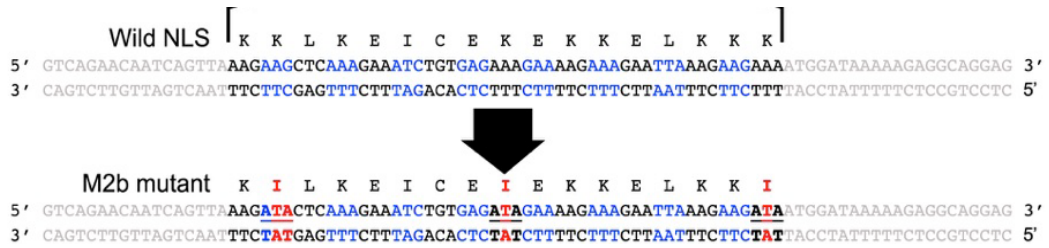
6.1.4. Plasmidoen anplifikaziorako bakterioen hazkuntza.

Agar plaketan hazitako intereseko plasmidodun kolonia isolatuak pipeta punta esterilarekin ziztatu eta plasmidoa erresistentea zen antibiotikoa zeraman LB medioan inokulatu ziren eta gau osoan zehar hazten utzi ziren baldintza aerobikoan, 37° C-tan eta agitazioan. Hurrengo egunean, 5000 x g-ra 15 minutuz zentrifugatu eta lortutako bakterio pelletetik plasmidoak purifikatu ziren NucleoSpin® Plasmid edo NucleoBond® Xtra Midi Plus kit komertzialekin (erreferentziak materialen atalean).

7. PLCB1A/B-AREN LOKALIZAZIO NUKLEARREKO MUTANTEEN (M2B) ERAKETA.

Sarreran aipatu den bezala, PLCβ1-aren 1055-1071 aminoazidoen artean argininan eta lisinan aberatsa den eremu bat dago, proteina hau neuronan nukleoan metatzea eragiten duena (NLS). Eremu honetako 1056, 1063 y 1070garren lisina hondarrak isoleuzinaz ordezkatzean (M2b mutantea), nukleoan sartzeko gaitasuna galtzeaz gain, dominante negatibo moduan funtzionatzen duela deskribatu da (39).

METODOAK



PLCβ1a-M2b eta PLCβ1b-M2b mutanteak sortzeko, lehenik mutazioa zeramaten PLCB1 geneen sekuentzia zatiak sortu ziren PCR bidez eta pCR-BluntII klonazio bektorean txertatu ziren. Bitarteko bektorean zegoen insertoa zuzena zela frogatu ostean, pcDNA-PLCβ1a eta pcDNA-PLCβ1b plasmidoetan ordezkatu ziren.

7.1. Primerren diseinua eta overlap PCR

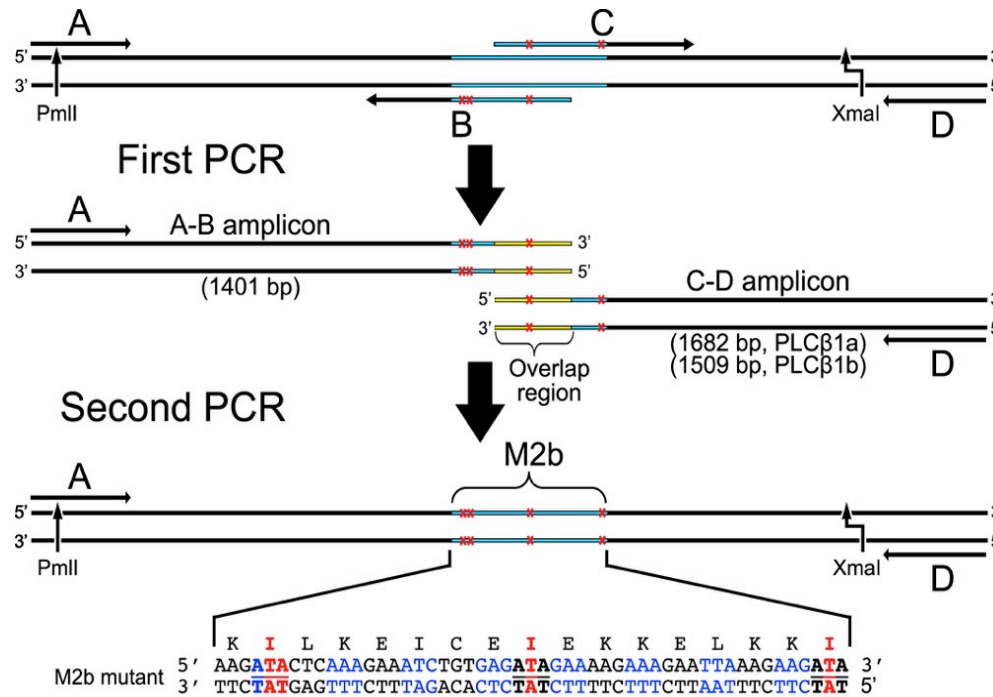
M2b mutanteak sortzeko beharrezkoa zen lau mutazio txertatzea NLS sekuentzian. Sekuentzia teorikoa kontuan izanik lau primer diseinatu ziren ondorengo sekuentziekin:

	Izena	Sekuentzia 5'>3'	bp
A	PLCb1_PmlI Fw	GAACACGTTGGATTTCATCC	20
B	M2b_Rv	TTCTTTCTTTTCTATCTCACAGATTTCTTTGAGTATCTTTA ACTGATTGTTCTGAC	56
C	M2b_Fw	AATCTGTGAGATAGAAAAGAAAGAAATTAAGAAGATAAT GGATAAAAAGAGGCAGGAG	58
D	pCDNA_XmaI Rv	CCTCATCCTGTCTCTTGATC	20

Beheko irudian azaltzen den moduan, B eta C primerrak diseinatu ziren NSL eremuko mutazioekin, PCR-an gainezartzeko 25 base pareko eremua konpartitzen zutela. A eta D primerrak, aplikioiak hurbileneko errestrikzio guneak barne izateko diseinatu ziren.

Lehenengo PCR-a hiru tututan burutu zen, A eta B primerrak erabiliz batean eta C eta D bestea beste bietan. Horrela, alde batetik 1401 bp zituen A-B aplikioia lortu zen eta bestetik, 1682 bp-ko C-D PLCβ1a aplikioia eta 1509 bp-ko PLCβ1b aplikioia. Hiru aplikioiak purifikatu ostean, bigarren PCR-a egin zen A-B eta C-D

PLCβ1a-rekin batetik eta A-B eta C-D PLCβ1b-rekin bestetik. Bi kasuetan A eta D primerrak erabili ziren.



Hona hemen erabilitako erreaktibo orokorrak:

Erreaktibo orokorrak	Erabilerako kontzentrazio/bolumenak
PCR buffer (5X)	1X (2mM Mg ⁺⁺)
dNTPs mix (10mM)	0,3 mM (bakoitzetik)
HiFi Taq polimerasa	1 μL
Primerrak (10 μM)	0,3 μM

MyCycler™ Thermo Cycler Systems termozikladorea erabili zen PCRak burutzeko, ondorengo programarekin:

METODOAK

PREHEAT	94°C	5 min		
HEAT	96°C	1 min	}	X 30
ANNEALING*	63/70°C	30 s		
EXTENSION	72°C	1 min		
	72°C	5 min		
	4°C	<u>Hold</u>		

*Bi hibridazio (annealing) temperatura probatu ziren, A eta D primer-en Tm-a 63 °C ingurukoa baitzen eta C eta D primer-ena 70 °C ingurukoa.

7.2. PCR produktua pCR-Blunt II klonaziorako bektorean txertatzea

Bigarren erreakzioko M2b-1a eta M2b-1b aplikoiak purifikatu ondoren, pCR-BluntII klonazio bektorean txertatu ziren T4 Ligasa erabiliz. Honako erreaktibo hauek nahastu eta gau osoan mantendu ziren 16 °C-tan.

- Ligasa buffer 10X 2 µL
- pCR-BluntII bektorea 1 µL
- PCR produktuak (M2b-1a edo M2b-1b) 1 µL
- H2O ultrapurua 5 µL
- T4 Ligasa 1 µL

Lortutako plasmidoarekin bakterio kompetenteak transformatu ziren eta kanamizina zuen agar plakan erein ziren. Hazi ziren koloniak aplikatu ostean, plasmidoa erauzi eta sekuentzia egokia zela frogatu zen. Lehenengo, Xho errestrikzio entzimarekin digeritu eta lortzen ziren sekuentzien bandak sekuentzia teorikoarekin bat zetoze frogatuz zen. Ondoren, sekuentziatzerara bidali ziren sekuentziak zuzenak zirela eta mutazio espontaneorik gertatu ez zela ziurtatzeko.

7.3. pCDNA-PLCβ1 eta pCR-BluntII-M2b-ren digestioa.

Lortutako pCR-BluntII-M2b-a/b plasmidoak eta pCDNA-PLCβ1a/b plasmidoak PmlI eta XmaI errestrikzio entzimekin digeritu ziren. Bi pausutan egin zen digestioa.

Lehen digestioa (PmlI)	pCDNA-PLC β 1a/b	pCR-BluntII-M2b-a/b
Plamidoa (10 μ g)	7 μ L	2 μ L
BSA (100X)	1 μ L	1 μ L
NEB Buffer 1 (10X)	10 μ L	10 μ L
PmlI	2 μ L	2 μ L
H2O	81 μ L	85 μ L

Bigarren digestioa (XmaI)	pCDNA-PLC β 1a/b eta pCR-BluntII-M2b-a/b
Lehen digestiotik	50 μ L
BSA (100X)	1 μ L
NEB Buffer 4 (10X)	10 μ L
XmaI	2 μ L
H2O	37 μ L

Digeritutako sekuentziak agarosa gelean kargatu eta elektroforesia egin ostean, intereseko sekuentzia zatiak purifikatu ziren.

PmlI/XmaI-rekin digeritutako bektoreak	Intereseko zatia
pCR-BluntII-M2b-a	3003 bp
pCR-BluntII-M2b-b	2849 bp
pCDNA-PLC β 1a	6099 bp
pCDNA-PLC β 1b	6099 bp

7.4. Ligazioa

Bektore eta inserto purifikatuekin ligazioa buru zen erreaktiboa nahastu ondoren gau osoan 16 °C-tan mantenduta.

METODOAK

➤ pCDNA-PLC β 1a edo pCDNA-PLC β 1b	1 μ L
➤ M2b-1a edo M2b-1b insertoa	4 μ L
➤ H ₂ O ultrapurua	7,5 μ L
➤ Ligasa buffer 10X	1,5 μ L
➤ T4 Ligasa	1 μ L

Hurrengo egunean, bakterio konpetenteetan transformatu eta anpizilina zuen agar plaketan eragin ziren. Lortutako kolonia isolatuak ziztatu eta LB medioan hazi ziren plasmidoa amplifikatzeko. Plasmidoak bakteriotatik erauzi eta purifikatu ondoren sekuentziak zuzenak zirela frogatu zen BgIII eta XhoI entzimekin screening digestioa eginda lehenik eta sekuentziatzera bidalita ondoren.

8. QPCR

Zelula laginak Tri-erreaktiboarekin (Euromedex) homogeneizatu ziren eta ondoren, RNA isolatu zen kloroformo/isopropanol protokolo estandar batekin. RNA-ren prozesamendua eta analisia argitaratutako metodo moldatuen bidez burutu zen (204). cDNA sintetizatzeke 2 μ g RNA total erabili ziren eta RavertAis Premium Reverse Transcriptase (Fisher Scientific) oligo dT eta ausazko primerekin (Fisher Scientific). qPCR-a burutzeko LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche) sistema erabili zen. Lortutako cDNA, primer espezifikoak (taula) eta LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche) erreaktibo nahastu ziren bolumen totala 10 μ L-koa zelarik. Lagin bakoitzeko bi qPCR erreakzio egin ziren. PCRko datuak Neurocentre Magendie-n garatutako GEASE softwarearekin (Genen Expression Analysis Software Environment) exportatu eta analizatu ziren (<https://bioinfo.neurocentre-magendie.fr/outils/GEASE/>). Erreferentziako geneen determinazioa burutzeko GeNorm metodoa erabili zen (205). PLC β 1-aren eta splicing aldaera bakoitzaren RNA espresio erlatiboen analisia PCR-ren eraginkortasunaren arabera zuzendu zen lehenik eta erreferentziatzeko geneak erabiliz normalizatu ziren datuak ondoren. RNA espresio maila erlatiboa kalkulatzeko 2- $\Delta\Delta$ CT konparaziozko metodoa erabili zen (205).

qPCR-rako erabilitako primer espezifikoak			
	GenBank ID	Aurreranzko sekuentzia	Atzeranzko sekuentzia
PLC β 1	NM_001145830	GAAATTGGAGAAGAGTGAACGGATA	CCAATGTCCTGCCATAACCAC
PLC β 1a	NM_019677	CCTCAGTCTTGTTCGGAAGGTT	TGAGGGTTGGGGGGGAGTAAA
PLC β 1b	NM_001145830	TCGATGAGAAGCCCAAGCTG	CAGGGGCAGCCTTTTGAACT

9. ANALISI ESTADISTIKOA

Emaiza guztien analisi estatistikoa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., 5.0 bertsia, San Diego, CA) softwarearekin egin zen. Datuak, batez besteko \pm SEM moduan adierazita daude. Bi buztaneko T-testa (datu binakatuekin edo binakatu gabekoekin) edo faktore bakarreko ANOVA-rekin analizatu ziren datuak, eta talde desberdinen arteko konparaketarako Tukey-en konparazio anitzeko testa egin zen azken kasu honetan. Esangura estatistikorako $p < 0.05$ baldintza ezarri zen.

V. EMAITZAK

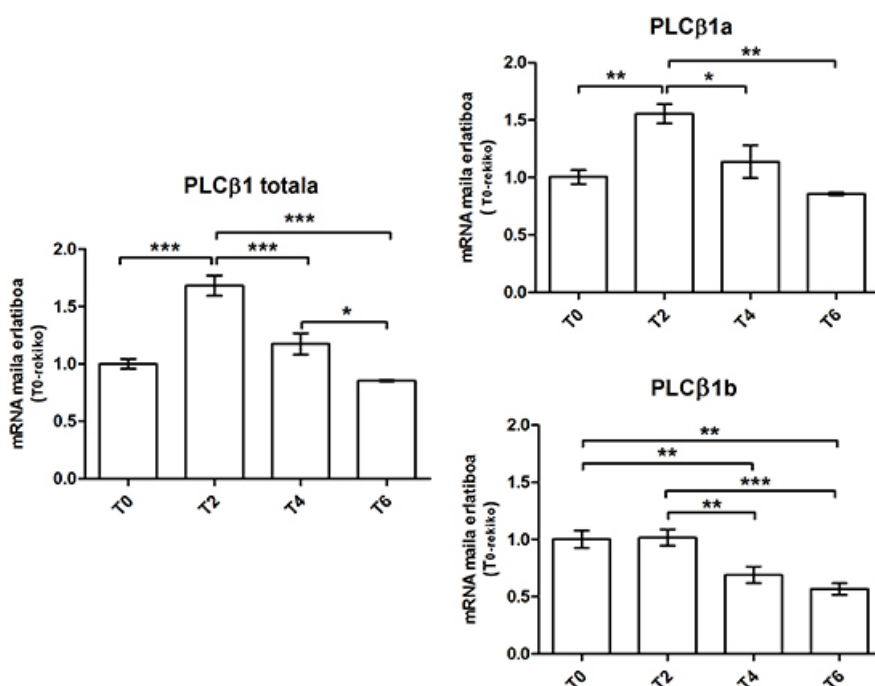
1. PLC β 1a/b-REN ESPRESIOA HELDUAROKO HIPOKANPOKO AMA ZELULA NEURONALEN DESBERDINTZE PROZESUAN

Sarreran aipatu bezala, hainbat zelula ereduren desberdintze prozesuan inplikaturik dago PLCB1, baita neuronen desberdintze prozesuan ere. Horren adibide dira Gonzalez-Burgueraren (2015) tesiko emaitzak. Bertan, azido erretinoikoarekin (RA) zein AraC antimitotikoarekin tratatutako NT2 zelulen desberdintze neuronalean PLC β 1a/b-ren espresio mailak handitzen direla deskribatzen da (194). Horrela, tesi honen lehen atalean, aurrez deskribatutako fenomeno desberdintze neuronalaren beste eredu zelular batean aztertu nahi izan genuen. Helburu hau betetzeko, Bordeleko Magendie Neurocentre-ko Nora Abrous doktorearen taldean egindako egonaldia baliatu nuen. Abrous doktorearen taldea aditua da Helduaroko Neurogenesian. Zehatzago esanda, hipokanpoko bihurtze hortzdunaren neurogenesisia eta prozesu horren eta hipokanpoko funtzio ezberdinen arteko erlazioa aztertzen dituzte (206–210). Erabiltzen dituzten tekniken artean, saguen hipokanpoko hartz bihurtzeko AHNSC-en isolamendu, kultura eta desberdintze prozesua nola burutzen zen ikasi nuen eta PLCB1-en espresio mailen azterketa egin nuen. Zelula hauek, bihurtze hotzduneko ama zeluletatik eratorritako aitzindari neuronalak dira.

1.1. PLC β 1a/b-ren mRNA mailen analisia AHNSC-en desberdintze prozesuan

Lehenik, AHNSC-en desberdintzapen prozesuko 0, 2, 4 eta 6. egunetako PLC β 1 totalaren eta splicing aldaera bakoitzaren mRNA-ren espresio maila aztertu zen qPCR-ren bidez (ikus metodoen 7. atala). Gure emaitzen arabera, PLC β 1-ari dagokion mRNA totala 1,68 aldiz handiagoa zen desberdintze prozesuaren bigarren egunean desberdindu gabeko zelulekin alderatuz (T2: $1,68 \pm 0,09$. *Emaitzen ataleko datu guztiak batezbesteko \pm SEM moduan adierazita daude*). Laugarren eta seigarren egunean, PLC β 1 totalaren mRNA maila jaitsi egiten zen, desberdindu gabeko zelulen pareko izan arte eta zertxobait gehiago jaisten zen seigarren egunerako (T4: $1,17 \pm 0,05$; T6: $0,85 \pm 0,04$). Aldaera bakoitza bere aldetik analizatzean desberdintze prozesuko mRNA mailen profila desberdina zela ohartu

ginen. PLC β 1a-k PLC β 1 totalaren profil beretsua zuen, hau da, mRNA mailen igoera gertatzen zen bigarren egunean ($1,56 \pm 0,08$) eta hasierako egoerara itzultzen zen hurrengo egunetan (T4: $1,14 \pm 0,14$; T6: $0,86 \pm 0,01$). PLC β 1b-ren mRNA maila, aitzitik, berdina zen desberdindu gabeko AHNSCetan eta desberdintze prozesuko bigarren eguneko zeluletan (T0: $1,00 \pm 0,04$; T2: $1,02 \pm 0,07$). Ondorengo egunetan, PLC β 1b-ren mRNA mailak jaitsiera nabarmena pairatzen zuen (T4: $0,69 \pm 0,04$; T6: $0,57 \pm 0,03$) (E.1.1. irudia).



E.1.1 irudia: AHNPC-en desberdintze prozesuko 0, 2, 4 eta 6. eguneko qPCR bidez lortutako mRNA maila erlatiboak, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Datu guztiak faktore bakarreko ANOVA-rekin analizatu ziren, eta talde desberdinen arteko konparaketa Tukey-en konparazio anitzeko testarekin burutu zen.

Beraz, AHNSC-en desberdintze prozesuan mRNA mailan gertatzen diren aldaketek, PLC β 1a/b-k prozesu honetako funtzioaren bat bete dezakela iradokitzen du. Aipatu beharra dago, ordea, analizatu ziren laginen zelula populazioa heterogeneoa zela. Izan ere, AHNSCen desberdintzapena indultzatzen zelula neuronalen, glia zelulen eta proliferatzen jarraitzen duten aitzindarien kultura

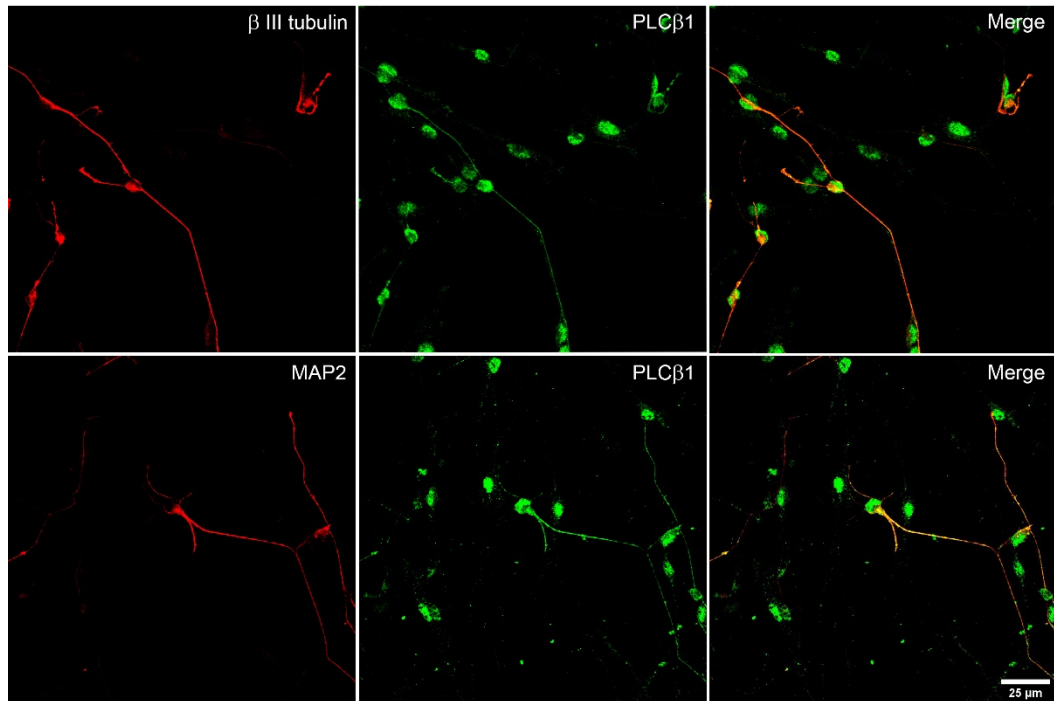
heterogeneoa lortzen da. Hori dela eta, hurrengo pausua fenotipo neuronalak zuten zelulen PLC β 1a/b proteina maila aztertzea zen.

1.2. Immunofluoreszentzia bikoitzaren bidezko PLCB1-aren espresioaren analisia AHNPC zelulen desberdintze prozesuan

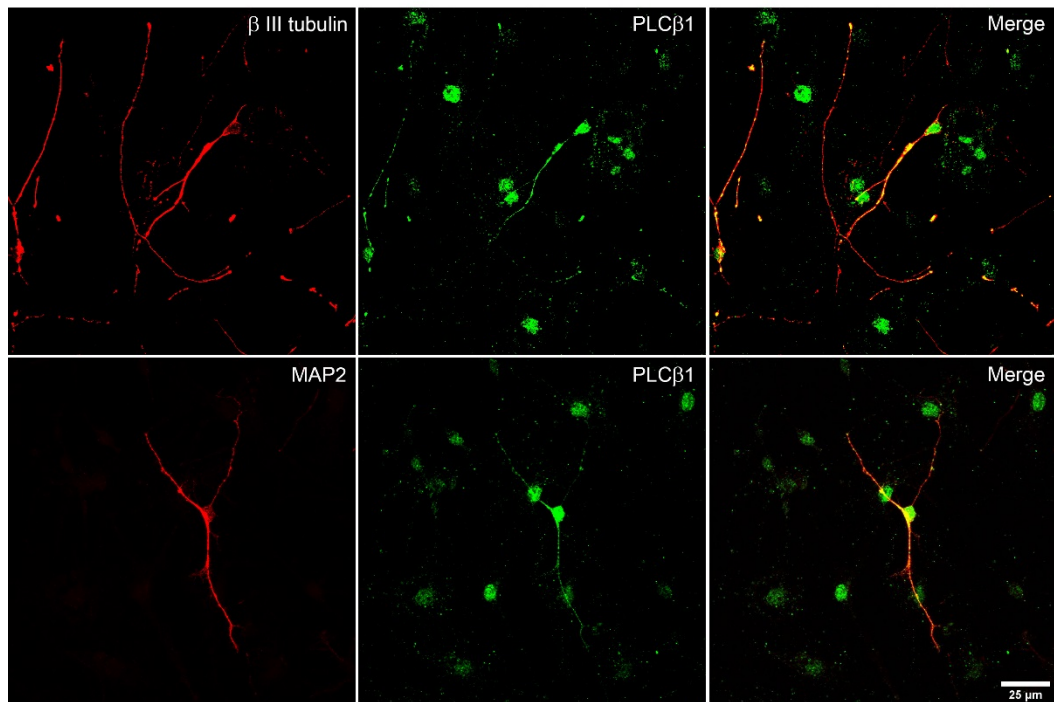
Ondoren, AHNSC-en desberdintze prozesuko bigarren eta laugarren egunetan zelula neuronalek zuten PLC β 1 proteinaren espresio maila aztertu zen immunofluoreszentzia entseguen bitartez. Horretarako, PLC β 1-aren bi splicing aldaerak ezagutzen dituen R233 antigorputza erabili zen, β III tubulina edo MAP2 markatzaile neuronalen aurkako antigorputzarekin batera.

Ondokoa esan genezake entseguaren emaitzei buruz. Lehenik, β III tubulina edo MAP2 espresatzen zen zeluletan, hots, zelula neuronaletan, PLC β 1-aren markaketa nabarmenki biziagoa zen neuronalak ez ziren gainontzeko zelulekin alderatuz gero, bai desberdintze prozesuko bigarren egunetan eta baita laugarrenean ere. E.1.2. irudian ikus daitezkeen bezala, PLC β 1 zelula neuronalen luzakinetan eta nukleoan espresatzen zen. Neuronalak ez diren zeluletan, bestalde, nukleoetan soilik ikus zitezkeen markaketa.

AHNSC-en desberdintze prozesuko 2. eguna

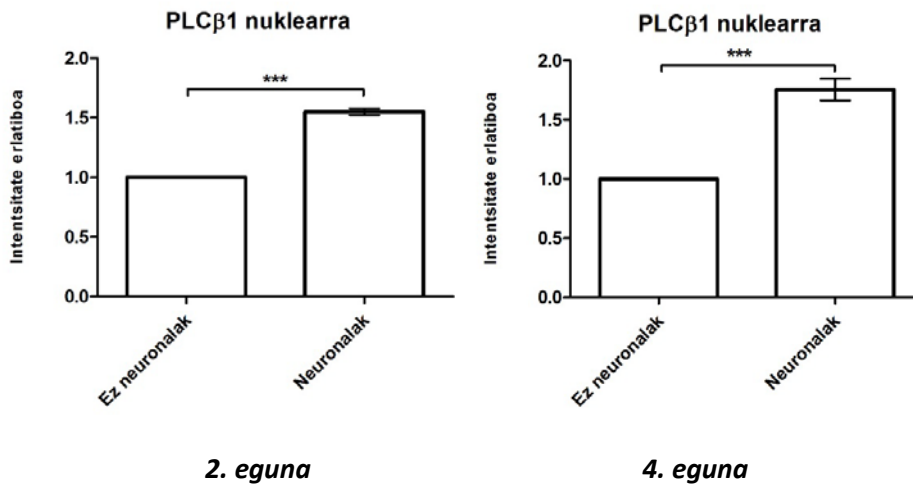


AHNSC-en desberdintze prozesuko 4. eguna



E.1.2. irudia: AHNPC-en desberdintze prozesuko bigarren eta laugarren egunen fixatutako zelulen immunofluoreszentzia entsegu bikoitza. β III tubulina edo MAP2-en aurkako antigorputzarekin (gorria) eta PLC β 1-aren (R233) aurkako antigorputzarekin (berdea) markatuta. Eskala barra = 25 μ m.

Zelula neuronalen eta ez-neuronalen nukleoko markaketaren artean desberdintasunik zegoen frogatzeko, nukleoetako PLC β 1 markaketaren intentsitatea neurtu zen ImageJ softwarearekin. Desberdintze prozesuko bigarren eta laugarren egunetan, neuronen nukleoaren PLC β 1 markaketaren intentsitatea zelula ez-neuronalena baino 1,55 eta 1,76 aldiz handiagoa izan zen (E.1.3. irudia).



E.1.3. irudia: AHNPC-en desberdintze prozesuko bigarren eta laugarren egunen fixatutako zelulen immunofluoreszentzia irudietan neurtutako PLC β 1-ren intentsitate ratioen grafikoa, batez bestekoa eta SEM moduan adierazten dira (n=10). Anlisi estatistikorako datu binakatuentzako T test-a erabili zen.

qPCR zein immunofluoreszentzia entsegetako emaitzek AHNSC-en desberdintze prozesuan PLC β 1-aren espresioan aldaketak daudela erakusten dute. Izan ere, argi erakutsi da, desberdintze bide neuronala hartzen duten aitzindariak, bai nukleoan eta baita neuritetan ere, PLC β 1 espresio maila handiagoa dutela gainontzeko zelulekin alderatuz. Hori dela eta, PLC β 1 AHNSC-en desberdintze prozesu neuronala bideratzen duten mekanismo molekularretan inplikaturik egon daitekeela pentsa daiteke, NT2 zelulen RA zein AraC bidezko desberdintze ereduaren frogatu den bezala (194).

2. PLC β 1-AREN PAPERAZ ZIKLO ZELULARREAN.

Aurreko atalean AHNSC-en desberdintze prozesuaren lehen orduetan PLC β 1-aren espresio mailaren igoera gertatzen dela erakutsi dugu. Ildo beretik, gure ikerkuntza taldeko aurreko emaitzek, NT2 zelulen RA zein AraC bidezko desberdintze neuronal ereduaren ere, fenomeno bera gertatzen dela frogatu dute (190). Hala, ebidentzia hauek PLC β 1 desberdintze prozesu neuronalean inplikaturik egon daitekeela iradokitzen dute.

Desberdintze prozesu neuronalaren eta PLC β 1-aren arteko erlazioa sakonago aztertu nahi izan genuen jarraian. Neurogenesis ziklo zelularren dinamikekin erlazionatuta dagoela deskribatu da sarri. Izan ere, ama zeluletatik neurona heldu bilakatu arte sortzen diren aitzindari mota desberdinen ziklo zelularren iraupena ez da berdina. Oro har, zelularen desberdintze maila zenbat eta altuagoa izan orduan eta luzeagoa da ziklo zelularra. Era berean, zatiketa asimetrikoa egiten duten aitzindarien zikloa zatiketa simetrikoa egiten duten aitzindariena baino luzeagoa da. Aldaketa hauek, nagusiki, zikloaren G1 fasekoak direla deskribatu da. (167,168).

PLC β 1-ari dagokionez, ziklo zelularren erregulazioan parte hartu dezakela iradokitzen diguten ebidentziak daude. Alde batetik, entzima honen aktibitatea desberdina da zikloaren fase bakoitzean, handiagoa izanik G1/S trantsizioan (136,138,211) eta G2/M faseetan (137,140,141). Bestetik, PLC β 1-ak hainbat zelula ereduaren desberdintzea edo proliferazioa bultzatzen duela frogatu da (105,107,142). Desberdintze eredu neuronaletara jotzen badugu, PLC β 1-aren gene isilpenak PC12 eta SK-N-AH zelulen proliferazioa bultzatzen duela, hau da, ziklo zelularren abiadura handitzen duela deskribatu da (109). Azkenik, ekintza mekanismoei dagokienez, PLC β 1 G1 fase goiztiarraren erregulatzailer nagusia den D3/CDK4 konplexuarekin lotura estua duela deskribatu da hainbat ikerketatan (91,107,181,182).

Hortaz, kapitulu honetan PLC β 1-ak NT2 zelulen ziklo zelularren zinetikan eragin zezakeen ikertu nahi izan genuen Horretarako, hiru hurbilketa esperimental erabili genituen. Lehenik, NT2 zeluletan PLC β 1-aren gene isilpena eragitean ziklo zelular osoaren eta fase bakoitzaren iraupena nola aldatzen zen aztertu genuen. Ondoren, PLC β 1-aren bi splicing aldaeren gainespresioak NT2-en proliferazio

gaitasunean nola eragiten zuen ikertu genuen. Azkenik, PLC β 1-aren gainespresioak eragindako ondorioen erantzulea nukleoko PLC β 1a edo PLC β 1b den aztertu genuen, entzima honen kokapen nuklearreko mutanteen gainespresioaren bitartez.

2.1. PLC β 1-REN GENE ISILPENAK NT2-EN ZIKLO ZELULARRAREN ZINETIKAN DUEN ERAGINA

PLC β 1-ak ziklo zelularraren erregulazioan parte hartzen duen frogatzeko lehen urratsa, PLC β 1 isilduta zuten NT2 zelulen zikloko faseen zinetikak aztertzea izan zen. Gene isilpena eragiteko PLC β 1-aren espresioa eragozten zuten siRNA espezifikoak erabili ziren (ikus metodoen 1.2.2 atala). Zelulen zikloaren zinetika aztertzeko, bi prozedura esperimental erabili ziren: BrdU metaketaren analisia, T_C , T_S eta $T_{G1+G2+M}$ parametroak kalkulatzeko, eta PH3 markaketaren analisia, T_{G1} , T_{G2} eta T_M parametroak kalkulatzeko.

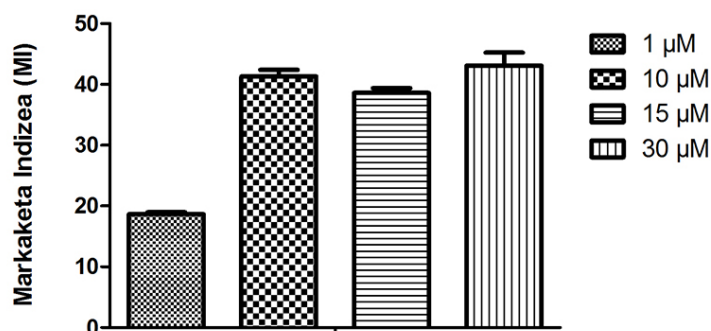
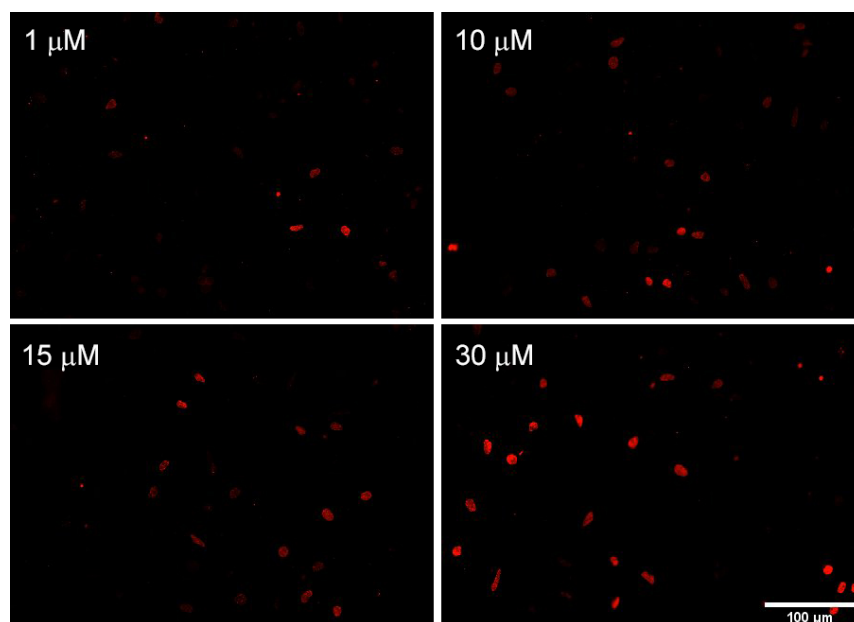
2.1.1. BrdU metaketaren analisia: T_C , T_S eta $T_{G1+G2+M}$ parametroen kalkulua.

BrdU metaketaren analisia zelulen ziklo osoaren eta S fasearen iraupena kalkulatzeko erabiltzen den metodoetako bat da. BrdU, timidinaren analogoa izanik, zelulen DNA-n txertatzen da hau bikoizten denean, hau da, S fasean. Zelulen medioan gehitu eta hainbat denbora tartetan BrdU barneratu duten nukleoaren ratioa kuantifikatuz gero, ziklo zelularraren eta S fasearen iraupena kalkulatu daiteke (ikus metodoen 4.1 atala).

2.1.1.1. BrdU metaketaren analisirako doikuntza entseguak: BrdU dosia eta markaketaren profila

Metaketaren entseguekin hasi aurretik, 15 minutuko inkubazio denbora laburrean BrdU markaketa egokia lortzeko lau kontzentrazio (1, 10, 15 eta 30 μ M) probatu ziren. BrdU 1 μ M-rekin inkubatutako zelulen nukleo positiboak antzematea oso zaila zenez, zenbatu ziren nukleoaren ehunekoak beste hiru baldintzetan kontatutakoa baino baxuagoa izan zen. 10, 15 eta 30 μ M-ko kontzentrazioen kasuan, nukleo positiboaren portzentajea antzeko izan zen. Alabaina, kontzentrazioa igo ahala markaketa distiratsua lortzen zenez, errazagoa zen nukleo positibo eta negatiboaren arteko bereizketa egitea. Argitaratutako artikulu gehienetan 10 μ M-ko kontzentrazioa erabiltzen den arren (212–214), 15 minutuko inkubazio denboran

kontzentrazio hori nahikoa ez zela ikusi genuen (E.2.1. irudia). Hori dela eta, zinetika entsegu guztietako BrdU kontzentrazioa 20 μM -tan finkatu genuen.



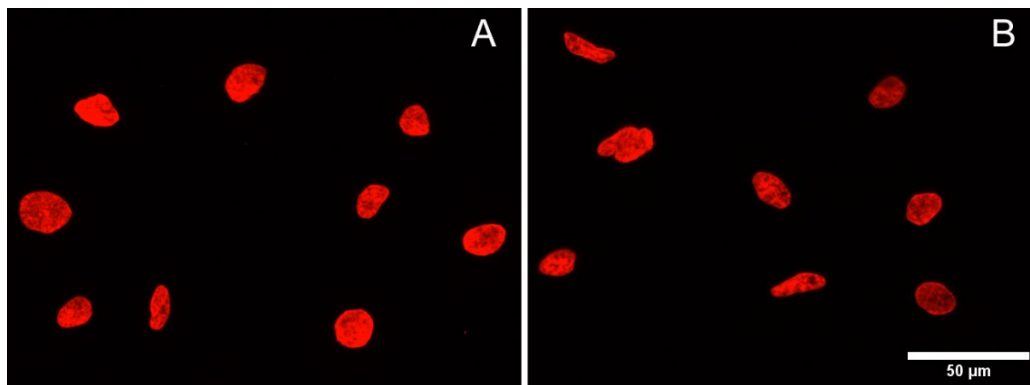
E.2.1. irudia: BrdU metaketaren analisirako BrdU dosia zehazteko doikuntza entsegua. Irudietan, BrdU-ren aurkako antigorputzak (gorria) ematen duen markaketaren profila, NT2 zelulak 1 μM , 10 μM , 15 μM edo 30 μM BrdU-rekin inkubatu ondoren. Eskala barra = 100 μm . Grafikoan, dosi bakoitzarekin kuantifikatutako markaketa indizea, batezbesteko eta SEM moduan adierazita ($n=4$).

2.1.1.2. BrdU metaketaren analisirako doikuntza entseguak: BrdU pultsuak

Zelulen zikloaren zinetikak aztertzeke prozedura esperimental honek animalia ereduetan du bere jatorria (198,199,215). Kasu hauetan, BrdU-ren dosia

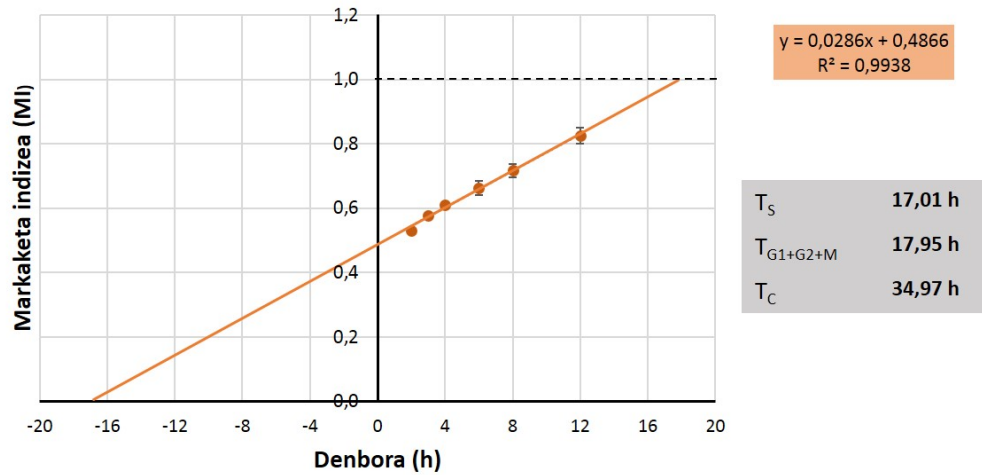
administratzen zitzaion animaliei denbora puntu bakoitzeko. Zelula-kulturen kasuan, medioa aldatzen ez den bitartean BrdU bertan mantentzen dela pentsa daitekeen arren, hori ziurtatu nahi izan genuen lehenik. Hala, 20 μM -eko BrdU pultsu bakar bat edo bi ordutik behin pultsu gehigarriak (6 pultsura iritsi arte) jaso zituzten nukleoek markaketak konparatu ziren, tratamendurik jaso ez zuten NT2 aitzindarietan.

E.2.2. irudian ikusten den bezala, BrdU pultsu bakarra edo 6 pultsu jasotako zelulen immunofluoreszentzia bidezko markaketen artean ez zen desberdintasun nabarmenik ikusi. Honenbestez, pultsu bakarra jarri zen ondorengo entsegu guztietan.



E.2.2. irudia: BrdU markaketaren analisirako BrdU pultsu kopurua zehazteko doikuntza entsegua. Irudiean, BrdU-ren aurkako antigorputzak (gorria) ematen duen markaketaren profila, NT2 zelulak BrdU pultsu bakar batekin (A) edo 6 pultsu gehigarriekin (B) inkubatuta. Eskala barra = 50 μm .

Bestalde, pultsu bakarreko laginekin denbora puntuen Markaketa Indizea (MI) kuantifikatu eta osatzen zuten zuzenaren kalkulua burutu zen (E.2.3. irudia). Puntu esperimentalak oso ondo doitzen ziren erregresio linealarekin kalkulatu zuzenera. Jarraian, zuzenaren ekuaziotik T_s , $T_{G1+G2+M}$ eta T_C parametroak kalkulatu ziren (ikus metodoen 4.2. atala).

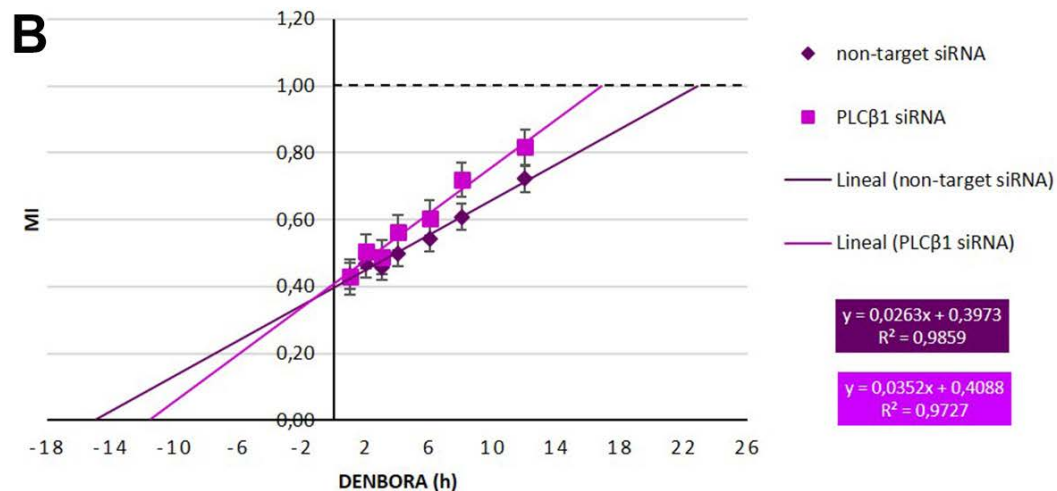
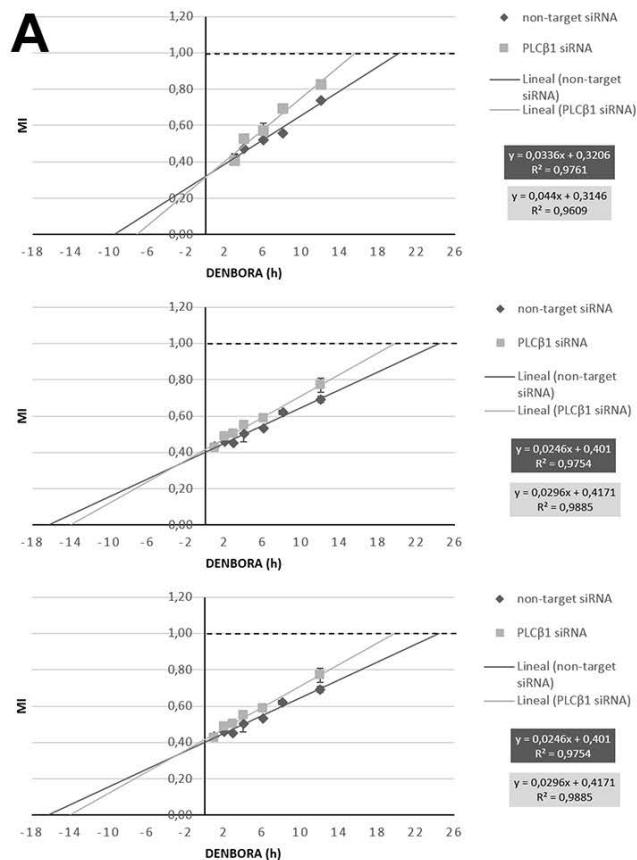


E.2.3. irudia: Pultsu bakarreko BrdU metaketa entseguan lortutako Markaketa Indizeen adierazpen grafikoa: Denbora puntu bakoitzeko MI puntuak, hauek osatzen duten zuzena ($Y=0$ -tik $Y=1$ -ra) eta zuzenaren ekuazioa adierazten dira. Taulan: zuzenaren ekuaziotik lortutako zikloaren parametroak.

2.1.1.3. BrdU metaketaren azterketa PLC β 1 gene isilpena eragindako NT2-etan

Doikuntza entseguen emaitzekin protokoloa finkatu eta intereseko esperimenduak burutu genituen jarraian. Esan bezala, NT2 zeluletan PLC β 1-aren espresioa isiltzean ziklo zelularreko zinetikan aldaketarik gertatzen zen aztertzea, zen atal honen helburua. Horretarako, NT2 zelulak non target siRNA edo PLC β 1 siRNA-rekin transfektatu eta hurrengo egunean BrdU metaketaren azterketa burutu zen. Analisisirako, Ki67 positiboak ziren nukleoak soilik hartu ziren kontuan, hau da, ziklon zeudenak. Entsegua hiru errepikapen egin ziren eta puntuen batezbestekoa egin zen ondoren amaierako zuzenak kalkulatzeko.

Hiru errepikapenetan non-target siRNA eta PLC β 1 siRNA-rekin transfektatutako zelulen zuzenak desberdinak ziren. Malden arteko desberdintasunak esangura estatistikorik ez bazuen ere, zuzenen $Y = 0$ eta $Y = 1$ -ekiko ebakitze puntuak desberdinak ziren hiru errepikapenetan. T_S , $T_{G1+G2+M}$ eta T_C parametroen kalkulurako puntuen batezbestekotik lortutako zuzenak erabili ziren. E.2.4. C irudian ikus daitekeen bezala, lortu ziren parametroen balioa txikiagoa zen PLC β 1 siRNA-rekin transfektatutako zeluletan, hau da, zikloa laburragoa zen. Hori dela eta, PLC β 1-aren isilpenak NT2-en ziklo zelularren bizkortzea eragiten zuela ondoriozta dezakegu.



C

	Non-target siRNA	PLCβ1 siRNA
T_s (h)	13,88	11,65
$T_{G1+G2+M}$ (h)	22,12	17,11
T_c (h)	36,00	28,76

E.2.4. irudia. **A:** non-target siRNA edo PLCβ1 siRNA-rekin transfektatutako NT2 zelulen BrdU metaketaren hiru entsegetako Markaketa Indizeen adierazpen grafikoak. Denbora puntu bakoitzeko MI puntuak, hauek osatzen duten zuzena ($Y=0$ -tik $Y=1$ -ra) eta zuzenaren ekuazioa adierazten dira grafiko bakoitzean. **B:** Hiru errepikapenen batezbesteko grafikoa. **C:** non-target siRNA edo PLCβ1 siRNA-rekin transfektatutako NT2 zelulen zikloko parametroen taula. S fasearen, G1+G2+M faseen eta ziklo osoaren iraupena.

2.1.2. T_{G2} eta T_M parametroen kalkulua PH3 markaketaren bidez.

Ziklo osoaren eta S fasearen iraupena nola kalkulatzeko azaldu dugu aurreko atalean. Zikloaren gainontzeko faseen iraupena fosfohistona 3-aren (PH3) markaketaren azterketaren bidez egin genuen. PH3-a zelulak mitosian daudenean espresatzen den proteina da eta immunofluoreszentzia bidez markatu daiteke. Markaketa honen bitartez M fasearen eta G2 fasearen iraupena estimatu daiteke (ikus metodoen 4.2 atala).

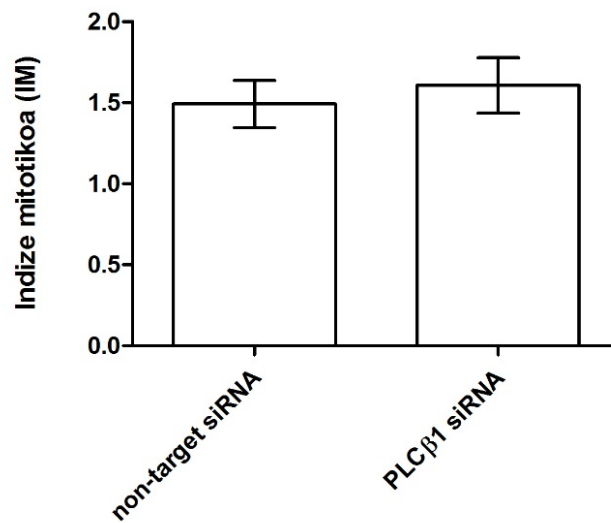
2.1.2.1. Hazkuntza faktorea

Hazkuntza faktorea (HF) proliferatzen dauden zelulen ehunekoa adierazteko erabiltzen da eta Ki67 proliferazio markatzailearen espresioaren arabera kalkulatu da. BrdU markaketaren entseguetako zenbaketa egiteko Ki67 positiboak ziren nukleoak soilik hartu zirenez kontuan, ez zen beharrezkoa izan HF zuzenketa faktore gisa aplikatzea lortutako emaitzetan. Alabaina, jarraian azaltzen den Indize mitotikoaren kalkulurako beharrezkoa izan zen zuzenketa faktore hau aplikatzea.

Non-target siRNA-rekin transfektatutako zelulen HF % 98,25koa \pm 1,46 zen eta PLC β 1 siRNA-rekin transfektatutako zelulena % 97,70koa \pm 1,17.

2.1.2.2. Indize mitotikoa

Indize mitotikoa (IM), une konkretu batean mitosian dauden zelulen eta zelula kopuru totalaren arteko erlazioa adierazten du eta M fasearen iraupena kalkulatzeko erabiltzen da (ikus metodoen 4.2 atala). Gure kasuan, non-target siRNA-rekin transfektatutako zelulen IM 1,492 \pm 0,145 zen eta PLC β 1 siRNA-rekin transfektatutako zelulen IM 1,607 \pm 0,171. Binakako eta bi buztaneko t-test-aren arabera, bi taldeen IM-ak berdinak ziren.



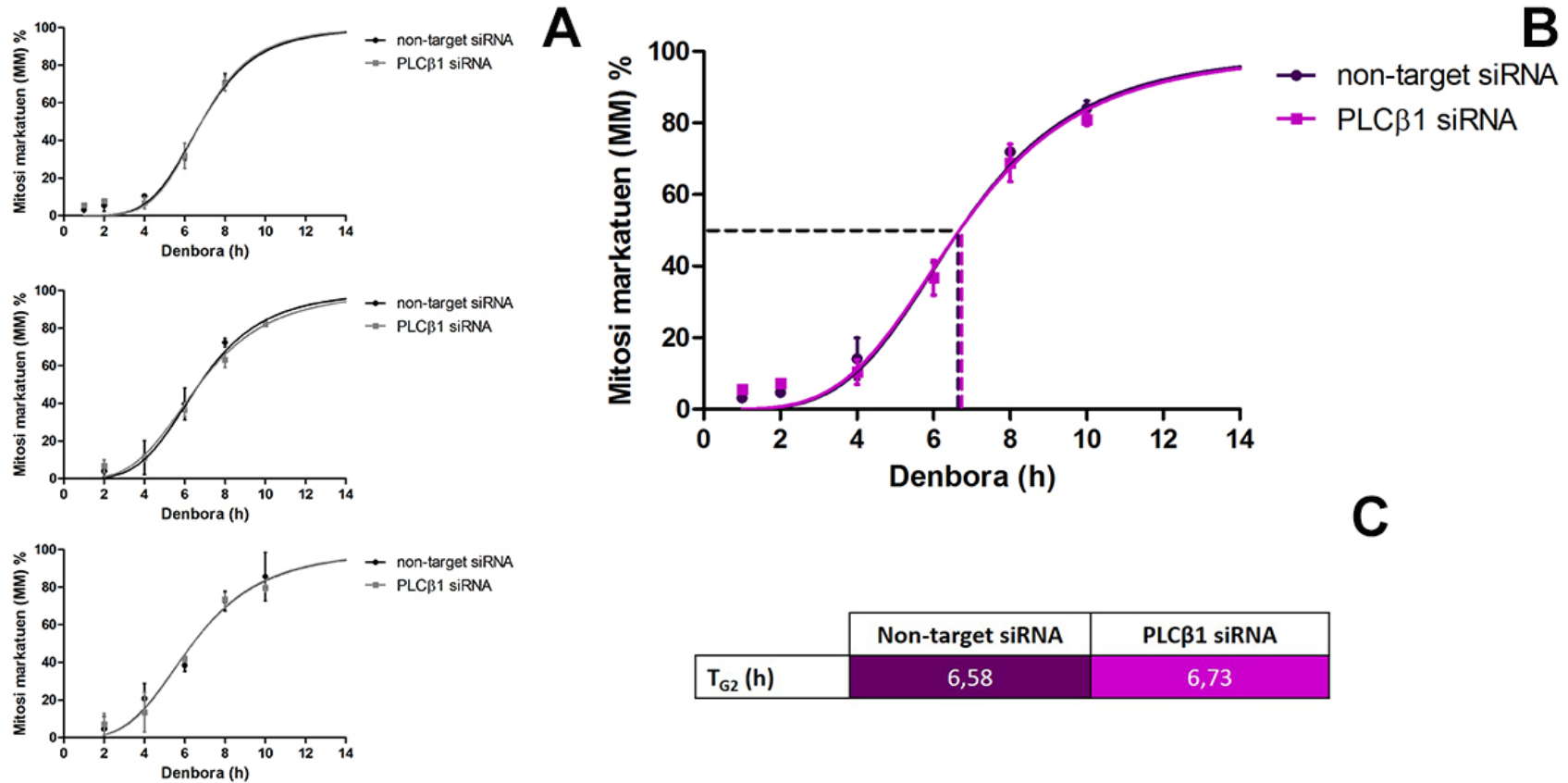
E.2.5. irudia: Non-targert siRNA edo PLCβ1 siRNA-rekin transfektatutako NT2 zelulen Indize Mitotikoaren adierazpen grafikoa, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Anlisi estatistikorako datu binakatuentzako T test-a erabili zen.

2.1.2.3. PH3-ren markaketaren azterketatik lortutako kurben analisia

G2 fasearen iraupena estimatzeko zelulak BrdU-rekin inkubatu ziren lehenik denbora ordu batez eta ondoren BrdU barneratu zuten nukleoan PH3 espresatzen zutenen ratioa kalkulatu zen denbora puntu desberdinetan. Modu honetan, zelulek S fasean (BrdU barneratzea) M fasera (PH3 espresioa) iristeko behar zuten denbora estimatu ahal izan genuen.

BrdU markaketaren azterketaren entseguetan bezala, hemen ere hiru esperimentu independente egin ziren. Irudian, esperimentu bakoitzean lortutako kurbak eta puntuen batezbestekotik kalkulaturako kurbak erakusten dira. Hiru errepikapenetan lortutako puntuak zein haien arteko batez bestekoaren puntuak oso ondo doitzen ziren planteaturako sigmoidearen ekuaziora. Esperimentuen kurba bakoitzaren analitiko MM50 parametroa kalkulatu zen, G2 fasearen iraupenaren baliokidetzat hartzen dena (ikus metodoen 4.2 atala).

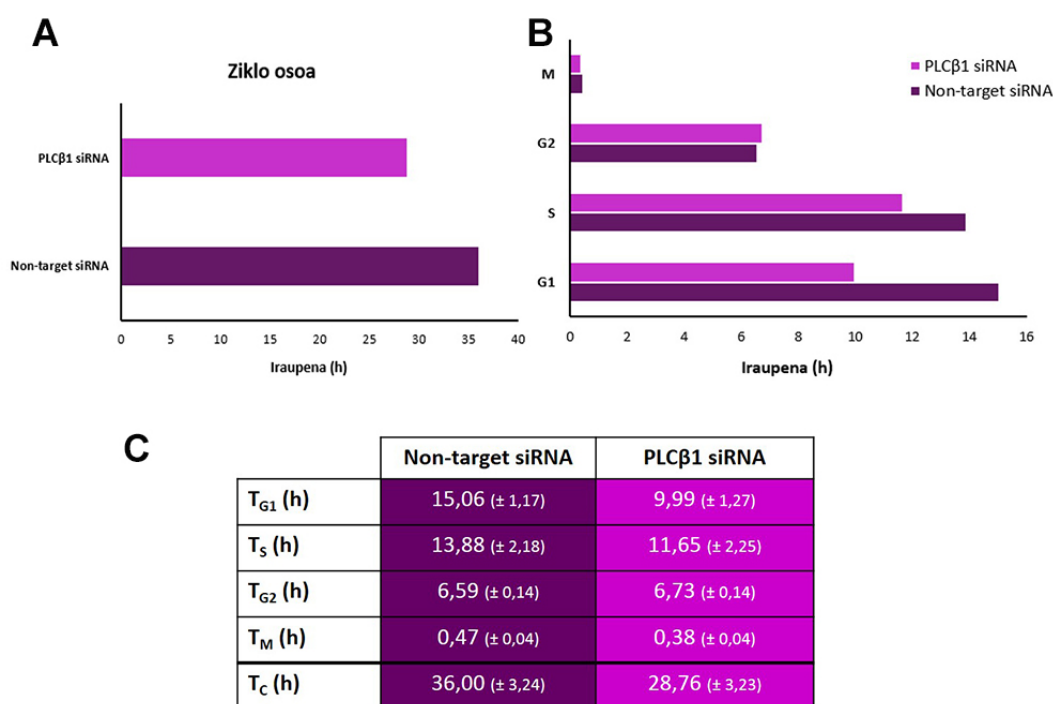
E.2.6 irudian ikus daitekeen moduan, ez zegoen alderik non-target siRNA eta PLCβ1 siRNA kurben artean egindako hiru esperimentuetan. Ondorioz, bi taldeen G₂ fasearen iraupenaren balioak ere berdinak ziren.



E.2.6. irudia. **A:** non-target siRNA edo PLCβ1 siRNA-rekin transfektatutako NT2 zelulen PH3 markaketaren analisisiko hiru entsegetako Mitosi Markatuen adierazpen grafikoak. Denbora puntu bakoitzeko MM puntuak eta puntuak osatzen duten sigmoide kurbak adierazten dira grafiko bakoitzean. **B:** Hiru errepikapenen batezbesteko grafikoa. MM50 parametroaren kalkulua irudikapena **C:** non-target siRNA edo PLCβ1 siRNA-rekin transfektatutako NT2 zelulen ziklo G2 fasearen iraupena, MM50 parametroaren baliokidea dena.

2.1.3. PLC β 1-aren isilpenaren eragina NT2 zelulen ziklo zelularren zinetikan: T_{G1}, T_S, T_{G2}, T_M eta T_C parametroen bateratzea.

BrdU metaketaren eta PH3 markaketaren entseguetatik lortutako emaitzek PLC β 1-en espresioa blokeatzean zikloa bizkortzen zela erakusten zuten. Izan ere, PLC β 1 siRNA-rekin transfektatutako zelulek non-target siRNA-rekin transfektatutakoek baino 7,24 ordu gutxiago behar dute zikloa osoa burutzeko. Iraupenaren laburtzea nagusiki G1 fasean gertatzen zen, PLC β 1 espresio gutxituta zuten NT2 zelulek, espresio maila normala zutenek baino 5,07 ordu gutxiago behar baitzuten S faseara igarotzeko. S fasearen iraupena ere laburragoa zen PLC β 1 siRNA-rekin transfektatutako zeluletan, 2,23 ordu laburragoa hain zuten. Bestalde, ez zegoen desberdintasunik G2 eta M faseetako iraupenen artean



E.2.7. irudia. **A:** non-target siRNA edo PLC β 1 siRNA-rekin transfektatutako NT2 zelulen ziklo osoaren iraupena adierazten duen grafikoa. **B:** non-target siRNA edo PLC β 1 siRNA-rekin transfektatutako NT2 zelulen zikloko fase bakoitzaren iraupena adierazten duen grafikoa. **C:** aurreko bi grafikotan dauden ziklo zelularren parametroen balioen taula, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3).

Emaitzek argi erakusten dute PLC β 1-aren espresioa blokeatzean zikloaren abiadura handitzen dela, hau da, proliferazioa bultzatzen dela. Gainera, zikloaren

azkartzea G1 fasean gertatzen dela nagusiki. Atal honen sarreran aipatutako ikerketek azaltzen duten moduan G1 fasearen eta zikloaren iraupen laburra desberdintze maila txikiagoarekin erlazionatuta dago. Ondorioz, PLC β 1 maila basalean espresatzen denean kontrakoa eragin dezakela pentsa daiteke, hau da, zikloaren erritmo mantsoagoa mantentzearen arduradun izan daiteke eta honek, besteak beste, desberdintze prozesua ahalbidetu lezake estimulu neurogeniko desberdinen presentzian.

2.2. PLC β 1a ETA PLC β 1b-AREN GAINESPRESIOAREN ERAGINA NT2 ZELULEN ZIKLO ZELULARRAREN ZINETIKAN.

PLC β 1-aren gene isilpenak NT2 zelulen zikloa laburtzen zuela ikusi ondoren, PLC β 1a edo PLC β 1b-aren gainespresioak kontrakoa eragiten zuen jakin nahi izan genuen.

2.2.1. Proliferazio gaitasunaren azterketa

PLC β 1a/b-ren gainespresioak NT2-en zikloan eragiten zuen edo ez ikertzeko, pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b plasmidoekin transfektatutako NT2 zelulen proliferazio gaitasuna aztertu zen, Ki67 markaketaren eta BrdU barneratzearen entseguen bitartez.

2.2.1.1. Ki67

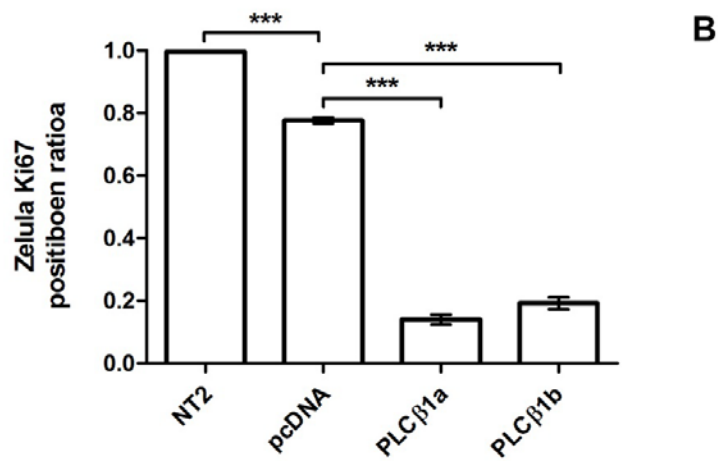
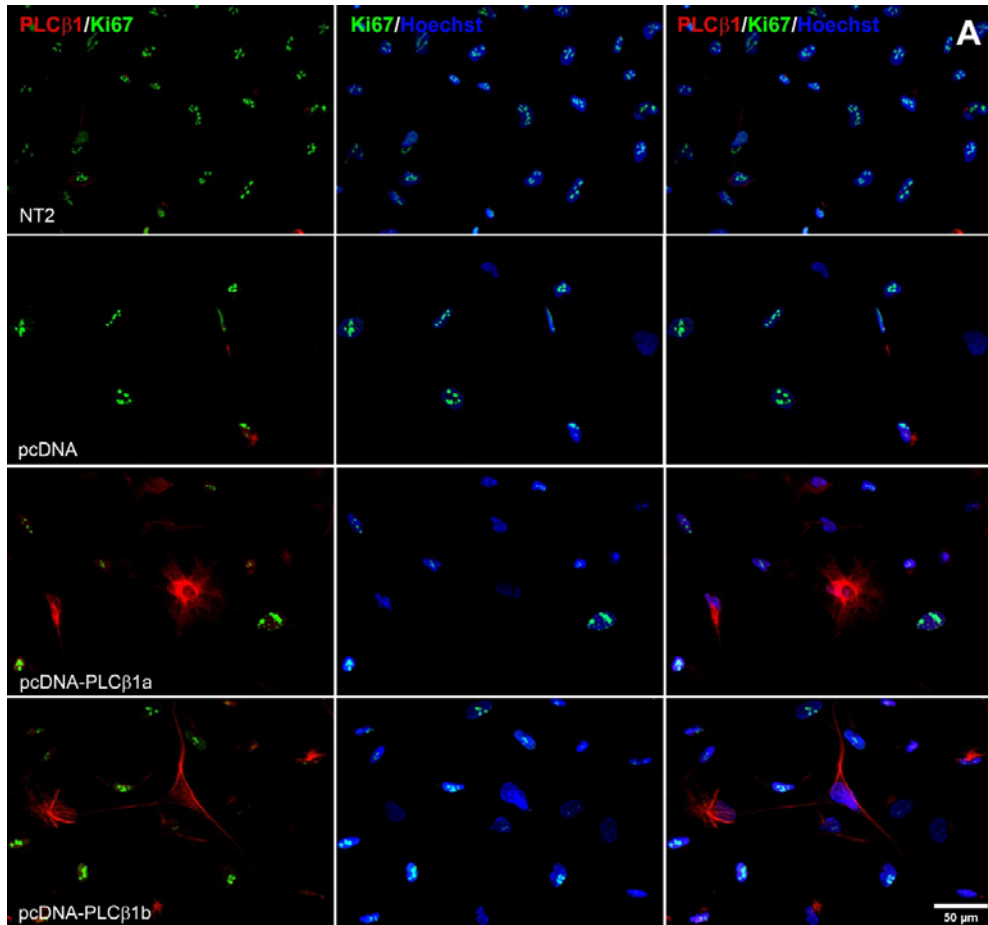
Ki67 proliferazio zelularraren markatzaile bezala erabiltzen da. Zelulak bikoizteko gaitasuna duen bitartean espresatzen da nukleoan, ziklo zelularraren fase guztietan. Desberdintze prozesuaren amaieran, ordea, zelulek bikoizteko gaitasuna galdu, zikloa utzi eta G0 deritzon fasean sartzen direnean, Ki67-ren espresio maila jaisten hasten da pixkanaka, ordu batzuen buruan guztiz desagertzen den arte (216).

Kasu honetan, PLC β 1a edo PLC β 1b-aren gainespresioa eragin ondoren NT2 zelulek zikloan jarraitzen zuten edo ziklotik irteten ziren jakiteko aztertu zen Ki67-ren espresioa. PLC β 1a/b-ren gainespresiorako, NT2 zelulak pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b konstrukzioekin transfektatu eta 72 orduz mantendu ziren. Ondoren, immunofluoreszentzia entseguak egin ziren Ki67 eta PLC β 1-aren aurkako antigorputzekin.

Lortutako emaitzen arabera, aipatu beharra dago NT2 aitzindari ia guztiak ($0,996 \pm 0,001$) Ki67 markaketa bazuten ere, pcDNA-rekin (plasmido hutsa, transfekzio kontrol moduan erabili zena) transfektatutako zelulen Ki67 positiboen ratioa baxuagoa zela ($0,777 \pm 0,010$). Honek, transfekzio prozedurak berak zelula batzuen proliferazio gaitasunean eragiten zuela erakusten du.

PLC β 1-aren bi aldaeren gainespresioaren eraginari dagokionez, pcDNA-PLC β 1a zein pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutako zelulen Ki67 positiboen ratioa oso baxua zen, plasmido hutsarekin transfektatutako zelulekin alderatuz (pcDNA: $0,77 \pm 0,01$ vs pcDNA-PLC β 1a: $0,14 \pm 0,02$ eta pcDNA-PLC β 1b: $0,19 \pm 0,02$). PLC β 1-aren bi aldaeren transfekzioak berdinean eragiten zuen Ki67-aren markaketaren galeran, zelula Ki67 positiboen ratioa antzekoa baitzen bi baldintzetan (E.2.8. irudia).

Honenbestez, PLC β 1a eta PLC β 1b-aren gainespresioaren ondorioz, NT2 aitzindariak ziklo zelularretik irten eta egoera postmitotikoa hartzen dutela adierazi dezakegu.



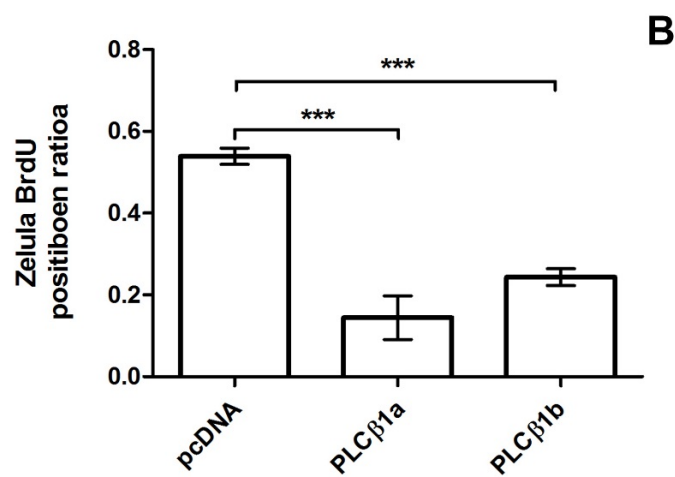
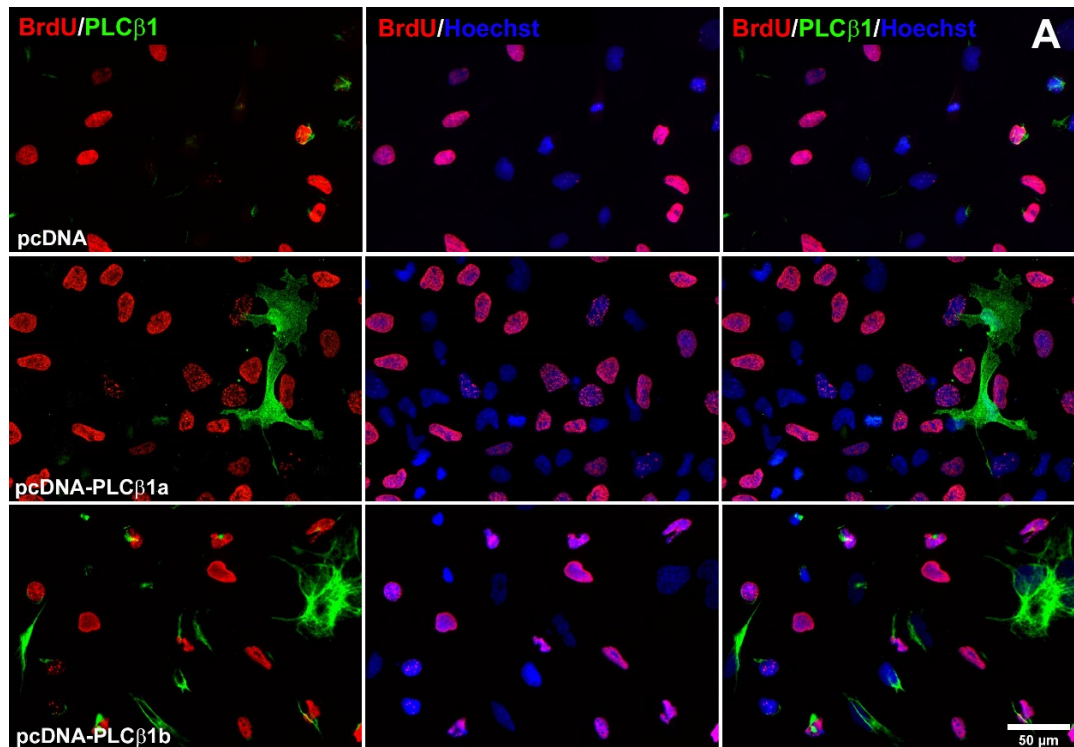
E.2.8. irudia. A: NT2 tratatu gabeak eta pcDNA, pcDNA-PLCβ1a edo pcDNA-PLCβ1b-arekin transfektatutako NT2 zelulen imunofluoreszentzia entsegu bikoitza. Markaketa gorria PLCβ1-ren (D8) aurkako antigorputzari dagokio, berdea Ki67-ren aurkako antigorputzari eta urdina Hoechst nukleoaren tindatzaileari. Eskala barra = 50 μm. B: NT2 tratatu gabeen eta pcDNA, pcDNA-PLCβ1a edo pcDNA-PLCβ1b-arekin transfektatutako NT2-en Ki67 positiboaren ratioa adierazten duen grafikoa, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Datu guztiak faktore bakarreko ANOVA-rekin analizatu ziren, eta talde desberdinen arteko konparaketa Tukey-en konparazio anitzeko testarekin egin zen.

2.2.1.2. BrdU

Zelulen proliferazio gaitasuna aztertzeko beste hurrenkeretako bat zelulek denbora mugatu batean BrdU barneratzeko duten gaitasuna aztertzea da. Horrela, denbora tarte jakin batean S fasetik pasa den zelulen ehunekoa zein den ezagutu dezakegu. Horretarako, BrdU 10 μ M-en 2 orduko inkubazio laburra burutu zen, zelulak pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatu eta 72h igaro ondoren.

E.2.9 irudian adierazten den bezala, pcDNA-PLC β 1a zein pcDNA-PLC β 1b-ekin transfektatutako zelulen BrdU positiboen ratioa pcDNA hutsarekin transfektatutako zelulena baino nabarmenki baxuagoa zen (pcDNA: $0,54 \pm 0,02$ vs pcDNA-PLC β 1a: $0,14 \pm 0,05$ eta pcDNA-PLC β 1b: $0,24 \pm 0,02$). Emaidza hauek bat datoz aurreko atalean deskribatutakoarekin. Izan ere, PLC β 1a edo PLC β 1b gainespresatzean S fasetik igarotzen den zelula ratioa horren baxua izateak NT2 aitzindarien zikloa asko luzatu dela edo gehiengoa ziklotik irten dela adierazten du.

Aurkeztutako bi entseguetan deskribatu den bezala, PLC β 1a/b-ren gainespresio soilak egoera postmitotikora bideratzen zuen NT2 zelulen gehiengoa, beste inolako tratamendurik gabe. Horrek, PLC β 1a-k eta PLC β 1b-ak NT2-en ziklo zelularreko irteeraren erregulazioan parte hartzen dutela adierazten digu.



E.2.9. irudia. A: pcDNA, pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutako NT2 zelulen imunofluoreszentzia entsegu bikoitza. Markaketa berdea PLC β 1-ren (D8) aurkako antigorputzari dagokio, gorria BrdU-ren aurkako antigorputzari eta urdina Hoechst nukleoen tindatzaileari. Eskala barra = 50 μ m. B: pcDNA, pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutako NT2-en BrdU positiboen ratioa adierazten duen grafikoa, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Datu guztiak faktore bakarreko ANOVA-rekin analizatu ziren, eta talde desberdinen arteko konparaketa Tukey-en konparazio anitzeko testarekin burutu zen.

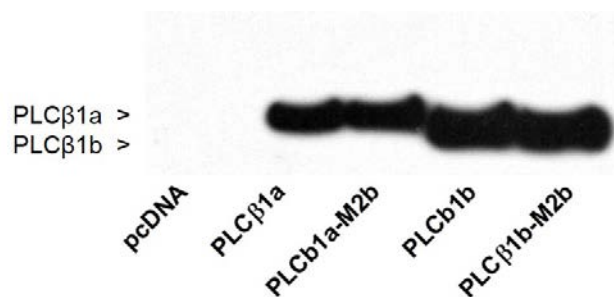
2.3. PLCB1A/B-ren KOKAPEN NUKLEARREKO MUTANTEEN GAINESPRESIOAREN ERAGINA NT2 ZELULEN ZIKLOAREN ZINETIKAN.

PLC β 1a edo PLC β 1b-aren gainespresioa eragitean NT2 zelulen gehiengoak bikoizteko gaitasuna galtzen duela frogatu dugu aurreko atalean. Hemen, bikoizte gaitasunaren galera horren erantzulea nukleoko PLC β 1a/b den ala ez argitu nahi izan genuen.

2.3.1. PLC β 1-M2b konstruktuen balioztatzea

pcDNA-PLC β 1a-M2b eta pcDNA-PLC β 1b-M2b konstruktioak gure laborategian sortu genituen pcDNA-PLC β 1a eta pcDNA-PLC β 1b plasmidoetatik abiatuta, metodoen atalean azaltzen den moduan. Lortutako konstruktioen sekuentzia egokia zela frogatu ondoren, hauen balioztatze esperimenduak egin ziren NT2 zeluletan. Hau da, behar bezala transfektatu eta PLC β 1a/b-ren gainespresioa eragiten zutela baina nukleora sartzen ez zirela frogatu genuen.

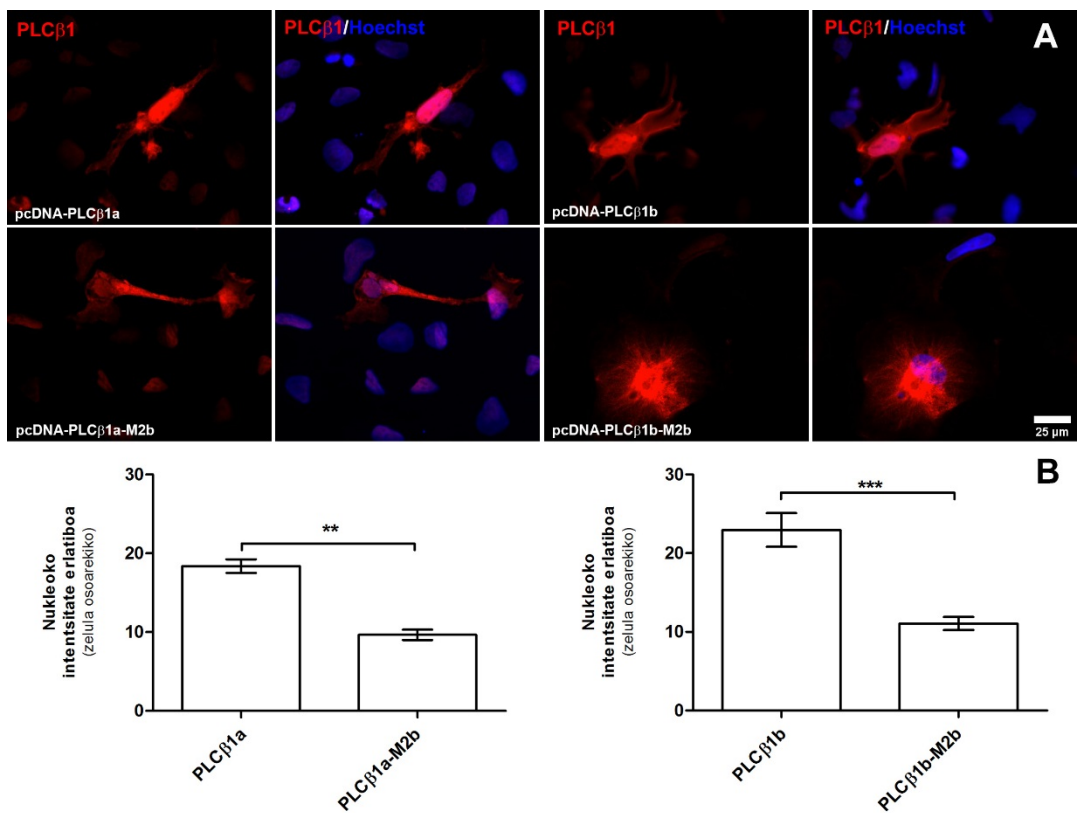
Horretarako, pcDNA-PLC β 1a-M2b edo pcDNA-PLC β 1b-M2b-arekin transfektatutako NT2 homogenatuen PLC β 1a/b-aren espresio maila aztertu zen Western Blot bidez. E.2.10. irudian ikusten den bezala, pcDNA-PLC β 1a-M2b eta pcDNA-PLC β 1b-M2b-rekin transfektatutako NT2-en PLC β 1a/b espresio maila, pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutako NT2-en berdina zen, hurrenez hurren.



E.2.10. irudia. pcDNA, pcDNA-PLC β 1a, pcDNA-PLC β 1a-M2b, pcDNA-PLC β 1b edo pcDNA-PLC β 1b-M2b-arekin transfektatutako NT2 zelulen homogenatu osoaren PLC β 1-aren espresio mailen WB bidezko analisisa. Baldintza bakoitzeko proteina kantitate berdina kargatu zen (10 μ g).

Bestalde, PLC β 1a/b-M2b proteina nukleoa espresatzen ez zela frogatzeko, immunofluoreszentzia entsegua egin zen PLC β 1-aren aurkako antigorputzarekin

eta transfektatutako zelulen nukleoko intentsitate erlatiboa kalkulatu zen, gorputz osoko eta nukleoko intentsitateen neurketen balioekin. Hala, PLC β 1a-M2b eta PLC β 1b-M2b-ren nukleoko intentsitate erlatiboa ($9,66 \pm 0,66$ eta $11,06 \pm 1,41$) PLC β 1a eta PLC β 1b-ren intentsitatea ($18,38 \pm 0,86$ eta $22,95 \pm 2,90$) baino txikiagoa zen, hurrenez hurren. Beraz, PLC β 1a/b-M2b mutanteak natiboen adinako gainespresioa eragiten zutenez baina espresio maila hori nukleoan ez den beste konpartimentu zelularretan mantentzen zenez, baliozkotzat hartu genituen eratutako konstrukzioak.



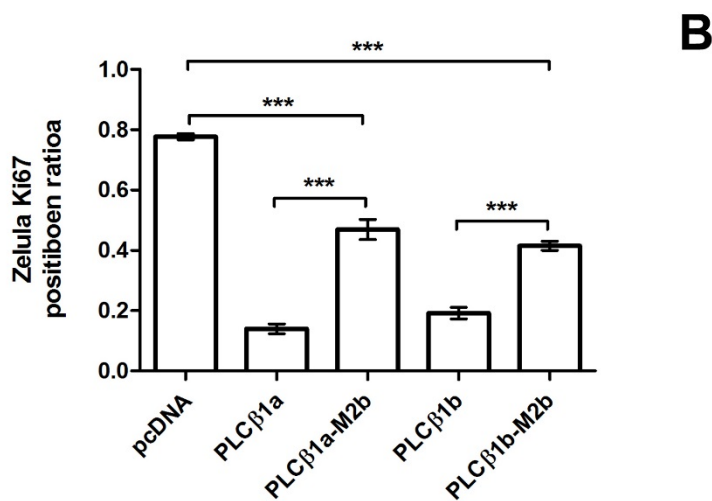
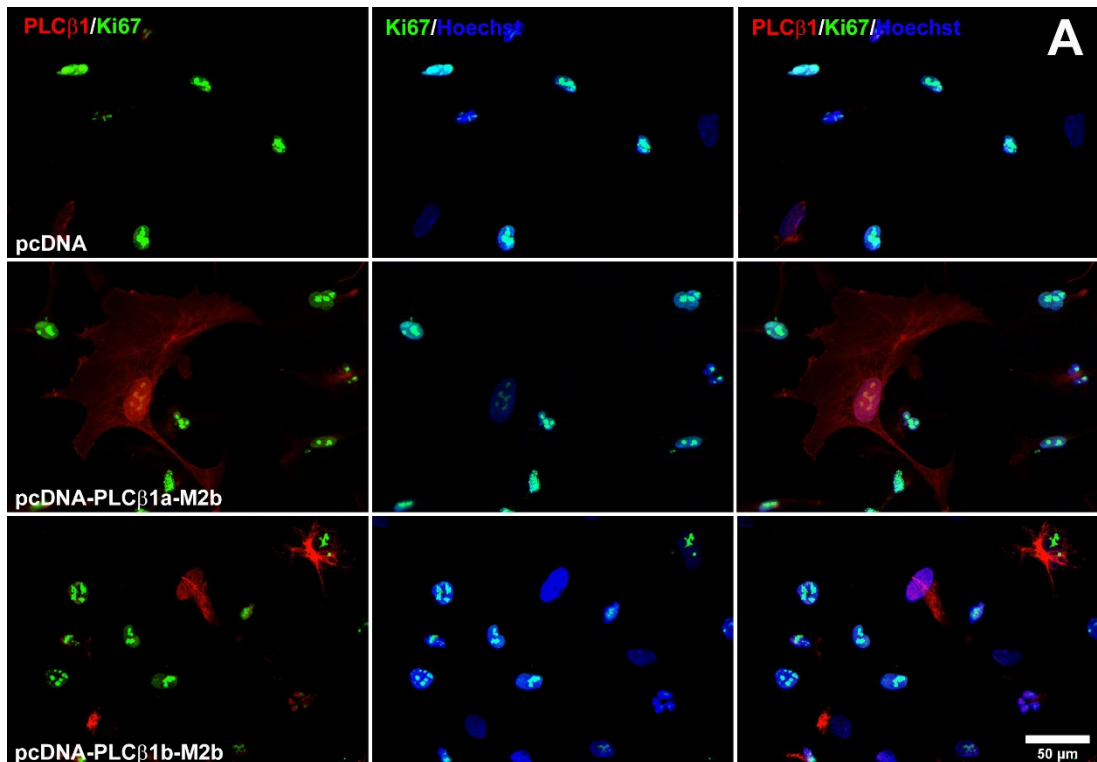
E.2.11. irudia. A: pcDNA, pcDNA-PLC β 1a-M2b edo pcDNA-PLC β 1b-M2b-arekin transfektatutako NT2 zelulen imunofluoreszentzia entsegua. Markaketa gorria PLC β 1-ren (D8) aurkako antigorputzari dagokio eta urdina Hoechst nukleoaren tindatzaileari. Eskala barra = 25 μ m. B: pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1a-M2b-arekin eta pcDNA-PLC β 1b edo pcDNA-PLC β 1b-M2b-arekin transfektatutako NT2-en nukleoko PLC β 1-aren intentsitate erlatiboa adierazten duten grafikoak, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Analisi estatistikorako binakatu gabeko datuen T test-a erabili zen.

2.3.2. Proliferazio gaitasunaren azterketa PLC β 1a/b-aren kokapen nuklearreko mutanteak gainespresatzen duten NT2 zeluletan

pcDNA-PLC β 1a-M2b eta pcDNA-PLC β 1b-M2b plasmidoek beren funtzioa betetzen zutela, hau da, PLC β 1a/b-aren nukleorako sarrera galarazten zutela ziurtatuta, haiekin transfektatutako NT2 zelulen proliferazio gaitasuna aztertu zen, aurreko atalean bezala. Gainera, PLC β 1a edo PLC β 1b-aren gainespresioak eta PLC β 1a-M2b edo PLC β 1b-M2b-aren gainespresioak NT2-en bikoizte gaitasunean zituen ondorioen arteko konparaketa egin zen.

2.3.2.1. Ki67

Aurreko atalean bezala, PLC β 1a edo PLC β 1b-ren lokalilazio nuklearreko mutanteekin transfektatutako NT2 zelulen bikoizteko gaitasuna ikertu zen Ki67-ren espresioaren eta BrdU-ren barneratze gaitasunaren azterketen bitartez. Kasu honetan ere, pcDNA-PLC β 1a-M2b edo pcDNA-PLC β 1b-M2b-arekin transfektatutako NT2-en Ki67 positiboen ratioa pcDNA-rekin transfektatutako zelulena baino txikiagoa bazen ere, pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b-arekin alderatuz gero, Ki67 positiboen ratioa nabarmenki handiagoa zen (pcDNA: $0,77 \pm 0,01$; pcDNA-PLC β 1a: $0,14 \pm 0,02$; pcDNA-PLC β 1a-M2b: $0,47 \pm 0,03$; pcDNA-PLC β 1b $0,19 \pm 0,02$; pcDNA-PLC β 1b-M2b: $0,42 \pm 0,01$). Beraz, esperimentu hauen arabera, PLC β 1a edo PLC β 1b nukleoan sartzen ez direnean, egoera postmitotikorako bilakaera ez da maila berean gertatzen.

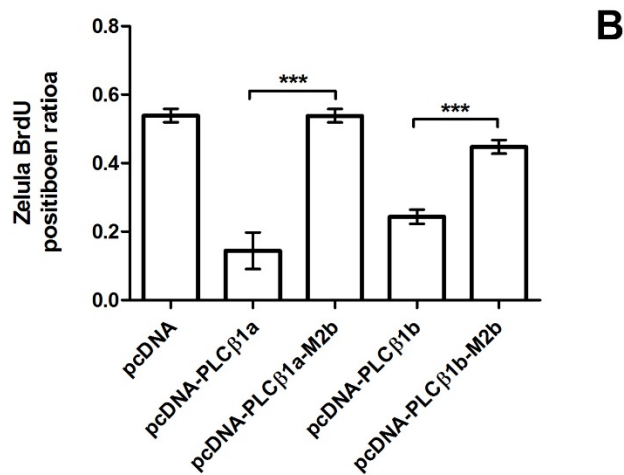
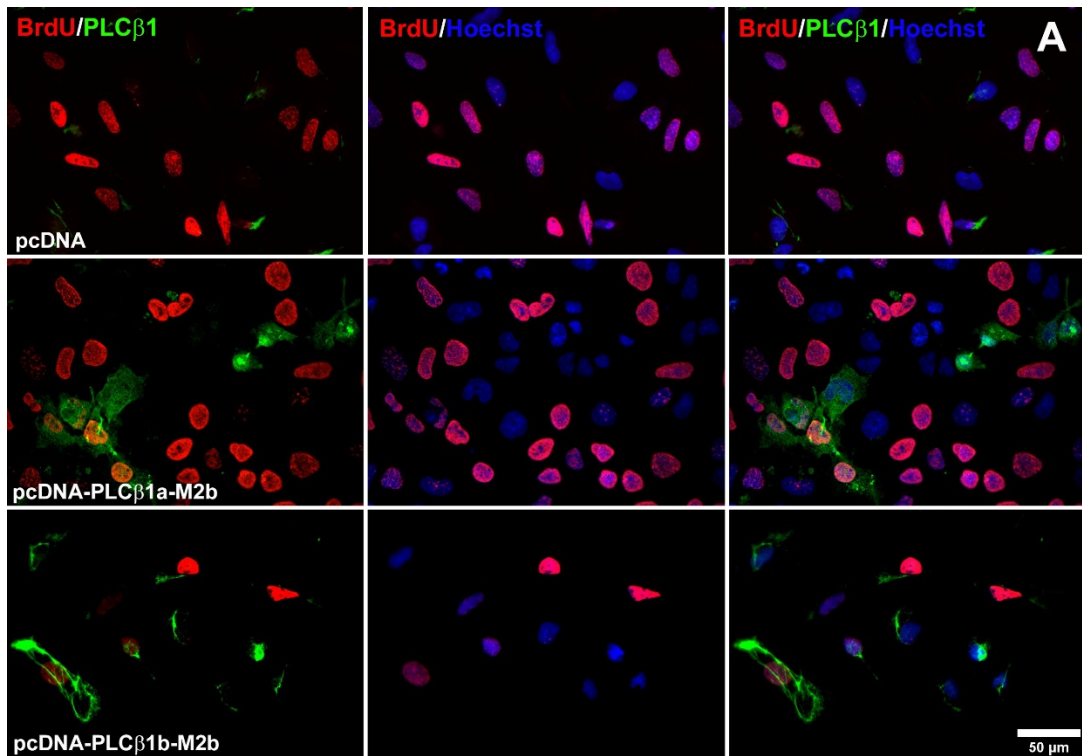


2.12. irudia. A: pcDNA, pcDNA-PLC β 1a-M2b edo pcDNA-PLC β 1b-M2b-arekin transfektatutako NT2 zelulen imunofluoreszentzia entsegu bikoitza. Markaketa berdea PLC β 1-ren (D8) aurkako antigorputzari dagokio, gorria BrdU-ren aurkako antigorputzari eta urdina Hoechst nukleoen tindatzaileari. Eskala barra = 50 μ m. **B:** pcDNA, pcDNA-PLC β 1a, pcDNA-PLC β 1b, pcDNA-PLC β 1a-M2b edo pcDNA-PLC β 1b-M2b-arekin transfektatutako NT2-en BrdU positiboen ratioa adierazten duen grafikoa, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Datu guztiak faktore bakarreko ANOVA-rekin analizatu ziren, eta talde desberdinen arteko konparaketa Tukey-en konparazio anitzeko testarekin burutu zen.

2.3.2.2. BrdU

Kasu honetan ere, Ki67-ren espresioa aztertu ondoren BrdU-ren barneratze entsegua egin zen PLC β 1a-M2b edo PLC β 1b-M2b gainespresatzen zuten NT2 zeluletan. Hala, pcDNA-PLC β 1a-M2b edo pcDNA-PLC β 1a-M2b-arekin transfektatutako NT2-en artean, BrdU barneratzen zutenen ratioa pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutakoena baino askoz ere handiagoa zen, pcDNA plasmido hutsarekin transfektatutako zelulen mailara iristen baitziren ia (pcDNA: $0,54 \pm 0,02$; pcDNA-PLC β 1a: $0,14 \pm 0,05$; pcDNA-PLC β 1a-M2b: $0,54 \pm 0,02$; pcDNA-PLC β 1b $0,24 \pm 0,02$; pcDNA-PLC β 1b-M2b: $0,45 \pm 0,01$). Hau da, entsegu honen emaitzen arabera, PLC β 1a/b-aren nukleorako sarrera galarazita zuten NT2 zelulek S fasean sartu eta DNA-ren bikoizketa egiten jarraitzen zuten, egoera basalean gertatzen den bezala.

Azaldutako emaitzen arabera PLC β 1-aren espresio igoerak NT2 zelulen ziklo irteera eragiten du, eta gainera honetarako bere kokapen nuklearra beharrezkoa dela ondorioztatu genezake



2.13. irudia. A: pcDNA-PLCβ1a-M2b edo pcDNA-PLCβ1b-M2b-arekin transfektatutako NT2 zelulen imunofluoreszentzia entsegu bikoitza. Markaketa berdea PLCβ1-ren (D8) aurkako antigorputzari dagokio, gorria BrdU-ren aurkako antigorputzari eta urdina Hoechst nukleoentzako tindatzaileari. Eskala barra = 50 μm. B: pcDNA, pcDNA-PLCβ1a, pcDNA-PLCβ1b, pcDNA-PLCβ1a-M2b edo pcDNA-PLCβ1b-M2b-arekin transfektatutako NT2-en BrdU positiboen ratioa adierazten duen grafikoa, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Datu guztiak faktore bakarreko ANOVA-rekin analizatu ziren, eta talde desberdinen arteko konparaketa Tukey-en konparazio anitzeko testarekin burutu zen.

3. PLCB1-AREN PAPERA NT2-EN DESBERDINTZE PROZESUAN

Aurreko kapituluan, PLC β 1a/b-k NT2-en ziklo zelularren zinetika modulatzeko duela frogatu dugu. Alde batetik, PLC β 1-aren espresioa isiltzen denean NT2-en ziklo zelularra eta batez ere, G1 fasea laburragoak dira. PLC β 1a edo PLC β 1b-ren gainespresioa eragitean, kontrara, NT2-ak ziklotik irten eta zelula postmitotiko bilakatzen dira. Gaur egun, badakigu ziklo zelularren iraupena eta zelulen desberdintze maila erlazionatuta daudela. Enbrioaren garapenean sortzen diren aitzindarietan esaterako, ziklo zelular eta G1 fasearen iraupen laburra aitzindarien desberdintze maila baxuarekin eta proliferazio gaitasun handiarekin erlazionatuta dago. Desberdintze maila handiko aitzindariak, ordea, ziklo zelular eta G1 fase luzeagoak dituzte (217,218).

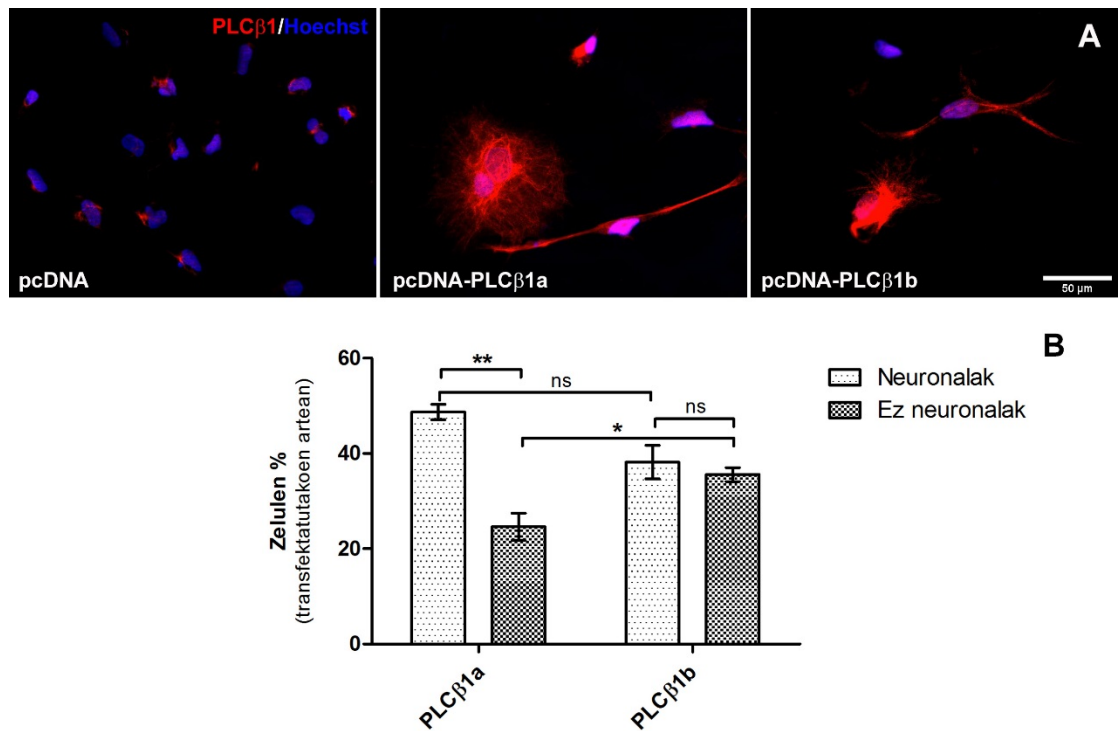
Bestalde, zelulen proliferazioa eta desberdintzea elkarren artean erlazionatuta dauden kontrako bi egoera dira. Hainbat minbizi zelulen proliferazioa inhibitzean, CDK inhibitzaileen gainespresioaren bitartez, hauek desberdindu egiten direla deskribatu da, adibidez (219,220). Ildo beretik, PLC β 1 gainespresatzea nahikoa dela deskribatu da desberdintze prozesua indultzeko C2C12 mioblastoetan eta 3T3-L1 fibroblastoetan (107,181).

3.1. PLCB1A ETA PLCB1B-AREN GAINESPRESIOAREN ERAGINA NT2 ZELULEN MORFOLOGIA ETA MARKATZAILE NEURONALEN ESPRESIOAN

PLC β 1-aren espresioaren gainespresioak NT2 zelulen proliferazioa inhibitu eta zelulen egoera postmitotikoa sustatzen duela frogatu ondoren, hau zelulen desberdintze prozesuarekin erlazionatzen den aztertu nahi izan genuen. Horretarako, PLC β 1a/b gainespresatzen zuten NT2 zeluletan, zer nolako aldaketa morfologikoak gertatzen ziren eta markatzaile neuronalen espresioa nolako zen aztertu genuen.

3.1.1. PLC β 1a edo PLC β 1b gainespresatutako NT2 zelulek pairatzen dituzten aldaketen analisi morfologikoa.

PLC β 1a edo PLC β 1b-aren gainespresioak aldaketa morfologiko nabariak eragiten zituen NT2 zeluletan. Izan ere, pcDNA-PLC β 1a eta pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutako NT2-ek morfologia guztiz desberdina zuten, transfektatu gabeko edota pcDNA kontrol negatiboarekin transfektatutako NT2-ekin alderatuz. Bai PLC β 1a eta baita PLC β 1b-aren kasuan, bi profil morfologiko desberdin bultzatzen ziren. Alde batetik, gorputz txikia eta luzakinak zituzten zelulak (morfologia neuronalak) zeuden eta bestetik, gorputz zabal eta biribildua zutenak, luzakin gabeak (ez-neuronalak). Gorputz txiki eta luzakindun zelulek, AraC-NT2N eredu neuronalaren morfologia partekatzen zuten (190).



E.3.1 irudia: **A:** pcDNA, pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutako NT2 zelulen imunofluoreszentzia entsegua. Markaketa gorria PLC β 1-ren (D8) aurkako antigorputzari dagokio eta urdina Hoechst nukleoentzainari. Eskala barra = 50 μ m. **B:** pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutako NT2-en morfologiaren araberako bi fenotipoen (*neuronal* eta *ez-neuronal*) populazioaren banaketa adierazten duen grafikoak, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Análisi estatistikorako binakatu gabeko datuen T test-a erabili zen.

Fenotipo morfologiko hauen kuantifikazio emaitzen arabera, PLC β 1a gainespresatzen zuten zelulen artean, morfologia neuronalak zutenak gailentzen

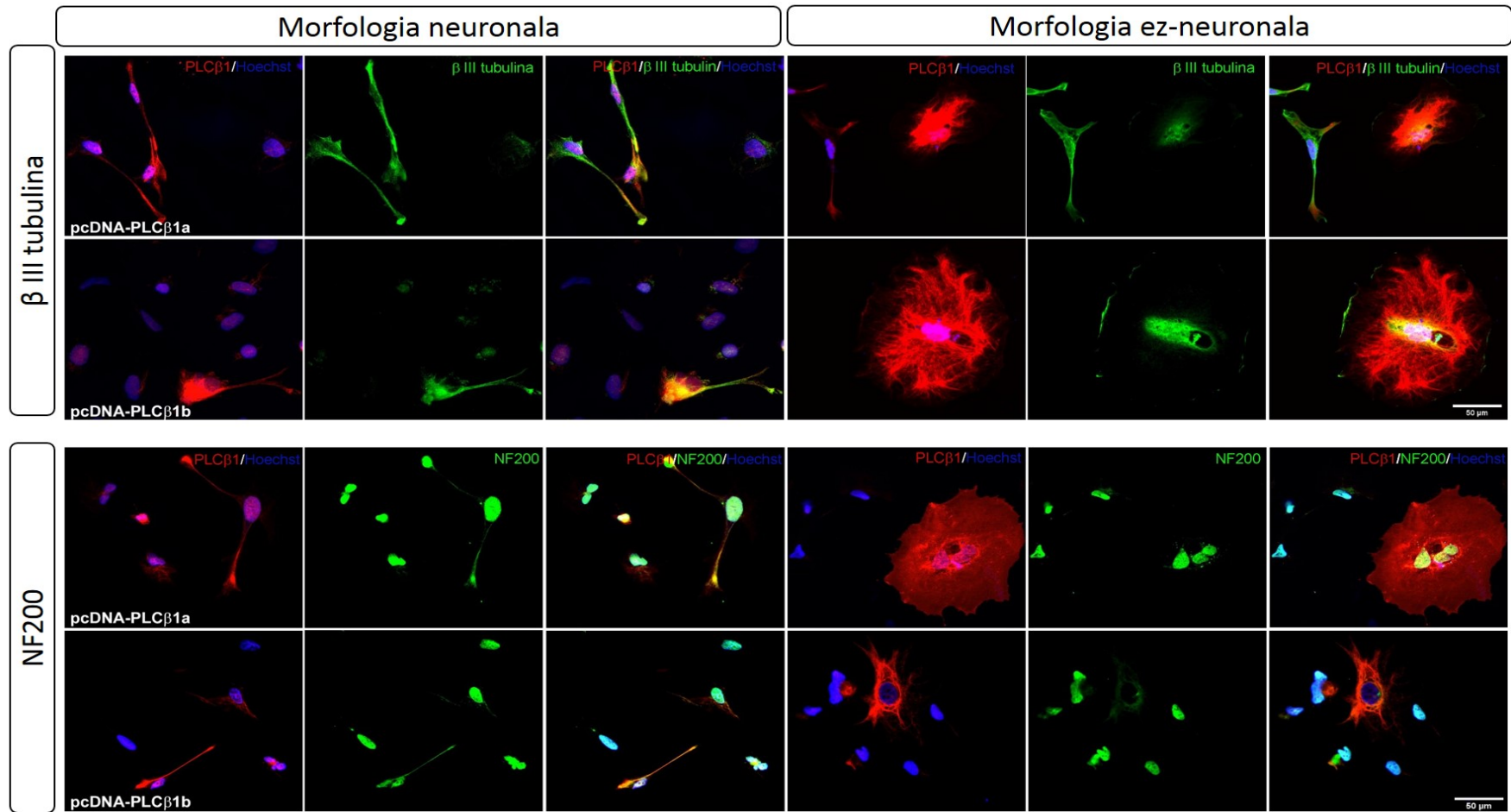
ziren morfologia ez-neuronala zutenen aurrean. Horrela, PLC β 1a gainespresatzen zuten zelulen % $48,68 \pm 1,63k$ eta % $24,61 \pm 2,86k$ morfologia neuronala eta ez-neuronala zuten, hurrenez hurren. Aitzitik, PLC β 1b gainespresatzen zuten zelulen artean ez zegoen aldaketa esanguratsurik (% $38,19 \pm 3,51$ vs % $35,58 \pm 1,44$).

3.1.2. PLC β 1a edo PLC β 1b gainespresatutako NT2 zelulen markatzaile neuronalen espresioaren analisia

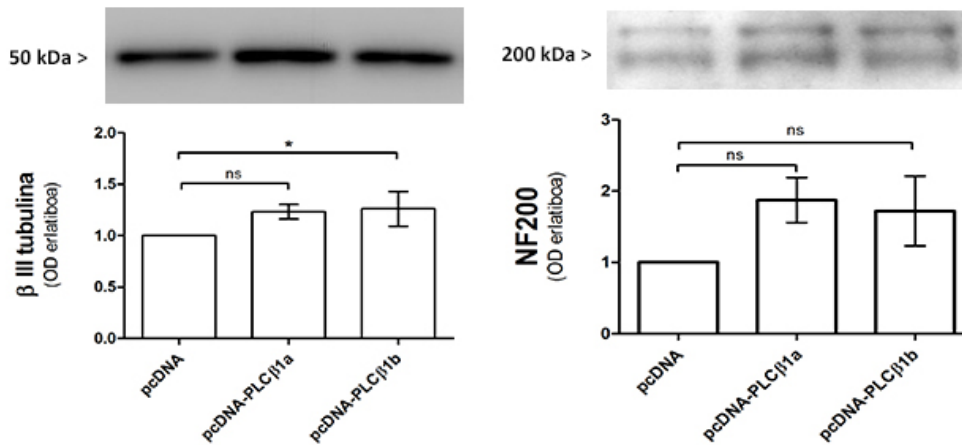
PLC β 1-aren gainespresioak, eta batez ere bere a aldaerak, NT2 zeluletan desberdintze neuronalarekin bateragarriak diren aldaketa morfologikoak eragiten zituela, zelula hauen markatzaile neuronalen espresio maila nolakoa zen ikertu genuen. Konkretuki, 200kDa-ko neurofilamentuaren (NF200) eta β III tubulina neuronan espezifikoa den zitoeskeletoko proteinaren mailak analizatu ziren, Western Blot eta immunofluoreszentzia entseguen bitartez.

Immunofluoreszentzia entseguen arabera, β III tubulinaren markaketa oso bizia zen bai PLC β 1a eta baita PLC β 1b gainespresatzen zuten morfologia neuronaleko zeluletan. Gainera, seinalearen kokapena, zelula gorputzean zein neuritetan, markaketa espezifikoarekin bat zetorren. Morfologia ez-neuronaleko zeluletan bestalde, markaketa lausoagoa zen eta kokapen ez-espezifikoa zuen, nukleoan eta bere inguruan. NF200-aren espresioari dagokionez, pcDNA-PLC β 1a zein pcDNA-PLC β 1b-rekin transfektatutako zelula neuronalen neuritetan zehar eta hauen amaieran markaketa bizia agertzen zen. Zelula ez-neuronalen kasuan, apenas bereiz zitezkeen NF200-aren seinalea hondo-zaratatik. Esan beharrekoa da mota guztietako zelulen nukleoak intentsitate handiz markatzen zirela, baina NF200 zitoeskeletoko proteina denez, markaketa hau ez-espezifikotzat jo zen, eta beraz ez zen kontuan izan.

Hortaz, gure immunofluoreszentziako emaitzen arabera, PLC β 1a zein PLC β 1b-aren gainespresioak NT2 zelula kulturaren morfologia neuronala edukitzeaz gain, markatzaile neuronalak espresatzen duten zelulen agerpena bultzatzen dute.



E.3.2. irudia. pcDNA-PLCβ1a edo pcDNA-PLCβ1b-arekin transfektatutako NT2 zelulen imunofluoreszentzia entsegu bikoitza; morfologia *neuronal* eta *ez-neuronal*a duten zelulak erakusten dira. Markaketa gorria PLCβ1-ren (D8) aurkako antigorputzari dagokio, berdea β III tubulinaren edo NF200-aren aurkako antigorputzari eta urdina Hoechst nukleoen tindatzaileari. Eskala barra = 50 μm.



E.3.3. irudia. pcDNA, pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutako NT2 zelulen homogenatu osoaren β III tubulina eta NF200-aren espreio mailen azterketa Wester Blot entseguen bitartez. Grafikoetan, antigorputz β III tubulinaren edo NF200-aren aurkako antigorputzarekin lortutako seinalearen dentsitate optikoa erlatiboak, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Análisi estatistikoa faktore bakarreko ANNOVA-rekin egin zen eta talde desderdinen arteko konparaketarako Tukey-en konparazio anitzeko testa erabili zen.

Western Bloteko emaitzei dagokionez, bi markatzaileen espresio mailen goranzko joera ematen zen pcDNA-PLC β 1a zein pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutako zeluletan. β III tubulinaren igoera nahiko txikia zen bi kasutan, batez ere pcDNA-PLC β 1a-rekin transfektatutako zeluletan. NF200-aren espresio mailen batezbestekoa nabarmen altuagoa izan arren pcDNA-PLC β 1a zein pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatutako zeluletan, esperimentu batetik bestera zegoen aldakortasuna dela eta, aldaketak ez ziren esanguratsuak izan.

Agerikoa da Western blot bidez lortutako markatzaile neuronalen espresioaren emaitzek ez dutela PLC β 1a eta PLC β 1b-aren gainespresioak NF200 eta β III tubulina mailen igoera eragiten dutela baieztatzeko bezalako indarririk. Kontuan hartu behar da, ordea, erabilitako transfekzio metodoekin lortzen zen transfekzioa tasa baxua zela eta hori izan daitekela baldintzen arteko desberdintasun txikiaren arrazoa. Izan ere, immunofluoreszentzia entseguen emaitzen arabera, morfologia neuronal zuten desberdintutako zelulek β III tubulina eta NF200-aren espresio maila altua zuten baina morfologia ez-neuronal zutenen espresioa oso baxua zen.

Hau guztia kontuan izanik, PLC β 1a eta PLC β 1b-aren gainespresioak, NT2-en ziklotik irtetzea ez ezik, zelula hauen desberdintze neuronalaren adierazle diren aldaketa morfologiko eta markatzaile neuronalen agerpena eragiten duela ondorioztatu genezake. Splicing aldaera bakoitzari erreparatuz, bi aldaerek fenotipo

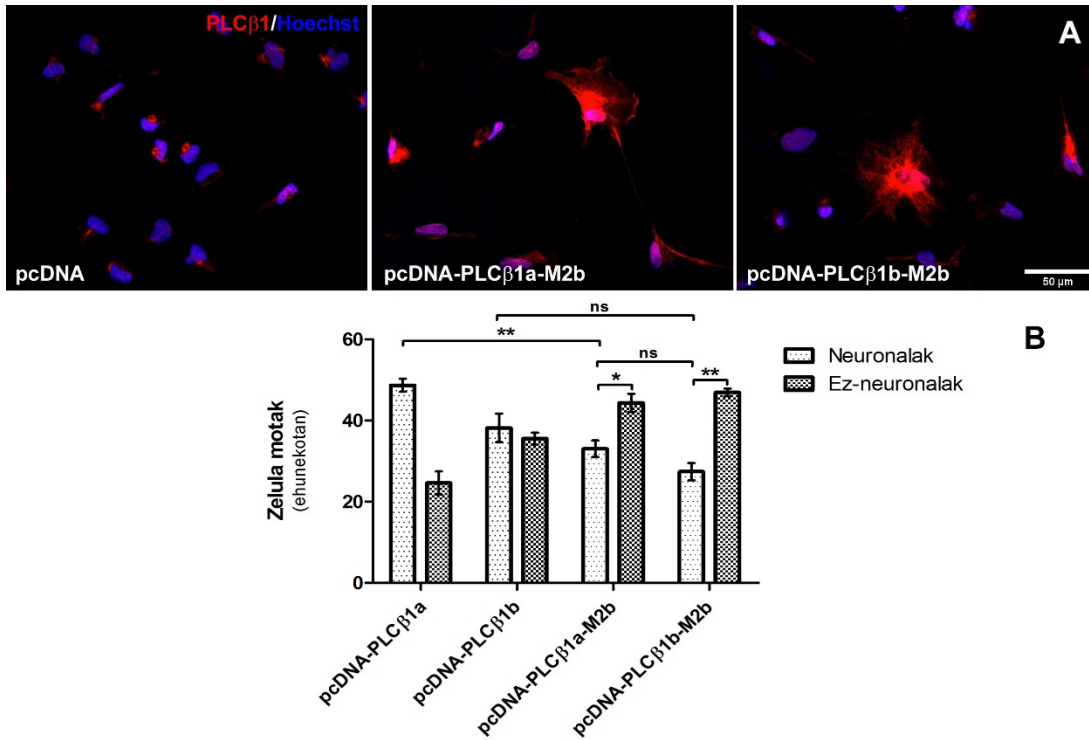
neuronalak sustatzen badute ere, fenotipo neuronaleko zelula gehiago zeuden PLC β 1a gainespresatzen duten zeluletan, PLC β 1b gainespresatzen dutenen artean baino.

3.2. PLCB1A ETA PLCB1B-AREN KOKAPEN NUKLEARREKO MUTANTEEN GAINESPRESIOAREN ERAGINA MARKATZAILE NEURONALEN ESPRESIOAN.

Aurreko atalean PLC β 1a/b-aren gainespresioak zelulen fenotipo neuronalak sustatzen zuela ikusi ondoren, eragin hau PLC β 1a/b-aren kokapen nuklearraren menpe zegoen aztertu nahi izan genuen. Horretarako, PLC β 1a-M2b eta PLC β 1b-M2b-a gainespresatu ziren NT2-etan eta lortzen ziren zelula neuronal eta ez-neuronalen kuantifikazioa burutu zen.

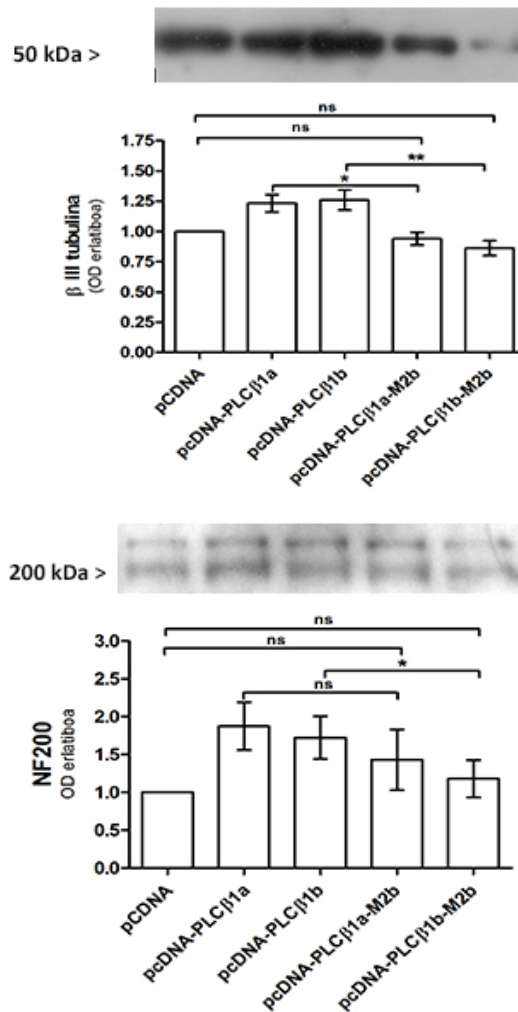
Zelula neuronal eta ez-neuronalen kuantifikazioa burutzeko, aurreko atalean bezala, zelulen morfologia eta β III tubulina eta NF200 markatzaile neuronalen espresioa kontuan hartu ziren.

Zenbaketaren emaitzei dagokienez, PLC β 1a edo PLC β 1b-aren maila nuklearreko gainespresioa saihesten duten pcDNA-PLC β 1a-M2b edo pcDNA-PLC β 1b-M2b-arekin transfektatzean, pcDNA-PLC β 1a edo pcDNA-PLC β 1b-arekin transfektatzean baino % 13,63 eta % 10,79 zelula neuronal gutxiago zenbatzen ziren, hurrenez hurren. Hau da, PLC β 1a eta PLC β 1b nukleoan espresatzen ez zirenean sortutako zelula neuronalen ehunekoa % 32,13 eta % 28,25 jaisten ziren. Gainera, PLC β 1a-M2b edo PLC β 1b-M2b gainespresatzean morfologia ez-neuronala gailentzen zen.



E.3.4 irudia: **A:** pcDNA, pcDNA-PLCβ1a-M2b edo pcDNA-PLCβ1b-M2b-arekin transfektatutako NT2 zelulen imunofluoreszentzia entsegua. Markaketa gorria PLCβ1-ren (D8) aurkako antigorputzari dagokio eta urdina Hoechst nukleoaren tindatzaileari. Eskala barra = 50 μm. **B:** pcDNA-PLCβ1a, pcDNA-PLCβ1b, pcDNA-PLCβ1a-M2b edo pcDNA-PLCβ1b-M2b-arekin transfektatutako NT2-en morfologiaren arabera bi fenotipoen (*neuronal* eta *ez-neuronal*) populazioaren banaketa adierazten duen grafikoak, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Análisi estatistikorako binakatu gabeko datuen T test-a erabili zen.

Aurreko atalean bezala, hemen ere Western Blot bidez aztertu zen markatzaile neuronalen espresioa, pcDNA-PLCβ1a edo pcDNA-PLCβ1b-arekin transfektatutako NT2 zeluletan. PLCβ1a eta PLCβ1b natiboen kasuan ez bezala mutanteekin transfektatutako zelulek ez zuten β III tubulinaren igoerarik pairatzen (E.3.5 irudia). NF200-ri dagokionez, PLCβ1a-M2b eta PLCβ1b-M2b-ekin transfektatutako NT2-en homogenatuaren seinalearen batezbestekoei beharrezko joera erakusten zuten, proteina natiboen seinalearekin alderatuz. Hala ere, aldaketa hauek ez ziren estatistikoki esanguratsuak, entseguen errepikapenetan lortutako emaitzen aldakortasun handia dela eta.



E.3.5. irudia. pcDNA, pcDNA-PLC β 1a, pcDNA-PLC β 1b, pcDNA-PLC β 1a-M2b edo pcDNA-PLC β 1b-M2b-arekin transfektatutako NT2 zelulen homogenatu osoaren β III tubulina eta NF200-aren espreio mailen azterketa Wester Blot entseguen bitartez. Grafikoetan, antigorputz β III tubulinaren edo NF200-aren aurkako antigorputzarekin lortutako seinalearen dentsitate optikoa erlatiboak, batezbesteko eta SEM moduan adierazita (n=3). Análisi estatistikoa faktore bakarreko ANNOVA-rekin egin zen eta talde desberdinen arteko konparaketarako Tukey-en konparazio anitzeko testa erabili zen.

Orain arte emaitzak aztertu ondoren, honako ondoriora heldu gaitzake. PLC β 1a edo PLC β 1b maila altuan espresatzen denean NT2 zeluletan desberdintzera jotzen dute. Desberdintze neuronal bultzatzen dute nagusiki, PLC β 1a aldaerak, PLC β 1b aldaerak baina gehiago. Bestetik, PLC β 1a edo PLC β 1b nukleoan espresatzen ez direnean, maila baxuagoan gertatzen da desberdintze neuronal. Beraz, NT2 zelulen desberdintze neuronal bultzatzearen arduradun nagusia PLC β 1a nuklearra dela esan genezake.

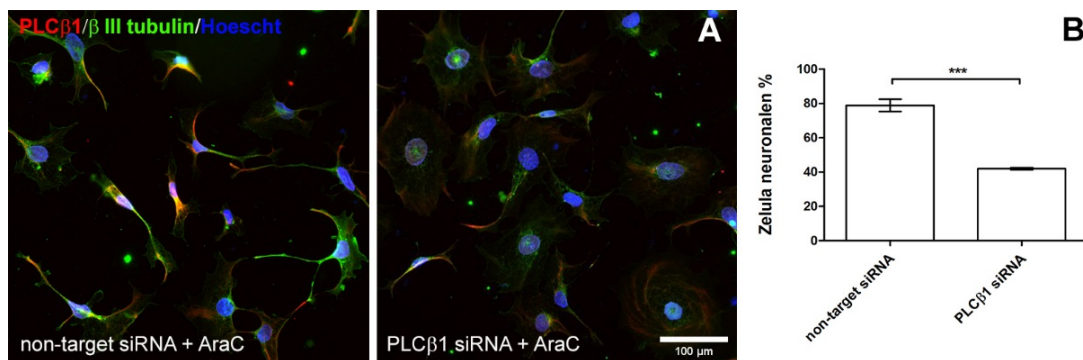
3.3. PLCβ1-AREN GENE ISILPENAREN ERAGINA ARAC-K BIDERATUTAKO NT2 ZELULEN DESBERDINTZE PROZESUAN.

PLCβ1 natibo eta kokapen nuklearreko mutanteekin egindako entseguetan, frogatu dugu PLCβ1-ak, eta batez ere a aldaera nuklearrak, NT2 zelulen desberdintze neuronal bideratzen duela. Azken atal honetan, PLCβ1-aren isilpenak, gure ikerkuntza taldeak optimizatutako AraC antimitotikoak induzitzen duen NT2 zelulen desberdintze ereduaren eraginik ote zuten aztertu genuen (194).

Bi abordaia esperimental erabili ziren PLCβ1-ren gene isilpena burutzeko: siRNA-en transfekzio zuzena eta siRNA-ak kodifikatzen zituzten shRNA-en transfekzioa. shRNA-en transfekzio gaitasuna txikiagoa izan arren, GFP kodifikatzen zuten genea zeramaten plasmido berean, transfektatutako zelulak transfektatu gabekoengandik bereizteko aukera emanez (ikus metodoen 1.2 atala).

3.3.1. siRNA bidezko PLCβ1-aren isilpena

siRNA bidezko PLCβ1-aren isilpenak AraC bidezko NT2-en desberdintzapen prozesuan eraginik zuten aztertzeko, zelulak non-target siRNA edo PLCβ1 siRNA-arekin transfektatu ziren lehenik. 24 h igaro ondoren AraC gehitu zitzaizen medioan eta 72h beranduago fixatu ziren. Ondoren, immunofluoreszentzia entseguak burutu ziren, PLCβ1-aren aurkako eta β III tubulina markatzaile neuronalaren aurkako antigorputzekin.



E.3.6. irudia. **A:** Non target siRNA edo PLCβ1 siRNA-arekin transfektatutako eta AraC-arekin tratatutako NT2 zelulen immunofluoreszentzia entsegu bikoitza. Markaketa gorria PLCβ1-ren (D8) aurkako antigorputzari dagokio, berdea β III tubulinaren aurkako antigorputzari eta urdina Hoechst nukleoaren tindatzaileari. Eskala barra = 100 μm. **B:** Baldintza bakoitzean kuantifikatutako zelula neuronalen ehunekoak adierazten diren grafikoa, batez bestekoa ± SEM moduan adierazita. Analisi estatistikorako binakatu gabeko datuen T test-a erabili zen.

E.3.6 irudian ikus daitekeen bezala, zelulen morfologia desberdina zen bi balditzetan. Non-target siRNA kontrol negatiboaren kasuan, zelula gehienek luzakinak zituzten eta luzakin hauetan adarkadurak agertzen ziren zenbaitetan. PLC β 1 siRNA transfektatutako zeluletan, aldiz, luzakinak zituzten zelulen kopurua txikiagoa zen eta baita beta-III-tubulinaren markaketaren intentsitatea ere. Kasu honetan, NT2 aitzindarien antzik ez zuten zelula handi borobilak gailentzen ziren.

Aldaketa hauek zenbateraino ematen ziren jakiteko, baldintza bakoitzean zegoen zelula neuronalen kopurua kuantifikatu zen. Zelula neuronalen eta ez-neuronalen artean bereizteko erabilitako irizpidea neuriten agerpena izan zen. Hala, non-target siRNA-rekin transfektautako zelulen gehiengoak morfologia neuronalak zuen (% 78,90 \pm 3,56). PLC β 1 siRNA-rekin transfektatutako zelulen kasuan, nabarmenki txikiagoa zen zelula neuronalen ehunekoa (% 41,92 \pm 0,62). Honek, PLC β 1-ren siRNA bidezko isilpenak AraC-k induzitutako desberdintze neuronalak galarazten zuela erakusten zuen.

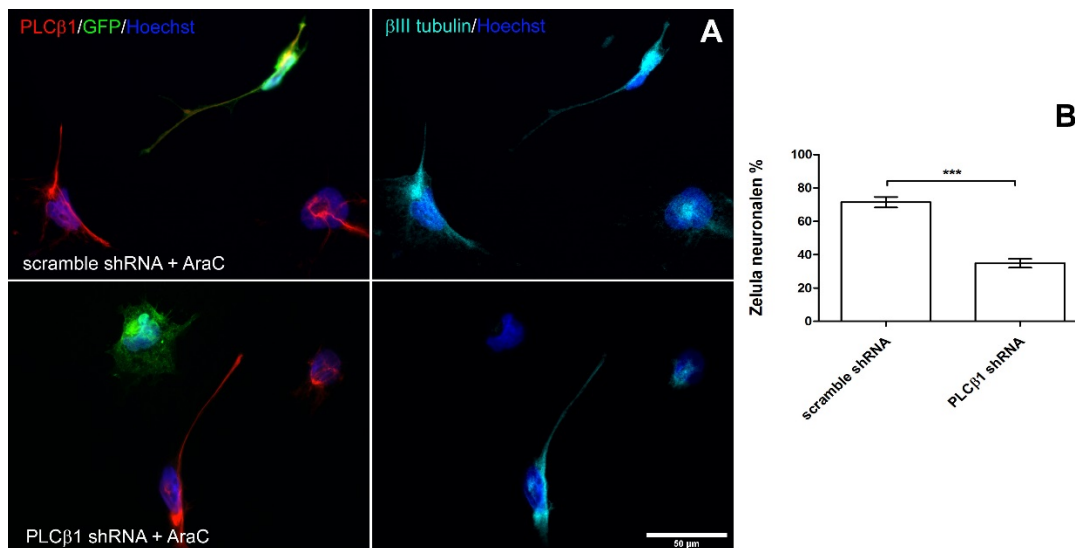
3.3.2. shRNA bidezko PLC β 1-aren isilpena

Aurreko ataleko urrats berdinak jarraitu ziren entsegu hauetan ere. Lehenik, shRNA-en transfekzioa egin zen NT2 zeluletan, 24 h igaro ondoren induzitu zen AraC bidezko desberdintzapen prozesua eta 72 orduz mantendu ziren. Ondoren, immunofluoreszentzia entsegua egin zen PLC β 1 eta β III tubulinaren espresio maila aztertzeko. Abordaia experimental honen desberdintasun eta abantaila nagusia transfektatzeko erabilitako bektoreak GFP-ren espresiorako genea txertatuta zuela zen. Horrela, prestakin bakoitzean plasmidoa barneratutako zelulak identifikatu ahal izan genituen. PLC β 1 shRNA-rekin transfektatutako NT2 zelulen kasuan, GFP markaketa zuten zeluletan PLC β 1-aren seinalea oso ahula zen, prestakin bereko zelula GFP negatiboekin alderatuz. Scramble shRNA-rekin transfektatutako zeluletan, aitzitik, ez zegoen aldaketarik GFP espresatzen zuten eta espresatzen ez zuten zelulen PLC β 1-ren markaketen intentsitateen artean. Guzti honek, PLC β 1 shRNA-rekin transfektatutako zeluletan PLC β 1-aren gene isilpena behar bezala eman zela adierazten zuen.

Transfektatutako zelulen morfologia aztertu zen ondoren. Scramble shRNA-rekin transfektatutako zelulak AraC-ren eraginpean ohikoa den modura desberdintzen ziren arren, PLC β 1 shRNA-rekin transfektatutakoetan askoz ere

zelula gutxiagok hartzen zuen morfologia neuronalaren tratamenduaren ostean. Zehatzago esanda, scramble shRNA-rekin transfektatutako zelulen artean % 71,45k ($\pm 3,14$) morfologia neuronalaren zuen eta PLC β 1 shRNA-rekin transfektatutako zelulen artean % 34,88k ($\pm 2,67$).

Gainera, scramble shRNA-rekin transfektatutako prestakineko zelula gehienak (GFP espresatu ala ez), morfologia neuronalaren garatzeaz gain, β III tubulina markatzaile neuronalaren espresatzen zuten, AraC-rekin tratatzean espero zitekeen bezala. PLC β 1 shRNA-rekin transfektatutako prestakineko zelula GFP positiboek, ordea, ez zuten prestakin bereko zelula GFP negatibo gehienek zuten β III tubulina markaketa bizia erakusten.



E.3.7. irudia. **A:** scramble shRNA edo PLC β 1 shRNA-arekin transfektatutako eta AraC-arekin tratatutako NT2 zelulen immunofluoreszentzia entsegu bikoitza. Markaketa gorria PLC β 1-ren (D8) aurkako antigorputzari dagokio, berdea GFP-aren aurkako antigorputzari, ziana β III tubulinaren aurkako antigorputzari eta urdina Hoechst nukleoaren tindatzaileari. Eskala barra = 50 μ m. **B:** Baldintza bakoitzean kuantifikatutako zelula neuronalen ehunekoak adierazten diren grafikoa, batez bestekoa \pm SEM moduan adierazita. Analisi estatistikorako binakatu gabeko datuen T test-a erabili zen.

Laburbilduz, NT2 zeluletan shRNaren bitarteko PLC β 1 espresioaren isilpenak, AraC-k indusitutako lukeen morfologia neuronalaren agerpena eta zelula neuronal hauek pairatzen duten β III tubulina markatzaile neuronalaren espresio mailen igoera galarazten dela frogatu da immunofluoreszentzia bidez. Honek, AraC-k indusitutako NT2 zelulen desberdintze neuronalaren burutzeko PLC β 1-aren presentzia beharrezkoa dela adierazten du.

VI. EZTABAIDA

1. PLC β 1-AREN ESPRESIO MAILAK HANDITUTA DAUDE SAGUEN HIPOKANPOKO HORTZ BIHURGUNEKO AHNSC ZELULEN DESBERDINTZAPEN PROZESUAN.

Sarreran azaldu dugun bezala, PLC β 1a/b-ren kokapen nuklearra deskribatu zenetik, asko izan dira isoentzima honek zelulen desberdintzapenaren erregulazioan duen inplikazioa azertu duten ikerkuntza lerroak. Dena dela, helburu honetara bideratutako azterketa gehienak zelula ez neuronaletatik abiatu dira. Honela, hainbat zelula ereduren desberdintze prozesuan PLC β 1-aren mailen aldaketak gertatzen direla deskribatu da. C2C12 muskulu eskeletikoko zelulen eta 3T3-L1 adipozitoetan, esaterako, desberdintzea induzitzean PLC β 1-aren espresio mailen zein aktibitatearen igoera ematen dela frogatu zen (105,107). DMSO bidez desberdintutako MEL zeluletan, ordea, PLC β 1-aren aktibitatea eta espresio maila txikiagoa zela ikusi zen proliferatzen zeuden zelulekin alderatuz (142).

Nerbio Sistema Zentralari dagokionean, PLC β 1-aren papera desberdintzapen prozesuan aztertzeke asmoarekin ikerketa gutxi egon arren, badira zeharkako ebidentziak isoentzima honen inplikazioa adierazten dutenak. Hasteko, garunaren garapenean PLC β 1-aren paper garrantzitsua iradokitzen duten, jaio aurreko eta jaio ondorengo kortexaren arteko isoentzima honen aktibitatea eta espresio mailen aldaketak deskribatu dira (58,103,104). Bestetik, PLC β 1 (-/-) zein mGluR5 (-/-) "knockout" saguetan, kortex somatosensorialeko "barrels" deiturikoetan azaldurak deskribatu dira, kortexeko garapenean mGluR1 hartzaileek bideratutako PLC β 1aren señaletapenaren parte hartzea adierazten dutenak (170–172). Ildo beretik, beste ikerkuntza batean PLC β 1 (-/-) "knockout" saguetan, kitzikatzaile eta inhibitzaile zirkuituen arteko desoreka iragankor bat iradokitzen duen, 19. egun postnatalean desagertzen zen bosgarren egunean, morfologia simetrikoko sinapsien proportzioaren beherakada ikusi zen (172).

Zelula lerro eredu neuronaletan lortutako emaitzei dagokionean, asko dira PLC β 1-aren espresio mailen aldaketak desberdintzapen prozesuarekin erlazionatu duten ebidentziak. Esaterako, Garwain eta kolaboratzaileek PLC β 1-aren mailen igoera ematen zela deskribatu zuten PC12 zelulen desberdintze prozesuan, desberdintzea induzitu ondorengo 24 eta 48 orduetan zehazki (108). Bestetik,

Novak eta kolaboratzaileek, giza NT2 zelulak NT2N neurona helduetan desberdintzean Gαq/11, PLCβ1 eta PLCβ4 isoformen espresio mailaren igoera eta PLC aktibitatearen igoera ematen zela deskribatu zuten (193). Giza NT2 zelulekin jarraituz, gure ikerketa taldeko emaitzen arabera, amaierako zelula desberdinduetan ez ezik, desberdintzapen prozesuan zehar ere, PLCβ1-aren espresio mailen igoera gertatzen zen RA edo AraC-rekin tratatutako NT2 zelulen desberdintze neuronalean (194). Gainera, PLCβ1-aren espresio mailen igoera hori markatzaile neuronalen agerpenaren aurretik hasten zen, eta horrek, PLCβ1-a giza NT2 zelulek fenotipo neuronal garatu eta markatzaile neuronalen espresioa indultzeko mekanismoetan parte hartzen egon daitekela iradokitzen du.

PLCβ1-aren desberdintze neuronaleko inplikazioa beste zelula eredu batean aztertze asmoz, tesi honen lehen atalean, AHNSC-en *in vitro* desberdintze prozesua aztertu da, prozesu horretan gerta litezkeen PLCβ1 mailen aldaketa posibleak, zehazki.

AHNSC-ak saguen hortz bihurtzeko eremu subgranularrean dauden ama zelula neuronal kieszentetatik eratorriak dira. Ama zelula neuronal kieszente hauek, saguen hortz bihurtzeko isolatu eta hazkuntza faktoreekin kultibatzen dira *in vitro*. Hazkuntza faktoreen eraginpean azkar bikoizten diren AHNSC-etan bilakatzen dira. Azkar bikoizten diren aitzindari hauei hazkuntza faktoreak kentzen zaizkienean, aldiz, desberdintzapena indultzen da eta zelula neuronal zein glialak sortzen dira (197). AHNSC-en *in vitro* desberdintze eredu aparta da neurogenesi prozesuko mekanismo zelular eta molekularrak ikertzeko. Izan ere, zelula hauen geruza bakarreko kultura eredu itsaskorrak desberdintzen ari den zelula bakoitzaren aldaketa morfologikoen jarraipena egitea ahalbidetzen digu eta ondoren, zelula bakoitzak espresatzen dituen markatzaileak identifikatu eta horren araberrako sailkapena egitea, immunofluoreszentzia entseguen bitartez.

Lan honen emaitzen arabera, AHNSC-en desberdintze eredu egindako qPCR eta IF entseguen emaitzen arabera, AHNSC-en desberdintze prozesuan mailaren igoera nabarmena gertatzen dela adierazi dezakegu. Zehazki, PLCβ1 mRNA totalaren eta bereziki, PLCβ1a-ren mRNA mailen igoera gertatzen da AHNSC-en *in vitro* eragindako desberdintze prozesuko lehen 48 orduetan. Aldiz, PLCβ1b-aren mRNA maila berdina mantentzen da lehen 48 orduetan eta hortik aurrera beherantz

egiten du. Kontuan hartzekoa da, lehen aipatu dugun bezala, eredu honetan desberdintzapena indutzaren denean zelula neuronal zein glialak sortzen direla. Hortaz, qPCR emaitzak, markatzaile neuronalekin egindako immunofluoreszentzia entseguen osatzea ezinbestekoa da. Horrela, PLC β 1 isoentzimaren a eta b aldaerak ezagutzen dituen antigorputzarekin egindako immunofluoreszentzia entseguetan deskribatu dugun moduan, desberdintze neuronala pairatzen ari ziren zeluletan soilik gertatzen zen PLC β 1-aren espresio mailen igoera eta ez zelula glial edo desberdindu gabekoetan.

Emaitza hauek bat datoz aipatutako desberdintze eredu neuronaletan deskribatutakoarekin eta beste behin ere, PLC β 1-ak neuronan desberdintze prozesuan paperen bat betetzen duela iradokitzen dute. Adierazgarria da baita, desberdintze eredu neuronal guzti hauetan PLC β 1-aren goranzko erregulazioa desberdintzea indutze eta hasierako orduetan gertatzen dela. Honela, PC12 zelulen desberdintzean, lehenengo 48 ordutan sintetizatzen da PLC β 1, desberdintze maila oso txikia denean oraindik (108,221). Era berean, AraC bidezko NT2-en desberdintze prozesuko PLC β 1-aren espresioaren igoera lehenengo egunetan ematen da, markatzaile neuronalen espresio maximoa eman aurretik (194).

Aldi goiztiarreko espresioak, PLC β 1 desberdintzearen indukzioaren parte hartu dezakeela pentsarazten digu, kanpo estimuluei erantzunez zelularen patua erabakitzen duten mekanismoen parte izan daitekeela. Edozein delarik ere zelula aitzindarien jatorria, desberdintze neuronala gerta dadin zelulak ziklotik irten eta hainbat aldaketa fenotipiko jasan behar dituzte neurona heldu bilakatu arte. Oraindik ez da ondo ezagutzen zelulak ziklotik irtetea gertatzen den lehenik eta horrek jartzen dituen abian beharrezko beste aldaketa morfologiko eta funtzionalak, edo ziklotik irtetzea aurrekoaren ondorio besterik ez den. Dena dela, argi dago biak ala biak ezinbesteko prozesuak direla zelula aitzindariak neurona heldu bilakatzeko (222).

2. PLC β 1-AK NT2 ZELULEN ZIKLO ZELULARRAREN ZINETIKAN ERAGITEN DU

Sagu helduen hortz bihurtetik eratorritako AHNSC-en in vitro desberdintzean PLC β 1-aren proteina zein mRNA mailako espresioaren igoera dagoela frogatzeak, sendotasuna ematen die giza NT2 zelula zein PC12 zelulen desberdintze ereduetan lortutako ebidentziei. Esan bezala, gure taldeak giza jatorrizko NT2 eredu zelularra erabili du PLC β 1-ak desberdintze neuronalak jokatzen duen papera ikertzeko.

Giza enbrioi kartzinoman jatorria duten Ntera2/D1 (NT2) zelulak azido erretinoikorekin (RA/NT2N) edo AraCrekin (AraC/NT2N) tratatuz NT2N eredu neuronala lortzen da. NT2 zelula tratatu gabeek, zelula epitelialen aitzindarien ezaugarriak dituzte, baina tratamenduaren ostean, ezaugarri horiek galdu eta neurona izaera hartzen dute (187–189,191,192). Horrela, ezberdintze-prozesua amaitzean, NT2ak zelula postmitotiko bilakatzen dira (NT2N). Hau da, tratamenduaren osteko NT2N zelulek ez dute bikoizteko gaitasunik, eta gainera, NT2 zelula-lerrotik eratorritako NT2N zelulen azterketa morfologikoak adierazten duenaren arabera, zelula horiek neuronon oinarriko ezaugarriak dituzte. Bi luzakin mota bereizi daitezke: zelularen gorputzetik irteten diren luzakin luze eta estuak (axoi itxurakoak) eta oinarri lodiagoa duten eta mehetuz eta adarkatuz doazen beste batzuk (dendrita itxurakoak) (189).

Giza NT2 zelulak, azido erretinoikoarekin (RA) induzitutako desberdintze eredu batez ere, oso erabiliak izan dira gizakiaren neuronon garapena ikertzeko (188,189,192,223). Gure ikerketa taldeak orain dela gutxi frogatu duenez, NT2 zelula aitzindariak gai dira, epe laburrean, proliferazio egoeratik desberdintze neuronaleko bidea hartu eta neurona postmitotiko heldu bilakatzeko, zitosina β -D-arabinofuranosido (AraC) antimitotikoaren indukzioz (194). Tratamendu honen bitartez, NT2 zelula aitzindariak, epe laburrean (6 egun) eta eraginkortasun handiz neurona postmitotiko bilakatzeko gai dira, neurona desberdinduentzat onartutako irizpide orokorrak betetzen baitituzte. Hori dela eta, desberdintze eredu hau oso baliagarria da desberdintze prozesu neuronala gidatzen duten mekanismo molekularrak ikertzeko, batez ere, gizaki zelulen desberdintzea neuronala aztertzeko tresna gutxi baitaude gaur egun.

Desberdintze neuronal edo neurogenesia ulertu nahian dabilzan ikerlari askok desberdintze prozesua ziklo zelularren eta, batez ere, G1 fasearen luzapenarekin erlazionatu dute azken urteotan. Sagu enbrioien NSZ-ren garapenean esaterako, prozesua aurrera egin ahala sortzen diren eta desberdintze maila handiagoa duten neuronen G1 fasea luzeagoa dela deskribatu izan da (167,168,215). Ildo beretik, giza zein sagu ESC zelulen (ama zelulak enbrionarioak) kultura ereduetan pluripotentzia maila altua G1 fase laburrekin erlazionatu da, eta desberdintze maila altua, aldiz, G1 fase luzeagoekin (224–226).

Honenbestez, lan honetan PLC β 1-aren NT2 zelulen desberdintze prozesua bultzatzeko mekanismoaren oinarria ziklo zelularren zinetikan aldaketak eragitea ote den ikertu dugu. Zehazki, siRNA-en bitarteko PLC β 1-aren espresioaren isilpenak NT2 zeluletan ziklo osoaren eta zikloko fase bakoitzaren abiadura aldatzen duen aztertu zen. BrdU metaketaren analisia zelulen ziklo osoaren eta S fasearen iraupena kalkulatzeko erabiltzen den metodoetako bat da. BrdU, timidinaren analogoa izanik, zelulen DNAn txertatzen da hau bikoizten denean, hau da, S fasean. Zelulen medioan gehitu eta hainbat denbora tartetan BrdU barneratu duten nukleoaren ratioa kuantifikatuz gero, ziklo zelularren eta S fasearen iraupena kalkulatu daiteke. Zikloaren gainontzeko faseen iraupena fosfohistona 3-aren (PH3) markaketaren azterketaren bidez egin genuen. PH3-a zelulak mitosian daudenean espresatzen den proteina da eta immunofluoreszentzia bidez markatu daiteke.

BrdU metaketaren eta PH3-ren markaketaren entseguetatik lortutako parametroen arabera, PLC β 1-aren isilpena eragitean NT2 zelulen zikloaren abiadura nabarmenki handitzen da. Gainera, gure emaitzek adierazten dutenaren arabera, zikloaren bizkortze hau, nagusiki G1 fasean gertatzen da, eta S fasearen iraupena ere, modu apalagoan bada ere, txikitzen da PLC β 1 isildutako zeluletan. Hau bat dator, orain dela gutxi Garwain eta kolaboratzaileek (2018) argitaratutako ikerketaren emaitzekin. Bertan, PLC β 1-aren isilpenak, PC12 eta SK-N-AH zelula lerro neuronalen proliferazioa handitzen zuela deskribatu zuten, neuronalak ez ziren zelula lerroetan kontrakoa eragiten zuen bitartean (109). Honek guztiak, PLC β 1-aren gabeziak, ziklo zelularra eta bereziki G1 fasea bizkortzearen ondorioz, proliferazioa handitzen duen hipotesia indartzen du. Ezaugarri horiek zelulen

pluripotenzia maila handiagoarekin eta desberdintze maila baxuarekin erlazionatzen dira.

PLC β 1-ak giza jatorrizko NT2 zelulen ziklo zelularren zinetika eraldatzeko erabiltzen duen mekanismoa oraindik zehaztu gabe egoteaz gain, garrantzitsua litzateke erregulazio honetan kokapen zelularren arabera PLC β 1-aren zein azpipopulazioak parte hartzen duen definitzea. Hau da, zelula barneko ze kokapenetan bideratzen duen erregulazio hau. Gogoratu dezagun, bere aktibitate entzimatiakoaren substratuak diren fosfoinositidoak bezala, PLC β 1-a ere aurki dezakegula nukleo mailan eta baita PIP kinasak, DGK ζ , PLC δ 4, PI-3 kinasak C2 α , PTEN eta SHIP2 ere (3,80,81). Gainera, PLC β 1-ak, nukleoko matrizean kokaturiko ‘orbain nuklearrak’ deituriko gune konkretu horietan DGK θ eta PIP $_2$ -arekin kolokalizatzen duela frogatu da (82). Zehazki, Martelli eta kolaboratzaileek deskribatu zuten lehenengo aldiz PLC β entzimaren presentzia nukleoan, IGF-1-ak eragindako PIP eta PIP $_2$ -aren hidrolisi azkarraren erantzulearen bila jardun zutenean. Izan ere, Swiss 3T3 zelulak IGF-1-arekin tratatzean nukleoko PLC β -ren aktibitatea 2-3 aldiz handitzen zela demostratu zuten (89). Gerora, ikerlari talde desberdinek PLC β 1 isoforma, zenbait lerro zelular eta ehunen nukleoan ere espresatzen zela baieztatu zuten (83–86). Are gehiago, egun badakigu, PLC β 1-a nukleoko PLC isoizima guztien artean ugariena dela eta PIP $_2$ -aren hidrolisiaren erantzule nagusia dela, bertan PLC β 2, PLC β 3 eta PLC β 4 ere aurki ditzakegun arren (87,88).

Bestetik, kontuan izan behar dugu PLC β 1-aren bi splicing aldaera daudela eta bakoitzak banaketa zelular desberdina duenez, modu desberdinean eragin dezakeela. Ildo horretatik, BrdU eta Ki67 proliferazio markatzaileen esperimentuen emaitzek, PLC β 1a zein PLC β 1b aldaeraren gainespresioak NT2 zelulen proliferazio gaitasunaren gutxipena eragiten duela erakutsi dute. Sarreran azaldu den bezala, bi aldaeren C-terminaleko eremuan proteinaren zelula barneko kokapena baldintzatu dezaketen desberdintasun garrantzitsuak daude (ikus sarrerako 1.1.2 atala). MEL zeluletan, PLC β 1b batez ere nukleoan espresatzen den bitartean, PLC β 1a mintz plasmatikoa, zitoplasman eta nukleoan maila berean aurkitzen dela frogatu zen (91). Gure ikerketa taldeko arratoi garun eta NT2 zeluletan egindako azterketak bat datoz honekin. Zehatzago esanda, nahiz eta

PLC β 1b aldaeraren lehentasunezko zelula barneko gunea nukleoa izan, PLC β 1a ugariena da kokapen zelular guztietan baita nukleoan ere (227).

NT2 zelulen zikloko irteera PLC β 1a/b-ren zelula barneko zein populazioak parte hartzen zuen definitzeko asmoarekin, prozesu honetan PLC β 1a edo PLC β 1b-ren lokalizazio nuklearreko mutanteak garatu, eta haien gainespresioaren eragina aztertu zen NT2 zeluletan. PLC β 1a edo PLC β 1bren kokapen nuklearreko mutanteak (M2b mutantea) lortzeko, isoentzima honi nukleoan metatzeko gaitasuna ematen dion 1055-1071 aminoazidoen artean dagoen argininan eta lisinan aberatsa den eremuko (NLS) 1056, 1063 eta 1070. lisina hondarrak isoleuzinaz ordezkutzen dira. Honela, M2b mutanteek, nukleoan sartzeko gaitasuna galtzeaz gain, dominante negatibo moduan funtzionatzen duela deskribatu da (39).

Emaitzen arabera, PLC β 1a/b-en gainespresioak eragindako proliferazioaren geldotzerako isoentzima honen aldaeren kokapen nuklearra beharrezkoa dela adierazten digute. Izan ere, jatorrizko proteinekin ez bezala, kokapen nuklearreko bi aldaeren mutanteekin (PLC β 1a-M2b edo PLC β 1b-M2b) transfektatutako zelulak, plasmido hutsekin transfektatutako proliferazio mailetara hurbiltzen ziren. Aipatzekoa da erabilitako hurrenkera esperimental bakoitzarekin lortutako emaitzen artean alde txiki bat badela. BrdU-ren azterketaren arabera, PLC β 1a-M2b edo PLC β 1b-M2b-rekin transfektatutako zelulek ez zuten proliferazio ahalmenik galtzen. Haatik, Ki67-ren azterketaren arabera, lokalizazio nuklearreko mutanteen transfekzioak proliferazio gaitasuna kentzen zien zelula batzuei, baina ez PLC β 1a edo PLC β 1b natiboak gainespresatzean bezain besteri.

Hortaz, lan honetan PLC β 1-ak giza NT2 zelulen G1 fasearen iraupenean eragiten dugula frogatzeaz gain, PLC β 1a eta PLC β 1b aldaerek desberdintze prozesuaren parte izan daitekeen zikloko irteera eragiten dutela frogatu dugu, eta hori gertatzeko beren nukleoko kokapena beharrezkoa dela egiaztatu dugu. Ebidentzia hauek, nukleoko PLC β 1a eta PLC β 1b-ak NT2 zelulen ziklotik irteteko prozesuan parte hartzen dutela iradokitzen badute ere, oraindik ez da ezagutzen erregulazio honen oinarrian dagoen mekanismo molekularra. Mekanismo posibleen artean, dagoeneko ondo definituta dauden ziklo zelularren erregulatzailen modulazioa da pentsa daitekeen biderik zuzenena. Horren harira, aztertutako zelula lerroak neuronalak ez diren arren, badira nukleoko PLC β 1 eta D3 ziklinaren arteko

erlazioa deskribatu duten zenbait ikerketa. Adibidez, Faenza eta kolaboratzaileek (2000), MEL zelulen nukleoan PLC β 1 gainespresatzean D3 ziklina/CDK4 konplexua aktibatzen zela eta honen ondorioz, Rb proteinaren hiperfosforilazioaren eta E2F-1 transkripzio faktorearen aktibazioaren bitartez, G1 faseko progresioa bideratzen zela, deskribatu zuten (91). Ildo beretik, beste ikerketa lerro desberdinean, IGF-1 hartzailearen aktibazioz bideratutako C2C12 sagu mioblastoen desberdintzerako nukleoko PLC β 1-aren eta D3 ziklinaren espresioaren igoera gertatzea beharrezkoa zela frogatu zen. Ikerketa horretan, PLC β 1-aren lokalizazio nuklearreko mutanteak gainespresatzean, D3 ziklinaren espresioaren eta desberdintze prozesuaren inhibizioa gertatzen zela ikusi zuten (181). Gainera, D3 ziklinaren modulazioa hori, PLC β 1 nuklearraren aktibitate entzimatiakoaren menpekoa dela eta c-jun/AP-1 transkripzio faktorearen bitartez gertatzen dela deskribatu baita (182). Azkenik, 3T3-L1 zelulen desberdintze prozesuan ere, bigarren faseko nukleoko PLC β 1-aren aktibitatearen igoeraren ondoren, D3 ziklinaren mailen igoera gertatze zela deskribatu zen. Kasu honetan, gainera, lokalizazio nuklearreko mutantearen gainespresioak zelula hauen desberdintzea galarazteaz gain, D3 ziklina eta CDK4 mailen izugarritzko jaitsiera eragiten zuela deskribatu zen (107).

Eredu neuronaletan egindako ikerkuntzei erreparatuz gero, egun dagoen ebidentzia bakarra PC12 zeluletan Garwain eta kolaboratzaileek egindako ikerketa da. Ikerketa horretan, zitosoleko PLC β 1-ak, CDK16-rekin bat eginez, G1 fasearen luzapenaren erregulazioan parte hartu eta proliferazio-desberdintzapen seinaleak zuzentzen dituela proposatzen da. Izan ere, G1 fasean PLC β 1-ak CDK16-arekin elkar eragiten duela eta bere aktibitatea inhibitzen duela frogatu zuten (109). CDK16 (PCTAIRE1 izenez ere ezagutzen dena), PCTAIRE kinasa familiako kidea da eta Y ziklinaren bidez aktibatzen da (228). Proliferazio gaitasuna duten zeluletan, G1/S eta G2/M trantsizioak sustatzen dituela deskribatu da, p27 eta p53 CDK inhibitzaileen fosforilazioaren ondorioz (229,230). Hori dela eta, PLC β 1-a bidezko CDK16-ren inhibizioak zelulak G1 fasean gelditzea eragingo luke. Bestalde, CDK16, Neuro2A neuroblastoma zelulen neuriten hazkunderako eta osagai presinaptikoen trafikorako ere beharrezkoa dela deskribatu da (228,231–233).

Eredu neuronal zein ez-neuronaletarako proposatutako mekanismo desberdinak kontuan hartuta, giza NT2 zelulen desberdintze eredu PLC β 1-ak ziklo zelularren erregulazioan ze mekanismoren bitartez eragiten duen zehaztea izan beharko litzateke eman beharreko hurrengo pausua. Garrantzitsua da bestetik, ziklina/CDK bidezko erregulazio posible honen oinarrian, PLC β 1-aren eta ziklinaren arteko interakzio hutsaren ondorioz edota isoentzimaren aktibitatearen bitarteko fosfoinoisitidoen hidrolisiaren ondorioz gertatzen den argitzea, eredu ez neuronaletako D3 ziklinaren erregulazioan ikusi den bezala (182).

3. PLC β 1a/b-REN PAPERA NT2 ZELULEN DESBERDINTZE PROZESUAN

Aurreko ataletan eztabaidatu dugun bezala, PLC β 1-aren espresio mailen igoerak deskribatu izan dira zelula eredu neuronal desberdinetan (108,193). Gure taldeak, RA edo AraC-rekin induzitutako NT2 zelulen desberdintze prozesuetan PLC β 1a eta PLC β 1b-ren proteina mailako espresioaren igoera gertatzen dela frogatu du. Gainera, PLC β 1a/b-ren igoera hau markatzaile neuronalak diren β -III tubulina eta NF200 espresio mailen igoeraren aurretik gertatzen dela deskribatu dugu (194). Tesi honetan, AHNSC *in vitro* desberdintze eremuan ere, PLC β 1-aren proteina eta mRNA mailen igoera gertatzen dela ikusi dugu eta hau, NT2 eremuan bezala, desberdintze prozesuaren hasieran gertatzen dela (ikus Emaizten 1. atala).

Are garrantzitsuagoa dena, tesi honetako emaitzek adierazten dutenaren arabera, giza NT2 zelulen eremuan, PLC β 1a edo PLC β 1b-ren gainespresioak desberdintze neuronalarekin bat datozen aldaketa morfologikoak eta markatzaile neuronalen espresioa induzitzen ditu, AraC edo kanpoko beste desberdintze estimulurik gabe. Hau da, PLC β 1a edo PLC β 1b-ren gainespresioak, G1 fasearen luzapenaren bitarteko NT2 zelulen proliferazioa eteteaz gain (ikus Emaizten 2.2. atala), zelulen morfologian eta markatzaile neuronalen espresioan eragiteko gai dela frogatu dugu. Emaizetan sakonduz, PLC β 1a edo PLC β 1b-ren gainespresioak aldaketa morfologiko nabarmenak eragiten ditu NT2 zeluletan. Aldaketa hauen arabera bi zelula mota desberdindu daitezke, proiektiodun zelulak (neuronalak) eta proiektzio gabeko baina jatorrizko NT2 zelulak baino tamaina handiagoko zelulak (ez-neuronalak). Morfologia neuronala hartzen duten zelulak β III tubulina eta NF200 markaketa espezifiko altua zuten. Morfologia ez-neuronalekoetan, ordea, ez zen NF200 markaketa espezifikoa agertzen eta β III tubulinaren espresio maila neuronalena baino baxuagoa zen. Oro har, hau baieztatzeak azterketa morfometriko eta biokimiko sakonagoa beharko lukeen arren, aipatzekoa da lortzen ziren morfologia neuronaleko zelulak AraC bidezko desberdintze neuronalean lortzen ziren zelulen oso antzekoak zirela (190). Gogoratu dezagun, AraC-k bideratutako NT2 zelulen desberdintzapen neuronalaren lehenengo egunetan, PLC β 1-aren espresio mailen igoerak deskribatu ditugula.

Bi markatzaile neuronal hauetatik, NF200 da soilik kultura eredu-tako desberdintze neuronalaren amaierako zelulekiko espezifikoa. Giza NT2 zelulen RA bidezko desberdintze eredu- esaterako, NT2N zelula desberdinduak NF200-ren espresio maila altua zuten, NT2 aitzindariekin alderatuz. β III tubulina, berriz, NT2N zein NT2A zeluletan espresatzen zen (RA/NT2 desberdintzean lortutako zelula ez-neuronalak) (190,194). Bestalde, β III tubulina neuronalak ez diren zenbait zeluletan ere espresatzen dela ikusi da, giza fetuaren astrozitoetan eta desberdindu gabeko ama zelula mesenkimaletan adibidez (234,235). Hortaz, NF200 proteinaren espresio mailen igoera desberdintzapen neuronalaren adierazgarritzat har badaiteke ere, β III tubulinaren mailen igoerak, neuronala ez den beste zelula neuronalen desberdintzapen prozesuaren adierazi dezake. Gure emaitzen arabera, PLC β 1a edo PLC β 1b-ren gainespresioaren ondorioz sortutako bi zelula motek (neuronal eta ez neuronalek), espresatzen zuten jatorrizko NT2 zelulek baino β III tubulinaren gehiago, nahiz eta neuronalen kasuan espresio maila nabarmenki handiagoa zen. Ondorioz, PLC β 1a/b NT2 zelulen desberdintze prozesuan (zelula neuronalen, eta agian baita ez-neuronalen, bilakaeran) inplikaturik egon daitezela pentsa dezakegu, isoentzima honen bi aldaeretako baten gainespresioak, NT2 zelulen izaera postmitotikoa bultzatzeaz gain, NF200 eta β III tubulinaren mailen igoera eragin eta morfologia neuronaletako zelulen agerpena eragiten baitu.

Bestetik, kontuan hartzekoa da PLC β 1-aren bi splicing aldaerekin (a eta b) desberdintzapen neuronalaren adierazgarriak diren aldaketa morfologiko eta biokimikoak gertatzen direla deskribatu badugu ere, aldaera bakoitzak desberdintze prozesuan eragiteko duen gaitasuna ez dela berdina. Hala, PLC β 1a-rekin lortutako zelula neuronalen ehunekoa handiagoa zen PLC β 1b-rekin lortutakoekin alderatuz gero. Baliteke bi aldaerek ekintza mekanismo bera izanda, a aldaera b-k baino eraginkorragoa izatea edota PLC β 1a-k, PLC β 1b-k parte hartzen ez duen beste bideren batean parte hartzea. Etorkizunera begira, interesgarria litzateke besteak beste, PLC β 1a eta PLC β 1b aldi berean transfektatzea bi aldaeren ekintzak gehigarriak ala homologoak diren jakiteko.

PLC β 1a eta PLC β 1b-ren zelula barneko kokapen ezberdinei dagokionez, azken urteetako ikerketa gehienek, desberdintze prozesuko inplikazioa nukleoko PLC β 1-

arekin erlazionatu dute. Sarreran azaldu dugun bezala, PLC β 1 nukleoan dagoela erakustez gain, ziklo zelularren jarraipenarekin, eta ondorioz, zelulen proliferazioarekin eta hainbat desberdintze prozesutan paper garrantzitsua betetzen duela deskribatu da (105,135,236–238,136–142,181). Gure emaitzen arabera, PLC β 1a eta PLC β 1b-ren kokapen nuklearreko mutanteen gainespresatzean (M2b), jatorrizko PLC β 1a eta PLC β 1b gainespresatzean baino zelula neuronalen gutxiago lortzen ziren, baina ez zen eragina guztiz galtzen. Hau da, kokapen nuklearreko mutanteek desberdintzapen neuronala bultzatzeko eraginkortasun txikiagoa izan arren, ez zuten guztiz galarazten prozesua. Honen atzean arrazoi metodologiko hutsak egon daitezkeela pentsa genezake. Hau da, gerta liteke, adibidez, NT2 zeluletan M2b mutanteek PLC β 1-aren nukleoko kokapena guztiz ekiditeko gai ez izatea. Edonola ere, sarreran aipatutako hainbat ikerketaren kontuan izanik ere, NT2 zelulen desberdintzapen prozesuan PLC β 1 nuklearrak ez ezik zitoplasmatikoak ere parte hartu dezakela ondorioztatu daiteke (22). Ildo honetatik, Garwain eta kolaboratzaileek, PC12 zelulen desberdintze neuronala zitoplasmako PLC β 1-aren menpe dagoela proposatu dute berriki (108). PC12 zelulekin egindako ikerketan talde honen arabera, zitoplasmako PLC β 1-ak zuzentzen du zelulen desberdintzapena, interferentziazko RNA-etan eragiten gene espresioaren erregulazioan eragiten duen C3PO-ren bitartez gene espresioa modulatu. Are gehiago, ikerlari hauen arabera PLC β 1 eta C3PO ezinbestekoak dira, PC12 eta SK-N-AH zelulen desberdintzapena zuzentzeaz gain, haien egoera neuronalari eusteko (110). Ikerketa horren arabera, PLC β 1 zitoplasmatikoak, C3PO konplexuko TRAX molekularekin bat egingo luke zelulen desberdintzapena burutzeko (108). Gainera, ikerkuntza lan horretan, C3PO konplexuko TRAX-ak zehazki PLC β 1a splicing aldaerarekin bat egiten zuela frogatu zuten. Kontuan izan dezagun, gure emaitzen kasuan ere, PLC β 1a dela, PLC β 1b-rekin alderatuta, NT2 zelulen desberdintzapena bultzatzeko eraginkortasun handiena erakutsi duena.

Bestalde, badira kokapen nuklearreko PLC β 1-ak ere transkripzio genikoaren erregulazioan eragin dezakela iradokitzen duten ebidentziak. Ildo horretatik, gure ikerkuntza taldeak arratoiaren garuneko kortexeko neuronan nukleoko PLC β 1 azpipopulazioa, kromatinaren dentsitate gutxiko eremuetan kokatzen dela eta orbain nuklearrekin kolokalizatzen duela deskribatu du (195). Gune konkretu

hautan proteinen transkripzioa erregulatzen duten transkripzio faktoreak, nukleoko ribonukleoproteina txikiak (snRNP, small nuclear ribonucleoprotein) eta RNA polimerasa II hiperfosforilatua bezalako molekulak daudela deskribatu da (65,66,196).

Azkenik, beste mekanismoen posibleen artean, jadanik eztabaidatu dugun ziklo zelularren gelditzea izango genuke. Aurreko atalean ikusi dugun moduan, PLC β 1-ak G1 fasearen luzapena eta zikloa gelditzea eragiten du NT2 eta PC12 zeluletan. Baliteke, zikloko irteera horren eraginez desberdintze neuronala bideratzen duten gainontzeko mekanismoak abiaraztea. Dena den, lan honetan aurkeztu dugunez, AraC-ren tratamenduaren bidezko NT2 zelulen desberdintzapen prozesua nabarmenki murrizten da, siRNA edo shRNA bidez PLC β 1-aren espresioa blokeatzean. Hau da, AraC-ren eragin antimitotikoaren bitartez ziklo zelularren etetearen ondoriozko NT2 zelulen desberdintzapenak, PLC β 1-aren espresio endogenoaren beharra dauka. Hortaz, gure emaitzek bere osotasunean hartuta, PLC β 1-ak ziklo zelularrean ez ezik, NT2 zelulen desberdintzapen prozesuko erregulazio puntu gehiagotan aritzen dela iradokitzen dute, hau da, NT2 zelulen desberdintzapen prozesuko PLC β 1-aren papera, zelula hauen ziklo zelularreko G1 fasearen luzapenetik haratago doala.

VII. ONDORIOAK

- 1) Saguen hipokanpoko hortz bihurguneko AHNSC zelulak hazkuntza faktoreez gabetzearen bitartez desberdintzera induzitzen direnean, PLC β 1 proteina eta mRNAren mailen igoera gertatzen da
 - a) PLC β 1 mRNA totalaren eta bereziki, PLC β 1a splicing aldaeraren mRNA mailen igoera gertatzen da AHNSC-en *in vitro* eragindako desberdintze prozesuko lehen 48 orduetan.
 - b) Immunofluoreszentzia emaitzek erakutsi zuten bezala, β III tubulina eta MAP2 espresatzen zuten zeluletan, hots zelula neuronaletan, PLC β 1-aren markaketaren intentsitatea zelula ez-neuronalena baino 1,55 eta 1,76 aldiz handiagoa izan zen AHNSC-en *in vitro* eragindako desberdintze prozesuko lehen 48 eta 96 orduetan.
- 2) PLC β 1-ak giza jatorrizko NT2 zelula lerroen ziklo zelularren zinetikan eragiten du.
 - a) PLC β 1 isoentzimaren siRNA bidezko espresio mailen isilpenak NT2 zelulen ziklo zelularra bizkortzen du.
 - i) BrdU metaketaren eta PH3 markaketaren analitik lortutako parametroek, PLC β 1-aren isilpenaren ondoriozko zikloaren bizkortzea gertatzen dela erakusten dute. PLC β 1-aren espresioaren isilpena jasotako NT2 zelulek 7,24 ordu gutxiago behar zuten ziklo osoa burutzeko.
 - ii) BrdU metaketaren eta PH3 markaketaren analitik lortutako parametroek, PLC β 1-aren isilpenaren ondoriozko ziklo zelularren areagotzea, batez ere G1 fasean gertatzen zela erakusten dute. PLC β 1-aren espresioaren isilpena jasotako NT2 zelulen G1 fasearen iraupena 5,07 ordu gutxiago zen.
 - b) PLC β 1-aren a edo b splicing aldaeren gainespresioak NT2 zelulen ziklo irteera eragiten du, eta horretan haien kokapen nuklearrak parte hartzen du.
 - i) PLC β 1a edo PLC β 1b gainespresatzean NT2 zeluletan Ki67 eta BrdU, proliferazio markatzaileen espresio mailen % 63 eta % 58-ko jaitsiera gertatzen da, hurrenez hurren.
 - ii) PLC β 1a edo PLC β 1b-ren kokapen nuklearreko mutanteak gainespresatzean, Ki67 eta BrdU, proliferazio markatzaileen espresio mailen % 40 eta % 30-ko jaitsiera gertatzen da

ONDORIOAK

- 3) PLC β 1-ak giza jatorrizko NT2 zelula lerroetatik eratorritako NT2N zelulen desberdintzapen neuronalean parte hartzen du.
 - a) PLC β 1-aren b eta batez ere a splicing aldaeren gainespresioak, desberdintzapen neuronalarekin bat datozen aldaketa morfologiko eta markatzaile neuronalen espresio mailen igoerak eragiten dituzte NT2 zeluletan, eta prozesu horretan haien kokapen nuklearrak parte hartzen du.
 - i) PLC β 1-aren b eta batez ere a splicing aldaeren gainespresioak, desberdintzapen neuronalarekin bat datozen projekzioen agerpenak eragiten dute NT2 zeluletan
 - ii) PLC β 1-aren a edo b aldaeren gainespresioak eragindako morfologia neuronaleko zeluletan, transfektatu gabeko edo plasmido utzhutsarekin transfektatutako zeluletan baino, β III tubulina eta NF200 markatzaile neuronalen espresio maila altuagoa zeukaten
 - iii) PLC β 1-aren a edo b aldaeren kokapen nuklearreko mutanteak (M2b) gainespresatzean, ordea, morfologia eta markatzaile neuronalaren espresioaren araberako, desberdintze neuronalera jotzen zuten zelulen proportzioa nabarmenki baxuagoa izan zen.
 - b) PLC β 1a/b-ren espresioa siRNA edo shRNA-ren bitartez isiltzean, NT2 zelulen AraC, antimitotikoren bidezko desberdintze neuronala oztopatzen da. siRNA edo shRNA bidezko PLC β 1-ren espresioaren isilpenak, AraC-k induzitutako NT2 zelulen desberdintzapen neuronala, % 36,98 eta % 36,57-tan gutxitzen du hurrenez hurren.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Berridge MJ. Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem J* [Internet]. 1983 Jun 15;212(3):849 LP – 858. Available from: <http://www.biochemj.org/content/212/3/849.abstract>
2. Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* (80-). 1984;225(4668):1365–70.
3. Payraastre B, Nievers M, Boonstra J, Breton M, Verkleij AJ, Van Bergen en Henegouwen PM. A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J Biol Chem* [Internet]. 1992 Mar 15;267(8):5078–84. Available from: <http://www.jbc.org/content/267/8/5078.abstract>
4. Garcia-Bustos JF, Marini F, Stevenson I, Frei C, Hall MN. PIK1, an essential phosphatidylinositol 4-kinase associated with the yeast nucleus. *EMBO J* [Internet]. 1994 May 1;13(10):2352–61. Available from: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06519.x>
5. Neri LM. Lipid signaling and cell responses at the nuclear level. *Histol Histopathol*. 1999;14(1):321–35.
6. D'Santos C, Clarke JH, Roefs M, Halstead JR, Divecha N. Nuclear inositides. *Eur J Histochem*. 2000;44(1):51–60.
7. Hofmann SL, Majerus PW. Modulation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity by phospholipid interactions, diglycerides, and calcium ions. *J Biol Chem* [Internet]. 1982 Dec 10;257(23):14359–64. Available from: <http://www.jbc.org/content/257/23/14359.short>
8. Ryu SH, Cho KS, Lee KY, Suh P-G, Rhee SG. 2 FORMS OF PHOSPHATIDYLINOSITOL-SPECIFIC PHOSPHOLIPASE-C FROM BOVINE BRAIN. Available from: <https://scholarworks.unist.ac.kr/handle/201301/16438>
9. Ryu SH, Cho KS, Lee KY, Suh PG, Rhee SG. Purification and characterization of two immunologically distinct phosphoinositide-specific

BIBLIOGRAFIA

- phospholipases C from bovine brain. *J Biol Chem* [Internet]. 1987 Sep 15;262(26):12511–8. Available from:
<http://www.jbc.org/content/262/26/12511.abstract>
10. Ryu SH, Suh PG, Cho KS, Lee KY, Rhee SG. Bovine brain cytosol contains three immunologically distinct forms of inositolphospholipid-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1987 Oct 1;84(19):6649 LP – 6653. Available from: <http://www.pnas.org/content/84/19/6649.abstract>
 11. Takenawa T, Nagai Y. Purification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from rat liver. *J Biol Chem* [Internet]. 1981 Jul 10;256(13):6769–75. Available from:
<http://www.jbc.org/content/256/13/6769.short>
 12. Song C, Hu C-D, Masago M, Kariya K, Yamawaki-Kataoka Y, Shibatohe M, et al. Regulation of a Novel Human Phospholipase C, PLC ϵ , through Membrane Targeting by Ras. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Jan 26;276(4):2752–7. Available from:
<http://www.jbc.org/content/276/4/2752.abstract>
 13. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, et al. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* [Internet]. 2002 Aug 1;129(15):3533 LP – 3544. Available from: <http://dev.biologists.org/content/129/15/3533.abstract>
 14. Hwang J-I, Oh Y-S, Shin K-J, Kim H, Ryu SH, Suh P-G. Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta. *Biochem J* [Internet]. 2005 Jul 1;389(Pt 1):181–6. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702972>
 15. Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* (80-) [Internet]. 1989 May 5;244(4904):546 LP – 550. Available from:
<http://science.sciencemag.org/content/244/4904/546.abstract>
 16. Rhee SG, Bae YS. Regulation of Phosphoinositide-specific Phospholipase C Isozymes. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Jun 13;272(24):15045–8. Available

- from: <http://www.jbc.org/content/272/24/15045.short>
17. Lyon AM, Dutta S, Boguth CA, Skiniotis G, Tesmer JJG. Full-length $G\alpha_q$ -phospholipase C- $\beta 3$ structure reveals interfaces of the C-terminal coiled-coil domain. *Nat Struct & Mol Biol* [Internet]. 2013 Feb 3;20:355. Available from: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2497>
 18. Rebecchi MJ, Scarlata S. PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAINS: A Common Fold with Diverse Functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* [Internet]. 1998 Jun 1;27(1):503–28. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.503>
 19. Tall E, Dormán G, Garcia P, Runnels L, Shah S, Chen J, et al. Phosphoinositide Binding Specificity among Phospholipase C Isozymes as Determined by Photo-Cross-Linking to Novel Substrate and Product Analogs. *Biochemistry* [Internet]. 1997 Jun 1;36(23):7239–48. Available from: <https://doi.org/10.1021/bi9702288>
 20. Wang T, Pentylala S, Rebecchi MJ, Scarlata S. Differential Association of the Pleckstrin Homology Domains of Phospholipases C- $\beta 1$, C- $\beta 2$, and C- $\delta 1$ with Lipid Bilayers and the $\beta\gamma$ Subunits of Heterotrimeric G Proteins. *Biochemistry* [Internet]. 1999 Feb 1;38(5):1517–24. Available from: <https://doi.org/10.1021/bi982008f>
 21. Jezyk MR, Snyder JT, Gershberg S, Worthylake DK, Harden TK, Sondek J. Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C- $\beta 2$. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2006;13(12):1135–40. Available from: <https://doi.org/10.1038/nsmb1175>
 22. Hicks SN, Jezyk MR, Gershburt S, Seifert JP, Harden TK, Sondek J. General and Versatile Autoinhibition of PLC Isozymes. *Mol Cell* [Internet]. 2008 Aug 8 [cited 2019 Sep 12];31(3):383–94. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276508004632?via%3Dihub>
 23. Waldo GL, Ricks TK, Hicks SN, Cheever ML, Kawano T, Tsuboi K, et al. Kinetic Scaffolding Mediated by a Phospholipase C- β and G_q Signaling

BIBLIOGRAFIA

- Complex. Science (80-) [Internet]. 2010 Nov 12;330(6006):974 LP – 980. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/330/6006/974.abstract>
24. Lyon AM, Tesmer VM, Dhamsania VD, Thal DM, Gutierrez J, Chowdhury S, et al. An autoinhibitory helix in the C-terminal region of phospholipase C- β mediates G α_q activation. *Nat Struct & Mol Biol* [Internet]. 2011 Aug 7;18:999. Available from: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2095>
 25. Kawasaki K, Kretsinger R. Calcium-binding protein. 1:EF-hands. *Protein Profile*. 1994;1 (4):343–517.
 26. Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Sci* [Internet]. 1996 Dec 1;5(12):2375–90. Available from: <https://doi.org/10.1002/pro.5560051201>
 27. Essen L-O, Perisic O, Cheung R, Katan M, Williams RL. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C δ . *Nature* [Internet]. 1996;380(6575):595–602. Available from: <https://doi.org/10.1038/380595a0>
 28. Harden TK, Sondek J. REGULATION OF PHOSPHOLIPASE C ISOZYMES BY RAS SUPERFAMILY GTPASES. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2006 Jan 10;46(1):355–79. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141223>
 29. Wierenga RK. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett* [Internet]. 2001 Mar 16;492(3):193–8. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02236-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02236-0)
 30. ELLIS M V, CARNE A, KATAN M. Structural requirements of phosphatidylinositol-specific phospholipase C δ 1 for enzyme activity. *Eur J Biochem* [Internet]. 1993 Apr 1;213(1):339–47. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17767.x>
 31. SCHNABEL P, CAMPS M. Activation of a phospholipase C β 2 deletion mutant by limited proteolysis. *Biochem J* [Internet]. 1998 Feb 15;330(1):461 LP – 468. Available from: <http://www.biochemj.org/content/330/1/461.abstract>

32. Fernald AW, Jones GA, Carpenter G. Limited proteolysis of phospholipase C- γ 1 indicates stable association of X and Y domains with enhanced catalytic activity. *Biochem J* [Internet]. 1994 Sep 1;302(2):503 LP – 509. Available from: <http://www.biochemj.org/content/302/2/503.abstract>
33. Kurokawa M, Yoon SY, Alfandari D, Fukami K, Sato K ichi, Fissore RA. Proteolytic processing of phospholipase C ζ and [Ca²⁺]_i oscillations during mammalian fertilization. *Dev Biol* [Internet]. 2007 Dec 1 [cited 2019 Sep 13];312(1):407–18. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160607013929?via%3Dihub>
34. Zhang W, Neer EJ. Reassembly of Phospholipase C- β 2 from Separated Domains: ANALYSIS OF BASAL AND G PROTEIN-STIMULATED ACTIVITIES. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Jan 26;276(4):2503–8. Available from: <http://www.jbc.org/content/276/4/2503.abstract>
35. Horstman DA, DeStefano K, Carpenter G. Enhanced phospholipase C- γ 1 activity produced by association of independently expressed X and Y domain polypeptides. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1996 Jul 23 [cited 2019 Sep 13];93(15):7518–21. Available from: <https://www.pnas.org/content/93/15/7518>
36. Lee SB, Shin SH, Hepler JR, Gilman AG, Rhee SG. Activation of phospholipase C- β 2 mutants by G protein α q and β gamma subunits. *J Biol Chem* [Internet]. 1993 Dec 5;268(34):25952–7. Available from: <http://www.jbc.org/content/268/34/25952.abstract>
37. Park D, Jhon DY, Lee CW, Ryu SH, Rhee SG. Removal of the carboxyl-terminal region of phospholipase C- β 1 by calpain abolishes activation by G α q. *J Biol Chem* [Internet]. 1993 Feb 15;268(5):3710–4. Available from: <http://www.jbc.org/content/268/5/3710.abstract>
38. SCHNABEL P, CAMPS M, CAROZZI A, PARKER PJ, GIERSCHIK P. Mutational analysis of phospholipase C- β 2. *Eur J Biochem* [Internet]. 1993 Nov 1;217(3):1109–15. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1432->

BIBLIOGRAFIA

1033.1993.tb18343.x

39. Kim CG, Park D, Rhee SG. The Role of Carboxyl-terminal Basic Amino Acids in Gq α -dependent Activation, Particulate Association, and Nuclear Localization of Phospholipase C- β 1. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Aug 30;271(35):21187–92. Available from: <http://www.jbc.org/content/271/35/21187.abstract>
40. Jenco JM, Becker KP, Morris AJ. Membrane-binding properties of phospholipase C-beta1 and phospholipaseC-beta2: role of the C-terminus and effects of polyphosphoinositides, G-proteins and Ca²⁺. *Biochem J* [Internet]. 1997 Oct 15;327 (Pt 2(Pt 2):431–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9359412>
41. Adjobo-Hermans MJW, Crosby KC, Putyrski M, Bhageloe A, van Weeren L, Schultz C, et al. PLC β isoforms differ in their subcellular location and their CT-domain dependent interaction with G α q. *Cell Signal* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2019 Sep 13];25(1):255–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656812002641?via%3Dihub>
42. Adjobo-Hermans MJW, Goedhart J, Gadella TWJ. Regulation of PLC β 1a membrane anchoring by its substrate phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. *J Cell Sci* [Internet]. 2008 Nov 15;121(22):3770 LP – 3777. Available from: <http://jcs.biologists.org/content/121/22/3770.abstract>
43. Illenberger D, Walliser C, Nürnberg B, Lorente MD, Gierschik P. Specificity and Structural Requirements of Phospholipase C- β Stimulation by Rho GTPases Versus G Protein $\beta\gamma$ Dimers. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Jan 31;278(5):3006–14. Available from: <http://www.jbc.org/content/278/5/3006.abstract>
44. Wu D, Jiang H, Katz A, Simon MI. Identification of critical regions on phospholipase C-beta 1 required for activation by G-proteins. *J Biol Chem* [Internet]. 1993 Feb 15;268(5):3704–9. Available from: <http://www.jbc.org/content/268/5/3704.abstract>

45. CAMPS M, HOU C, SIDIROPOULOS D, STOCK JB, JAKOBS KH, GIERSCHIK P. Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein $\beta\gamma$ subunits. *Eur J Biochem* [Internet]. 1992 Jun 1;206(3):821–31. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16990.x>
46. Katz A, Wu D, Simon MI. Subunits $\beta\gamma$ of heterotrimeric G protein activate $\beta 2$ isoform of phospholipase C. *Nature* [Internet]. 1992;360(6405):686–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/360686a0>
47. Wu D, Katz A, Simon MI. Activation of phospholipase C beta 2 by the alpha and beta gamma subunits of trimeric GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1993 Jun 1;90(11):5297–301. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8389480>
48. Wu Y-L, Pei G, Fan G-H. Inhibition of phospholipase C blocks opioid receptor-mediated activation of G_i proteins. *Neuroreport* [Internet]. 1998;9(1). Available from: https://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/1998/01050/Inhibition_of_phospholipase_C_blocks_opioid.20.aspx
49. Camps M, Hou CF, Jakobs KH, Gierschik P. Guanosine 5'-[γ-thio]triphosphate-stimulated hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in HL-60 granulocytes. Evidence that the guanine nucleotide acts by relieving phospholipase C from an inhibitory constraint. *Biochem J* [Internet]. 1990 Nov 1;271(3):743 LP – 748. Available from: <http://www.biochemj.org/content/271/3/743.abstract>
50. Illenberger D, Schwald F, Gierschik P. Characterization and Purification from Bovine Neutrophils of a Soluble Guanine-Nucleotide-Binding Protein that Mediates Isozyme-Specific Stimulation of Phospholipase C $\beta 2$. *Eur J Biochem* [Internet]. 1997 May 1;246(1):71–7. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00071.x>
51. Illenberger D, Stephan I, Gierschik P, Schwald F. Stimulation of phospholipase C- $\beta 2$ by Rho GTPases. *Methods Enzymol* [Internet]. 1998 Jan 1 [cited 2019 Sep 19];325:167–77. Available from:

BIBLIOGRAFIA

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687900254414?via%3Dihub>
52. Cartier A, Parent A, Labrecque P, Laroche G, Parent J-L. WDR36 acts as a scaffold protein tethering a G-protein-coupled receptor, G α q and phospholipase C β in a signalling complex. *J Cell Sci* [Internet]. 2011 Oct 1;124(19):3292 LP – 3304. Available from: <http://jcs.biologists.org/content/124/19/3292.abstract>
53. Grubb DR, Iliades P, Cooley N, Yu YL, Luo J, Filtz TM, et al. Phospholipase C β 1b associates with a Shank3 complex at the cardiac sarcolemma. *FASEB J* [Internet]. 2011 Dec 9;25(3):1040–7. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.10-171470>
54. Grubb DR, Luo J, Yu YL, Woodcock EA. Scaffolding protein Homer 1c mediates hypertrophic responses downstream of Gq in cardiomyocytes. *FASEB J* [Internet]. 2012 Oct 19;26(2):596–603. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.11-190330>
55. Sun Z, Smrcka A V, Chen S. WDR26 Functions as a Scaffolding Protein to Promote G $\beta\gamma$ -mediated Phospholipase C β 2 (PLC β 2) Activation in Leukocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Jun 7;288(23):16715–25. Available from: <http://www.jbc.org/content/288/23/16715.abstract>
56. Suh PG, Ryu SH, Moon KH, Suh HW, Goo Rhee S. Cloning and sequence of multiple forms of phospholipase C. *Cell* [Internet]. 1988 Jul 15 [cited 2019 Sep 11];54(2):161–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286748890548X?via%3Dihub>
57. Bahk YY, Lee YH, Lee TG, Seo J, Ryu SH, Suh PG. Two forms of phospholipase C-beta 1 generated by alternative splicing. *J Biol Chem* [Internet]. 1994 Mar 18;269(11):8240–5. Available from: <http://www.jbc.org/content/269/11/8240.abstract>
58. 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*

- Mol Cell Biol Lipids. 2002;1584(1):46–54.
59. Robbins J, Dilwortht SM, Laskey RA, Dingwall C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* [Internet]. 1991 Feb 8 [cited 2019 Sep 27];64(3):615–23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749190245T?via%3Dihub>
60. Tang Y, Tang J, Chen Z, Trost C, Flockerzi V, Li M, et al. Association of Mammalian Trp4 and Phospholipase C Isozymes with a PDZ Domain-containing Protein, NHERF. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Dec 1;275(48):37559–64. Available from: <http://www.jbc.org/content/275/48/37559.abstract>
61. Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED. ProSAP/Shank proteins – a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem* [Internet]. 2002 Jun 1;81(5):903–10. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00931.x>
62. Grubb DR, Vasilevski O, Huynh H, Woodcock EA. The extreme C-terminal region of phospholipase C β 1 determines subcellular localization and function; the “b” splice variant mediates α 1-adrenergic receptor responses in cardiomyocytes. *FASEB J* [Internet]. 2008 Apr 7;22(8):2768–74. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.07-102558>
63. Smith CD, Wells WW. Phosphorylation of rat liver nuclear envelopes. I. Characterization of in vitro protein phosphorylation. *J Biol Chem*. 1983;258(15):9360–7.
64. Cocco L, Gilmour RS, Ognibene A, Letcher AJ, Manzoli FA, Irvine RF. Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem J* [Internet]. 1987 Dec 15;248(3):765 LP – 770. Available from: <http://www.biochemj.org/content/248/3/765.abstract>

BIBLIOGRAFIA

65. Mortillaro MJ, Blencowe BJ, Wei X, Nakayasu H, Du L, Warren SL, et al. A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Aug 6 [cited 2019 Oct 1];93(16):8253–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710856>
66. Spector DL, Fu X-D, Maniatis T. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J*. 1991;10(11):3467–81.
67. Iborra FJ, Pombo A, Jackson DA, Cook PR. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription “factories” in human nuclei. *J Cell Sci* [Internet]. 1996 Jun 1;109(6):1427 LP – 1436. Available from: <http://jcs.biologists.org/content/109/6/1427.abstract>
68. 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* [Internet]. 2001 Jul 1;114(13):2501 LP – 2511. Available from: <http://jcs.biologists.org/content/114/13/2501.abstract>
69. Divecha N, Banfić H, Irvine RF. The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase. *EMBO J* [Internet]. 1991 Nov 1;10(11):3207–14. Available from: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04883.x>
70. Billi AM, Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS, Weber G. Tiazofurin-induced changes in inositol lipid cycle in nuclei of friend erythroleukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1993 Aug 31 [cited 2019 Sep 19];195(1):8–12. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X83720012?via%3Dihub>
71. Santi P, Martelli AM, Gilmour RS, Falcieri E, Rana R, Cataldi A, et al. Changes in polyphosphoinositide levels in rat liver nuclei in response to prolactin, a known hepatic mitogen. *Cell Signal* [Internet]. 1992 Jul 1 [cited

- 2019 Sep 19];4(4):385–91. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0898656892900335?via%3Dihub>
72. Rana RA, Cataldi A, Di Pietro R, Mazzotti G, Centurione L, Robuffo I, et al. Evidence for an early and transient involvement of nuclear inositol lipids in subcellular signalling events related to DNA repair processes. *Cell Signal* [Internet]. 1994 May 1 [cited 2019 Sep 19];6(4):475–80. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0898656894900957?via%3Dihub>
73. Cataldi A, Miscia S, Lisio R, Rana R, Cocco L. Transient shift of diacylglycerol and inositol lipids induced by interferon in Daudi cells. *FEBS Lett* [Internet]. 1990 Sep 3;269(2):465–8. Available from:
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81216-B](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81216-B)
74. Cataldi A, Rana R, Bareggi R, Lisio R, Robuffo I, di Valerio V, et al. Evidence for nuclear phosphoinositidase C activity in the antiproliferative signals produced by interferon in Burkitt lymphoma cells. *Cytokine* [Internet]. 1993 May 1 [cited 2019 Sep 19];5(3):235–9. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/1043466693900103?via%3Dihub>
75. Cataldi A, Di Primio R, Lisio R, Alba Rana R, Robuffo I, Bosco D, et al. Inositol lipid-mediated intranuclear signalling: A comparative analysis of in vivo labelling in interferon alpha-sensitive and -resistant daudi lymphoma cells. *Cell Signal* [Internet]. 1993 May 1 [cited 2019 Sep 19];5(3):331–6. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/089865689390024G?via%3Dihub>
76. Martelli AM, Gilmour RS, Falcieri E, Manzoli FA, Cocco L. Mitogen-stimulated phosphorylation of nuclear proteins in Swiss 3T3 cells: Evidence for a protein kinase C requirement. *Exp Cell Res* [Internet]. 1989 Nov 1 [cited 2019 Sep 18];185(1):191–202. Available from:

BIBLIOGRAFIA

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0014482789900487?via%3Dihub>

77. Martelli AM, Neri LM, Gilmour RS, Barker RJ, Huskisson NS, Manzoli FA, et al. Temporal changes in intracellular distribution of protein kinase C in Swiss 3T3 cells during mitogenic stimulation with insulin-like growth factor I and bombesin: Translocation to the nucleus follows rapid changes in nuclear polyphosphoinositides. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1991 May 31 [cited 2019 Sep 19];177(1):480–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X91920099?via%3Dihub>
78. Neri LM, Borgatti P, Capitani S, Martelli AM. Nuclear Diacylglycerol Produced by Phosphoinositide-specific Phospholipase C Is Responsible for Nuclear Translocation of Protein Kinase C- α . *J Biol Chem* [Internet]. 1998 Nov 6;273(45):29738–44. Available from: <http://www.jbc.org/content/273/45/29738.abstract>
79. Martelli AM, Gilmour RS, Neri LM, Manzoli L, Corps AN, Cocco L. Mitogen-stimulated events in nuclei of Swiss 3T3 cells Evidence for a direct link between changes of inositol lipids, protein kinase C requirement and the onset of DNA synthesis. *FEBS Lett* [Internet]. 1991 Jun 3;283(2):243–6. Available from: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80598-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80598-W)
80. Délérís P, Bacqueville D, Gayral S, Carrez L, Salles J-P, Perret B, et al. SHIP-2 and PTEN Are Expressed and Active in Vascular Smooth Muscle Cell Nuclei, but Only SHIP-2 Is Associated with Nuclear Speckles. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Oct 3;278(40):38884–91. Available from: <http://www.jbc.org/content/278/40/38884.abstract>
81. Didichenko SA, Thelen M. Phosphatidylinositol 3-Kinase C2 α Contains a Nuclear Localization Sequence and Associates with Nuclear Speckles. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Dec 21;276(51):48135–42. Available from: <http://www.jbc.org/content/276/51/48135.abstract>
82. Tabellini G, Bortul R, Santi S, Riccio M, Baldini G, Cappellini A, et al.

- Diacylglycerol kinase- θ is localized in the speckle domains of the nucleus. *Exp Cell Res* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2019 Oct 1];287(1):143–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482703001150>
83. Divecha N, Rhee SG, Letcher AJ, Irvine RF. Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: phosphoinositidase C isoform beta 1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. *Biochem J* [Internet]. 1993 Feb 1;289 (Pt 3(Pt 3)):617–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8382043>
84. Marmiroli S, Ognibene A, Bavelloni A, Cinti C, Cocco L, Maraldi NM. Interleukin 1 alpha stimulates nuclear phospholipase C in human osteosarcoma SaOS-2 cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1994 Jan 7;269(1):13–6. Available from: <http://www.jbc.org/content/269/1/13.abstract>
85. Fee JA, Monsey JD, Handler RJ, Leonis MA, Mullaney SR, Hope HM, et al. A Chinese hamster fibroblast mutant defective in thrombin-induced signaling has a low level of phospholipase C-beta 1. *J Biol Chem* [Internet]. 1994 Aug 26;269(34):21699–708. Available from: <http://www.jbc.org/content/269/34/21699.abstract>
86. Liu M, Simon MI. Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C. *Nature* [Internet]. 1996;382(6586):83–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/382083a0>
87. Bertagnolo V, Marchisio M, Capitani S, Neri LM. Intranuclear Translocation of Phospholipase C β 2 during HL-60 Myeloid Differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1997 Jun 27 [cited 2019 Sep 20];235(3):831–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X97968935?via%3Dihub>
88. Cocco L, Rubbini S, Manzoli L, Billi AM, Faenza I, Peruzzi D, et al. Inositides in the nucleus: Presence and characterisation of the isozymes of phospholipase β family in NIH 3T3 cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell*

BIBLIOGRAFIA

- Biol Lipids [Internet]. 1999 May 18 [cited 2019 Sep 20];1438(2):295–9.
Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138819819900061X?via%3Dihub>
89. Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli L, Cocco L. Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C β in Swiss 3T3 cells. *Nature* [Internet]. 1992;358(6383):242–5. Available from:
<https://doi.org/10.1038/358242a0>
90. Bahk YY, Song H, Baek SH, Park BY, Kim H, Ryu SH, et al. Localization of two forms of phospholipase C- β 1, a and b, in C6Bu-1 cells. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* [Internet]. 1998 Jan 5 [cited 2019 Sep 16];1389(1):76–80. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005276097001288?via%3Dihub>
91. Faenza I, Matteucci A, Manzoli L, Billi AM, Aluigi M, Peruzzi D, et al. A Role for Nuclear Phospholipase C β 1 in Cell Cycle Control. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Sep 29;275(39):30520–4. Available from:
<http://www.jbc.org/content/275/39/30520.abstract>
92. Fiume R, Faenza I, Matteucci A, Astolfi A, Vitale M, Martelli AM, et al. Nuclear Phospholipase C β 1 (PLC β 1) Affects CD24 Expression in Murine Erythroleukemia Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Jun 24;280(25):24221–6. Available from: <http://www.jbc.org/content/280/25/24221.abstract>
93. Crljen V, Višnjić D, Banfić H. Presence of different phospholipase C isoforms in the nucleus and their activation during compensatory liver growth. *FEBS Lett* [Internet]. 2004 Jul 30 [cited 2019 Sep 27];571(1–3):35–42. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579304008014>
94. Xu A, Suh PG, Marmy-Conus N, Pearson RB, Seok OY, Cocco L, et al. Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2001 May;21(9):2981–90. Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287604>
95. 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* [Internet]. 2001 May 4;276(18):14980–6. Available from: <http://www.jbc.org/content/276/18/14980.abstract>
 96. O'Malley KL, Jong Y-JI, Gonchar Y, Burkhalter A, Romano C. Activation of Metabotropic Glutamate Receptor mGlu5 on Nuclear Membranes Mediates Intranuclear Ca²⁺ Changes in Heterologous Cell Types and Neurons. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Jul 25;278(30):28210–9. Available from: <http://www.jbc.org/content/278/30/28210.abstract>
 97. Kumar V, Jong Y-JI, O'Malley KL. Activated Nuclear Metabotropic Glutamate Receptor mGlu5 Couples to Nuclear Gq/11 Proteins to Generate Inositol 1,4,5-Trisphosphate-mediated Nuclear Ca²⁺ Release. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 May 16;283(20):14072–83. Available from: <http://www.jbc.org/content/283/20/14072.abstract>
 98. Bavelloni A, Faenza I, Cioffi G, Piazzini M, Parisi D, Matic I, et al. Proteomic-based analysis of nuclear signaling: PLC β 1 affects the expression of the splicing factor SRp20 in Friend erythroleukemia cells. *Proteomics* [Internet]. 2006 Nov 1;6(21):5725–34. Available from: <https://doi.org/10.1002/pmic.200600318>
 99. Fiume R, Ramazzotti G, Teti G, Chiarini F, Faenza I, Mazzotti G, et al. Involvement of nuclear PLC β 1 in lamin B1 phosphorylation and G2/M cell cycle progression. *FASEB J* [Internet]. 2009 Nov 21;23(3):957–66. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.08-121244>
 100. Kind P, Blakemore C, Fryer H, Hockfield S. Identification of Proteins Downregulated during the Postnatal Development of the Cat Visual Cortex. *Cereb Cortex* [Internet]. 1994 Jul 1;4(4):361–75. Available from: <https://doi.org/10.1093/cercor/4.4.361>
 101. Kind PC, Kelly GM, Fryer HJL, Blakemore C, Hockfield S. Phospholipase C-

BIBLIOGRAFIA

- β 1 Is Present in the Botrysome, an Intermediate Compartment-Like Organelle, and Is Regulated by Visual Experience in Cat Visual Cortex. *J Neurosci* [Internet]. 1997 Feb 15;17(4):1471 LP – 1480. Available from: <http://www.jneurosci.org/content/17/4/1471.abstract>
102. Watanabe M, Nakamura M, Sato K, Kano M, Simon MI, Inoue Y. Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase C β in mouse brain. *Eur J Neurosci* [Internet]. 1998 Jun 1;10(6):2016–25. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00213.x>
103. Caricasole A, Sala C, Roncarati R, Formenti E, Terstappen GC. Cloning and characterization of the human phosphoinositide-specific phospholipase C-beta 1 (PLC β 1). *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* [Internet]. 2000 Dec 15 [cited 2019 Sep 16];1517(1):63–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167478100002608?via%3Dihub>
104. Ruiz de Azúa I, del Olmo E, Pazos A, Sallés J. Transmembrane signaling through phospholipase C- β in the developing human prefrontal cortex. *J Neurosci Res* [Internet]. 2006 Jul 1;84(1):13–26. Available from: <https://doi.org/10.1002/jnr.20858>
105. 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* [Internet]. 2003 Jun 1;195(3):446–52. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.10264>
106. Faenza I, Bavelloni A, Fiume R, Santi P, Martelli AM, Maria Billi A, et al. Expression of phospholipase C beta family isoenzymes in C2C12 myoblasts during terminal differentiation. *J Cell Physiol* [Internet]. 2004 Aug 1;200(2):291–6. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.20001>
107. O'Carroll SJ, Mitchell MD, Faenza I, Cocco L, Gilmour RS. Nuclear PLC Beta 1 is required for 3T3-L1 adipocyte differentiation and regulates expression of the cyclin D3–cdk4 complex. *Cell Signal* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2019 Sep 30];21(6):926–35. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089865680900062X?via%3Dihub>
108. Garwain O, Scarlata S. Phospholipase C β -TRAX Association Is Required for PC12 Cell Differentiation. *J Biol Chem* [Internet]. 2016 Oct 28;291(44):22970–6. Available from: <http://www.jbc.org/content/291/44/22970.abstract>
 109. Garwain O, Valla K, Scarlata S. Phospholipase C β 1 regulates proliferation of neuronal cells. *FASEB J* [Internet]. 2018 Jan 12;32(5):2891–8. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.201701284R>
 110. Garwain O, Pearce KM, Jackson L, Carley S, Rosati B, Scarlata S. Stimulation of the G α q/phospholipase C β 1 signaling pathway returns differentiated cells to a stem-like state. *FASEB J* [Internet]. 2020 Sep 1;34(9):12663–76. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.201902668R>
 111. Blomen VA, Boonstra J. Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(23):3084–104.
 112. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians* [Internet]. 1995;107(2):181—186. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/8624851>
 113. Johnson DG, Walker CL. CYCLINS AND CELL CYCLE CHECKPOINTS. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 1999 Apr 1;39(1):295–312. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.295>
 114. Lolli G, Johnson LN. CAK—Cyclin-Dependent Activating Kinase: A Key Kinase in Cell Cycle Control and a Target for Drugs? *Cell Cycle* [Internet]. 2005 Apr 28;4(4):565–70. Available from: <https://doi.org/10.4161/cc.4.4.1607>
 115. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol*. 2014;15(6):122.
 116. Lees E. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7(6):773–80.
 117. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995;374(6518):131–4.

BIBLIOGRAFIA

118. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1994;14(3):2066–76.
119. King RW, Deshaies RJ, Peters J-M, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* (80-). 1996;274(5293):1652–9.
120. Udvardy A. The role of controlled proteolysis in cell-cycle regulation. In: *EJB Reviews 1996*. Springer; 1996. p. 195–201.
121. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* [Internet]. 1994 Nov 18 [cited 2019 Sep 26];79(4):551–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867494905401>
122. Ekholm S V, Reed SI. Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(6):676–84.
123. Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* [Internet]. 2005;24(17):2796–809. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208619>
124. Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol.* 1998;18(2):753–61.
125. Julian LM, Blais A. Transcriptional control of stem cell fate by E2Fs and pocket proteins. *Front Genet.* 2015;6:161.
126. Blagosklonny M V, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell cycle.* 2002;1(2):102–9.
127. Blagosklonny MV, AB P. The Restriction Point of the Cell Cycle [Internet]. *Madame Curie Bioscience Database*. Austin (TX); 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6318/>
128. Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin Jr WG, Livingston DM. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell.* 1994;78(1):161–72.

129. Xu M, Sheppard K-A, Peng C-Y, Yee AS, Piwnica-Worms H. Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1994;14(12):8420–31.
130. Yam CH, Fung TK, Poon RYC. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci C.* 2002;59(8):1317–26.
131. Lindqvist A, Rodríguez-Bravo V, Medema RH. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol.* 2009;185(2):193–202.
132. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol cell Biol.* 2001;2(1):21–32.
133. Gavet O, Pines J. Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol.* 2010;189(2):247–59.
134. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999;13(12):1501–12.
135. York JD, Majerus PW. Nuclear phosphatidylinositols decrease during S-phase of the cell cycle in HeLa cells. *J Biol Chem [Internet].* 1994 Mar 18;269(11):7847–50. Available from: <http://www.jbc.org/content/269/11/7847.abstract>
136. 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 [Internet].* 1992 Mar 1;111(3):283–6. Available from: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123750>
137. Lukinovic-Škudar V, Đonlagić L, Banfić H, Višnjic D. Nuclear phospholipase C-β1b activation during G2/M and late G1 phase in nocodazole-synchronized HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids [Internet].* 2005 Apr 15 [cited 2019 Oct 2];1733(2–3):148–56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198104002240>
138. Albi E, Rossi G, Maraldi NM, Magni MV, Cataldi S, Solimando L, et al.

BIBLIOGRAFIA

- Involvement of nuclear phosphatidylinositol-dependent phospholipases c in cell cycle progression during rat liver regeneration. *J Cell Physiol* [Internet]. 2003 Nov 1;197(2):181–8. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.10292>
139. Banfić H, Žižak M, Divecha N, Irvine RF. Nuclear diacylglycerol is increased during cell proliferation in vivo. *Biochem J*. 1993;290(3):633–6.
140. Sun B, Murray NR, Fields AP. A Role for Nuclear Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C in the G2/M Phase Transition. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Oct 17;272(42):26313–7. Available from: <http://www.jbc.org/content/272/42/26313.abstract>
141. Thompson LJ, Fields AP. β II Protein Kinase C Is Required for the G2/M Phase Transition of Cell Cycle. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Jun 21;271(25):15045–53. Available from: <http://www.jbc.org/content/271/25/15045.abstract>
142. 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* [Internet]. 1998 Nov 15;58(22):5057 LP – 5060. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/58/22/5057.abstract>
143. von Kolliker A. Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Thiere. Leipzig. 1885 *Histologische Studien an Batrachierlarven*. *Zeit. wiss. Zool.*, Bd. 43. 1892 *Ueber die Entwicklung der Elements des Nervensystems, contra Beard und Dohrn*. *Anat Anz*, Bd. 1879;7.
144. Koelliker A. *Embryologie ou Traité complet du développement de l'Homme et des Animaux supérieurs* (trad. A. Schneider). Paris; 1882.
145. Bentivoglio M, Mazzarello P. The history of radial glia. *Brain Res Bull*. 1999;49(5):305–15.
146. Rakic P. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res*. 1971;33(2):471–6.
147. Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey

- neocortex. *J Comp Neurol.* 1972;145(1):61–83.
148. Rakic P. Specification of cerebral cortical areas. *Science* (80-). 1988;241(4862):170–6.
149. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature.* 2001;409(6821):714–20.
150. Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 2004;7(2):136–44.
151. Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2008;508(1):28–44.
152. deazevedo LC, Fallet C, Moura-Neto V, Daumas- Duport C, Hedin- Pereira C, Lent R. Cortical radial glial cells in human fetuses: depth-correlated transformation into astrocytes. *J Neurobiol.* 2003;55(3):288–98.
153. Rakic P, Sidman RL. Supravital DNA synthesis in the developing human and mouse brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1968;27(2):240–76.
154. Sidman RL, Rakic P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* 1973;62(1):1–35.
155. Smart IHM, Dehay C, Giroud P, Berland M, Kennedy H. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb cortex.* 2002;12(1):37–53.
156. Zecevic N, Chen Y, Filipovic R. Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 2005;491(2):109–22.
157. Zhao C, Teng EM, Summers RG, Ming GL, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus.

BIBLIOGRAFIA

- J Neurosci. 2006;26(1):3–11.
158. Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. In Vivo Fate Analysis Reveals the Multipotent and Self-Renewal Capacities of *Sox2*⁺ Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2007 Nov 15;1(5):515–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.09.002>
 159. Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park J-H, Tordo J, Peterson DA, et al. Division-Coupled Astrocytic Differentiation and Age-Related Depletion of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2011 May 6;8(5):566–79. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
 160. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the Long Run: Maintaining Germinal Niches in the Adult Brain. *Neuron* [Internet]. 2004;41(5):683–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627304001114>
 161. Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo J-M, Alvarez-Buylla A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*. 2002;36(6):1021–34.
 162. Urbach A, Witte OW. Divide or Commit – Revisiting the Role of Cell Cycle Regulators in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7(April):1–22.
 163. Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2019;25(4):554–60.
 164. Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Götz M, et al. Quiescent and Active Hippocampal Neural Stem Cells with Distinct Morphologies Respond Selectively to Physiological and Pathological Stimuli and Aging. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2010 May 7;6(5):445–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.017>

165. Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, et al. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* [Internet]. 2008;11(8):901–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/nn.2156>
166. Mongiat LA, Espósito MS, Lombardi G, Schinder AF. Reliable Activation of Immature Neurons in the Adult Hippocampus. Reh TA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009 Apr 28 [cited 2021 Jan 9];4(4):e5320. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0005320>
167. Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci*. 1995;15(9):6046–57.
168. Calegari F, Haubensak W, Haffner C, Huttner WB. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J Neurosci*. 2005;25(28):6533–8.
169. Kim D, Jun KS, Lee SB, Kang N-G, Min DS, Kim Y-H, et al. Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* [Internet]. 1997;389(6648):290–3. Available from: <https://doi.org/10.1038/38508>
170. 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* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2019 Sep 30];21(4):584–601. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044743102911991>
171. Hannan AJ, Blakemore C, Katsnelson A, Vitalis T, Huber KM, Bear M, et al. PLC- β 1, activated via mGluRs, mediates activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nat Neurosci* [Internet]. 2001;4(3):282–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/85132>
172. Spires TL, Molnár Z, Kind PC, Cordery PM, Upton AL, Blakemore C, et al. Activity-dependent Regulation of Synapse and Dendritic Spine Morphology in

BIBLIOGRAFIA

- Developing Barrel Cortex Requires Phospholipase C- β 1 Signalling. *Cereb Cortex* [Internet]. 2004 Aug 5;15(4):385–93. Available from: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh141>
173. Koh H-Y, Kim D, Lee J, Lee S, Shin H-S. Deficits in social behavior and sensorimotor gating in mice lacking phospholipase C β 1. *Genes, Brain Behav* [Internet]. 2008 Feb 1;7(1):120–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00351.x>
174. McOmish CE, Burrows E, Howard M, Scarr E, Kim D, Shin H-S, et al. Phospholipase C- β 1 knockout mice exhibit endophenotypes modeling schizophrenia which are rescued by environmental enrichment and clozapine administration. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2008;13(7):661–72. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002046>
175. McOmish CE, Burrows EL, Howard M, Hannan AJ. PLC- β 1 knockout mice as a model of disrupted cortical development and plasticity: Behavioral endophenotypes and dysregulation of RGS4 gene expression. *Hippocampus* [Internet]. 2008 Aug 1;18(8):824–34. Available from: <https://doi.org/10.1002/hipo.20443>
176. Kurian MA, Meyer E, Vassallo G, Morgan N V, Prakash N, Pasha S, et al. Phospholipase C beta 1 deficiency is associated with early-onset epileptic encephalopathy. *Brain* [Internet]. 2010 Sep 9;133(10):2964–70. Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awq238>
177. Udawela M, Scarr E, Hannan AJ, Thomas EA, Dean B. Phospholipase C Beta 1 Expression in the Dorsolateral Prefrontal Cortex from Patients with Schizophrenia at Different Stages of Illness. *Aust New Zeal J Psychiatry* [Internet]. 2011 Feb 1;45(2):140–7. Available from: <https://doi.org/10.3109/00048674.2010.533364>
178. Lo Vasco VR, Cardinale G, Polonia P. Deletion of PLCB1 gene in schizophrenia-affected patients. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2012 Apr;16(4):844–51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507702>

179. Rebecchi MJ, Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1291–335.
180. García Del Caño G, Aretxabala X, González-Burguera I, Montaña M, López De Jesús M, Barrondo S, et al. Nuclear diacylglycerol lipase- α in rat brain cortical neurons: Evidence of 2-arachidonoylglycerol production in concert with phospholipase C- β activity. *J Neurochem*. 2015;132(5):489–503.
181. Faenza I, Ramazzotti G, Bavelloni A, Fiume R, Gaboardi GC, Follo MY, et al. Inositide-Dependent Phospholipase C Signaling Mimics Insulin in Skeletal Muscle Differentiation by Affecting Specific Regions of the Cyclin D3 Promoter. *Endocrinology* [Internet]. 2007 Mar 1;148(3):1108–17. Available from: <https://doi.org/10.1210/en.2006-1003>
182. Ramazzotti G, Faenza I, Gaboardi GC, Piazzini 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* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2019 Sep 27];20(11):2013–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656808002179>
183. Bortul R, Aluigi M, Tazzari PL, Tabellini G, Baldini G, Bareggi R, et al. Phosphoinositide-specific phospholipase C β 1 expression is not linked to nerve growth factor-induced differentiation, cell survival or cell cycle control in PC12 rat pheocromocytoma cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2002 Jan 1;84(1):56–67. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcb.1266>
184. Jaendling A, McFarlane RJ. Biological roles of translin and translin-associated factor-X: RNA metabolism comes to the fore. *Biochem J* [Internet]. 2010 Jul 15;429(2):225 LP – 234. Available from: <http://www.biochemj.org/content/429/2/225.abstract>
185. Liu Y, Ye X, Jiang F, Liang C, Chen D, Peng J, et al. C3PO, an Endoribonuclease That Promotes RNAi by Facilitating RISC Activation. *Science* (80-) [Internet]. 2009 Aug 7;325(5941):750 LP – 753. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/325/5941/750.abstract>

BIBLIOGRAFIA

186. Scarlata S, Garwain O, Williams L, Burguera IG, Rosati B, Sahu S, et al. Phospholipase C β connects G protein signaling with RNA interference. *Adv Biol Regul* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2019 Sep 28];61:51–7. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212492615300257?via%3Dihub>
187. Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. In: *Human tumor cells in vitro*. Springer; 1975. p. 115–59.
188. Andrews PW. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol* [Internet]. 1984 Jun 1 [cited 2019 Oct 3];103(2):285–93. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160684903166>
189. Pleasure SJ, Page C, Lee VM. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci* [Internet]. 1992 May 1;12(5):1802 LP – 1815. Available from:
<http://www.jneurosci.org/content/12/5/1802.abstract>
190. González-Burguera I, Ricobaraza A, Aretxabala X, Barrondo S, García del Caño G, López de Jesús M, et al. 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* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2019 Oct 3];16(2):541–51. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506116000805?via%3Dihub>
191. Lee VM, Andrews PW. Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins. *J Neurosci* [Internet]. 1986 Feb 1;6(2):514 LP – 521. Available from:
<http://www.jneurosci.org/content/6/2/514.abstract>
192. Pleasure SJ, Lee VM-Y. NTera 2 Cells: A human cell line which displays

- characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J Neurosci Res* [Internet]. 1993 Aug 15;35(6):585–602. Available from: <https://doi.org/10.1002/jnr.490350603>
193. Novak JE, Agranoff BW, Fisher SK. Increased Expression of Gαq/11 and of Phospholipase-Cβ1/4 in Differentiated Human NT2-N Neurons. *J Neurochem* [Internet]. 2000 Jun 6;74(6):2322–30. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0742322.x>
194. Gonzalez-Burguera I. 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 β1 in Differentiation. *Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)*; 2015.
195. 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 β1 in rat brain. *Neuroscience* [Internet]. 2012;222:239–68. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452212006574>
196. Lamond AI, Spector DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2003;4(8):605–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm1172>
197. Babu H, Claasen JH, Kannan S, Rünker AE, Palmer T, Kempermann G. A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Front Neurosci*. 2011;5(JUL):1–10.
198. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol*. 1989;18(3):311–8.
199. Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J Neurosci*. 1993;13(2):820–33.

BIBLIOGRAFIA

200. Ruiz S, Panopoulos AD, Herrerías A, Bissig KD, Lutz M, Berggren WT, et al. A high proliferation rate is required for cell reprogramming and maintenance of human embryonic stem cell identity. *Curr Biol*. 2011;21(1):45–52.
201. Fluckiger A-C, Marcy G, Marchand M, Négre D, Cosset F-L, Mitalipov S, et al. Cell Cycle Features of Primate Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 2006;24(3):547–56.
202. Lukaszewicz A, Savatier P, Cortay V, Giroud P, Huissoud C, Berland M, et al. G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. *Neuron*. 2005;47(3):353–64.
203. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 1997;106(6):348–60.
204. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem [Internet]*. 2009 Apr 1;55(4):611–22. Available from: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
205. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods [Internet]*. 2001 Dec 1 [cited 2020 May 4];25(4):402–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629>
206. Donega V, Marcy G, Lo Giudice Q, Zweifel S, Angonin D, Fiorelli R, et al. Transcriptional Dysregulation in Postnatal Glutamatergic Progenitors Contributes to Closure of the Cortical Neurogenic Period. *Cell Rep [Internet]*. 2018;22(10):2567–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.030>
207. Kanzari A, Bourcier-Lucas C, Freysson A, Abrous DN, Haddjeri N, Lucas G. Inducing a long-term potentiation in the dentate gyrus is sufficient to produce rapid antidepressant-like effects. *Mol Psychiatry [Internet]*. 2018;23(3):587–

96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2017.94>
208. Kerloch T, Clavreul S, Goron A, Abrous DN, Pacary E. Dentate Granule Neurons Generated during Perinatal Life Display Distinct Morphological Features Compared with Later-Born Neurons in the Mouse Hippocampus. *Cereb Cortex*. 2019;29(8):3527–39.
209. Deroche-Gamonet V, Revest JM, Fiancette JF, Balado E, Koehl M, Grosjean N, et al. Depleting adult dentate gyrus neurogenesis increases cocaine-seeking behavior. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2019;24(2):312–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41380-018-0038-0>
210. Montaron MF, Charrier V, Blin N, Garcia P, Abrous DN. Responsiveness of dentate neurons generated throughout adult life is associated with resilience to cognitive aging. *Aging Cell*. 2020;(April):1–12.
211. Billi AM, Matteucci A, Faenza I, Manzoli L, Rubbini S, Gilmour RS, et al. Control of Expression of PLC β 1 by LAC Repressor System: Relationship between Nuclear PLC β 1 Overexpression and Growth Factor Stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1997 Dec 8 [cited 2019 Oct 2];241(1):122–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X97977780?via%3Dihub>
212. Ormerod MG. Analysis of cell proliferation using the bromodeoxyuridine/Hoechst-ethidium bromide method. *Methods Mol Biol*. 1997;75(5):357–65.
213. Satoh J, Kim SU. Proliferation and differentiation of fetal human oligodendrocytes in culture. *J Neurosci Res*. 1994;39(3):260–72.
214. Sun X, Hu X, Wang D, Yuan Y, Qin S, Tan Z, et al. Establishment and characterization of primary astrocyte culture from adult mouse brain. *Brain Res Bull* [Internet]. 2017;132(May):10–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.05.002>
215. Arai Y, Pulvers JN, Haffner C, Schilling B, Nüsslein I, Calegari F, et al.

BIBLIOGRAFIA

- Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun.* 2011;2(1).
216. Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, et al. Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. *Cancer Res.* 2017;77(10):2722–34.
217. Filipczyk AA, Laslett AL, Mummery C, Pera MF. Differentiation is coupled to changes in the cell cycle regulatory apparatus of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res [Internet]*. 2007;1(1):45–60. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506107000062>
218. Lange C, Calegari F. Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle [Internet]*. 2010 May 15;9(10):1893–900. Available from: <https://doi.org/10.4161/cc.9.10.11598>
219. Kranenburg O, Scharnhorst V, Van der Eb AJ, Zantema A. Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol [Internet]*. 1995 Oct 1;131(1):227–34. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.131.1.227>
220. Friedman EA, Schildkraut CL, Skoultchi AI. Lengthening of the G1 phase is not strictly correlated with differentiation in Friend erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 1978 Aug 19 [cited 2020 Oct 1];75(8):3813–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/278993>
221. Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: A comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol Teratol.* 2004;26(3):397–406.
222. Hardwick LJA, Philpott A. Nervous decision-making: To divide or differentiate. *Trends Genet [Internet]*. 2014;30(6):254–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2014.04.001>
223. Przyborski SA, Morton IE, Wood A, Andrews PW. Developmental regulation

- of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2000 Oct 1;12(10):3521–8. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00230.x>
224. Roccio M, Schmitter D, Knobloch M, Okawa Y, Sage D, Lutolf MP. Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Dev*. 2013;140(2):459–70.
225. Coronado D, Godet M, Bourillot P-Y, Tapponnier Y, Bernat A, Petit M, et al. A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2020 Apr 2];10(1):118–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506112001067>
226. Calder A, Roth-Albin I, Bhatia S, Pilquil C, Lee JH, Bhatia M, et al. Lengthened G1 Phase Indicates Differentiation Status in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2012 Jul 24;22(2):279–95. Available from: <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0168>
227. García del Caño G, Montaña M, Aretxabala X, González-Burguera I, López de Jesús M, Barrondo S, et al. Nuclear phospholipase C- β 1 and diacylglycerol LIPASE- α in brain cortical neurons. *Adv Biol Regul* [Internet]. 2014;54:12–23. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212492613000675>
228. Graeser R, Gannon J, Poon RYC, Dubois T, Aitken A, Hunt T. Regulation of the CDK-related protein kinase PCTAIRE-1 and its possible role in neurite outgrowth in Neuro-2A cells. *J Cell Sci* [Internet]. 2002 Sep 1;115(17):3479 LP – 3490. Available from: <http://jcs.biologists.org/content/115/17/3479.abstract>
229. Han W, Takano T, He J, Ding J, Gao S, Noda C, et al. Role of BLNK in Oxidative Stress Signaling in B Cells. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2001 Dec 1;3(6):1065–73. Available from: <https://doi.org/10.1089/152308601317203576>
230. Yanagi T, Matsuzawa SI. PCTAIRE1/PCTK1/CDK16: A new oncotarget?

BIBLIOGRAFIA

- Cell Cycle. 2015;14(4):463–4.
231. Ou C-Y, Poon VY, Maeder CI, Watanabe S, Lehrman EK, Fu AKY, et al. Two Cyclin-Dependent Kinase Pathways Are Essential for Polarized Trafficking of Presynaptic Components. *Cell* [Internet]. 2010;141(5):846–58. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410003855>
232. Palmer KJ, Konkel JE, Stephens DJ. PCTAIRE protein kinases interact directly with the COPII complex and modulate secretory cargo transport. *J Cell Sci* [Internet]. 2005 Sep 1;118(17):3839 LP – 3847. Available from: <http://jcs.biologists.org/content/118/17/3839.abstract>
233. Liu Y. Pctaire1 phosphorylates N-ethylmaleimide sensitive fusion protein and regulates exocytosis [Internet]. ProQuest Dissertations and Theses. [Ann Arbor]: Hong Kong University of Science and Technology (Hong Kong); 2006. Available from: <https://ehu.idm.oclc.org/login?url=https://www.proquest.com/dissertations-theses/pctaire1-phosphorylates-n-ethylmaleimide/docview/304911218/se-2?accountid=17248>
234. Dráberová E, Del Valle L, Gordon J, Marková V, Šmejkalová B, Bertrand L, et al. Class III β -Tubulin Is Constitutively Coexpressed With Glial Fibrillary Acidic Protein and Nestin in Midgestational Human Fetal Astrocytes: Implications for Phenotypic Identity. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2008 Apr 1;67(4):341–54. Available from: <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31816a686d>
235. Foudah D, Monfrini M, Donzelli E, Niada S, Brini AT, Orciani M, et al. Expression of Neural Markers by Undifferentiated Mesenchymal-Like Stem Cells from Different Sources. Bonetti B, editor. *J Immunol Res* [Internet]. 2014;2014:987678. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/987678>
236. Cocco L, Faenza I, Follo MY, Billi AM, Ramazzotti G, Papa V, et al. Nuclear inositides: PI-PLC signaling in cell growth, differentiation and pathology. *Adv Enzyme Regul* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 Sep 20];49(1):2–10.

Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065257108000538?via%3>

Dihub

237. Irvine RF. Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2003;4(5):349–61. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm1100>
238. Lukinovic-Skudar V, Matkovic K, Banfic H, Visnjic D. Two waves of the nuclear phospholipase C activity in serum-stimulated HL-60 cells during G1 phase of the cell cycle. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2019 Oct 2];1771(4):514–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198107000327>