



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**CB₁ kannabinoideen hartzaile
gabeziaren eragina garuntxoko
zuntz paraleloetan**

*Ianire Buceta, Irantzu Rico-Barrio,
Nagore Puente, Jon Egaña,
Svein Achicallende, Itziar Terradillos,
Itziar Bonilla, Inmaculada
Gerrikagoitia, Pedro Grandes
eta Izaskun Elezgarai*

106-113 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.14>



CB₁ kannbinoideen hartzaille gabeziaren eragina garuntxoko zuntz paraleloetan

Buceta, Ianire^(1,2); Rico-Barrio, Irantzu^(1,2); Puente, Nagore^(1,2); Egaña, Jon^(1,2); Achicallende, Svein^(1,2); Terradillos, Itziar^(1,2); Bonilla, Itziar^(1,2); Gerrikagoitia, Inmaculada^(1,2); Grandes, Pedro^(1,2) eta Elezgarai, Izaskun^(1,2)

¹ Neurozientziak Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU), Leioa, Bizkaia, Euskal Herria. ² Achucarro Basque Center for Neuroscience zentroa, Euskal Herriko Unibertsitatea ianire.buceta@ehu.eus

Laburpena

Endokannabinoide-sistemak (EKS) garapeneko prozesuetan parte hartzen du eta helduarroan neurotransmisoreen askapena erregulatzen du batez ere, CB₁ kannabinoideen hartzaillearen bitartez. Karraskarien garuntxoan, garapenean eta helduarroan, EKSren adierazpen handia dago zuntz paraleloen bukaera sinaptikoetan (ZPBS). CB₁ren jaiotzetiko gabeziak animalia helduen ZPBSetan izan dezakeen eragina aztertu dugu kalteberatasun desberdina duten V. eta X. lobuluetan. ZPBSen ultraegitura mailako zenbait parametro neuritu ditugu CB₁ adierazten ez duten saguetan. CB₁ hartzaillearen gabeziak ZPBSen morfologian aldaketa esanguratsuak eragiten ditu jatorrizko saguekin alderatuz, batez ere kalteberena den garuntxo-eremuan.

Hitz gakoak: endokannabinoide sistema, garuntxoa, zuntz paraleloak, CB₁-KO, mikroskopia elektronikoa.

Abstract

The endocannabinoid-system (ECS) is involved in the brain's developmental processes and its main role in the adulthood is the regulation of the synaptic transmission mainly through the CB₁ cannabinoid receptor. The ECS is widely expressed in the rodent's cerebellum during early development and in the adulthood mostly at the parallel fibre terminals (PFT). We wanted to know the effect of lacking CB₁ at the ultrastructural features of the PFT belonged to lobe V and X which show different sensibility to be damaged in pathological situations. We measured different parameters on these PFT in mice lacking CB₁. Our results show that the lack of CB₁ has a significant impact onto the PFT morphology at ultrastructural level.

Keywords: endocannabinoid system, cerebellum, parallel fibres, CB₁-KO, electron microscopy.

1. Sarrera eta motibazioa

Garunean baldintza fisiologikoetan gertatzen diren neurona-zirkuitu eraginkorrak garuneko zelula desberdinen arteko elkarrekintza orekatu baten ondorio dira. Horretarako, neurona arteko neurotransmisore desberdinen koordinazio eta oreka eta baita neurona bakoitzaren berariazko neurotransmisoreen mailen erregulazioa ere gertatzea ezinbestekoa da.

Neuronetan, neurotransmisoreak besikuletan metatu eta arraildura sinaptikora jariatzen dira, hurrengo neuronan bere ekintza egiteko. Neurotransmisore horien jarioa erregulatzen duen sistema garrantzitsua dugu endokannabinoide-sistema (EKS). Izan ere, sistema hori nerbio-sistema zentraleko (NSZ) erregulatzailerik onahikoena da (Fride et al., 2005; Chevalleyre et al., 2006) eta garuntxoan adierazpen handia du; batez ere, kitzikatzaileak diren (neurotransmisoretzat glutamatoa erabiltzen dutenak) pikor zelulen zuntz paraleloen bukaera sinaptikoetan (ZPBS) eta inhibitzaileak diren saski-zelulen bukaera sinaptikoetan (neurotransmisoretzat GABA erabiltzen dutenak) (Kawamura et al., 2006).

EKSren osagai nagusiak honako hauek dira: endokannabinoideak (eKB), horien hartzailleak-NSZean nagusiki CB₁ hartzailleak-, eKBen sintesia eta degradazioa gauzatzen duten entzimak (Fride, 2005; Chevalleyre et al., 2006).

EKSren ezaugarri bereizgarriena, bere ekintza neuromodulatzailerik atzerantzko seinalez tapenaren bitartez egitea da: CB₁ kannabinoideen hartzailerik zuntzen bukaera sinaptikoen mintzean kokatzen da

(presinaptikoki edo 1go neuronan). Estimulu baten aurrean kaltzioaren kontzentrazioaren igoera gertatzen da postsinapsian (2. neuronan) eta ondorioz, sintesi entzimek eKBak sintetizatuko dituzte. Endokannabinoiden horiek presinaptikoki kokaturiko CB₁ hartzaileei lotuko zaizkie eta, erantzun bezala, neurotransmisoreen doikuntza gertatuko da.

Garuntxoan jazotzen diren epe labur eta luzeko plastikotasun sinaptikoak batez ere 2-arakidonoiolglizerola (2-AG) CB₁ hartzaileari lotzen zaionean gertatzen dira. CB₁ hartzailea behin aktibatuta bere ekintza G_{i/o} proteinei lotuta egingo du, N eta P/Q kaltzio kanalen inhibizioa eta potasioaren zelulaz kanpoko garraioa sustatuz. Mekanismo horiek eKBeek eragiten dituzten neurotransmisoreen jarioaren inhibizioaren oinarrian daude eta neurotransmisoreen askapenaren moldaketa, era berean, epe labur edo luzeko plastizitatearen oinarrian dago (Di Marzo et al., 2004, Melis et al., 2004, Safo eta Regehr, 2005; Qiu eta Knöpfel, 2007, 2009).

Azken urteetan ikusi da EKSak parte hartzen duela garapeneko prozesuetan parte hartzen duela, hala nola proliferazioan, neurogenesian, neuritogenesian, axoien hazkuntza eta gidan, migrazioan eta sinaptogenesian (Gaffuri et al., 2012). Izan ere, garuntxoaren jaio aurreko eta osteko garapenaren fase desberdinetan adierazten da (Buceta et al., 2018; De la Torre-Ubieta eta Azad Bonni, 2011). Hori horrela izanik, litekeena da EKSren hartzaile nagusiaren gabeziak ondorio zuzenak izatea maila sinaptikoan.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

CB₁ hartzaileak helduaroan neurotransmisoreen jarioa erregulatzeko duen garrantzia eta garapeneko prozesuetan duen parte hartze handia kontuan izanda harrigarria den arren, zenbait ikerketak adierazi dute CB₁ hartzailearen gabezia duten saguek (CB₁-KO) fenotipo normala erakusten dutela (Mulder et al., 2008; Chanda et al., 2010; Tanimura et al., 2010); beste batzuek, aldiz, koordinazio edo ikasketa motorrean (Zimmer et al., 1999; Kishimoto eta Kano, 2006; Cutando et al., 2013) eta horren mekanismoetan (plastizitate desberdinetan) urritasun txikiak dituztela berretsi dute (Safo eta Regehr, 2005; Kawamura et al., 2006; Carey et al., 2011). Hala ere, hauteman diren urritasunak urrunetik dira itxaron daitezkeenak CB₁ hartzaileak garapenean eta sinapsi-transmisioan oinarritzko funtzioak dituela jakinda. Horregatik guztiagatik, pentsatzekoa da CB₁ hartzaileak ez duten saguek gabezia horren eragina arintzeko nolabaiteko egokitze-mekanismoak garatu dituztela.

Neuronen barneko besikulen dinamika mekanismo desberdinen bitartez ezartzen da. Besikulek etengabeko zikloa jasaten dute kopuru egokian mantendu eta agortu ez daitezen, neurotransmisio egokia mantentze aldera. Horretarako, neuronek besikula talde desberdinak dituzte: erreserbako besikulak, zeinak sinapsitik urrun kokatzen diren, birziklapenerako besikulak eta estimuluen baten aurrean jariatzeko prest dauden besikulak. Azken horiek, sinapsitik hurbilen kokatzen dira, sinapsiaren eremu aktiboan, hain zuzen ere (Bruckner et al., 2015).

Besikulen dinamika hori eta besikulen askapena, mekanismo eta faktore desberdinek erregulatzen dute modu koordinatuan. Horien artean aipagarrienak N eta P/Q kaltzio kanalak dira. Kanal horiek beraien domeinuaz baliatuz besikulen askatzearekin erlazionatutako proteinak sinapsira gerturatu dituzte. Elkarrekintza horrek neurotransmisoreen askapen sinkronikoa ahalbidetzen du (Wang et al., 1997; Kaeser eta Sudhof, 2005). Garuntxoaren kasuan ikusi da zuntz paraleloek erakusten dituzten epe laburreko plastikotasunean besikulen askapen dinamikari aldaketak gertatzen direla (Kaeser et al., 2011).

CB₁ hartzaileak erlazio zuzena du boltila-menpeko kaltzio kanalekin: kaltzio kanalak inhibitzen ditu eta horiek, era berean, besikula sinaptikoen dinamikari eta ondorioz, plastikotasun sinaptikoan eragin zuzena dute (Böhme et al., 2018; Guerrier eta Holcman, 2018).

Aipatutako faktore horiez gain, bukaera sinaptikoen morfologia eta askapen probabilitatea ere faktore determinatzaileak dira. Pikor zeluletan *in vitro* garatutako ikerketek ZPBSak aztertutako ondoren, ezagugarri hauek dituztela erakutsi dute: jariatutako izateko prest dauden besikulak aurkeztu dituztela, kaltzio kanaletatik urrunduz besikula hauek azkar birziklatzen direla eta askapen probabilitate handia dutela (Kawaguchi eta Sabaka, 2017).

Pikor zelulen zuntz paraleloak garuntxoko zatiketa funtzional desberdinetan aurkitzen dira, garuntxoko geruza molekularrean. Aipagarria da, garuntxoko lobulu desberdinek baldintza patologikoetan kalteberatasun ezberdina erakusten dutela: bizkarmuin-garuntxoaren parte den V. lobuluak vestibulu-bizkarmuinaren parte den atzeko X. lobulua baino sentikortasun handiagoa du (Clark et al., 2000; Tolbert eta Clark, 2000; Orvis et al., 2012). Izan ere, ZPBSekin sinapsia ezartzen duten zelulen, hots, Purkinje zelulen (PZ) endekapena dakarten prozesuek eragindako kaltea

esanguratsua da sentsibilitate handiagoa aurkezten duen V. lobuluan; X. lobulua, aldiz, aldaketarik gabe mantentzen da (Clark et al., 2000; Tolbert eta Clark, 2000; Orvis et al., 2012).

CB₁ hartzaileak besikulen dinamikan duen eragina kontuan izanda, CB₁ hartzailearen gabeziak zuntz paraleloen bukaera sinaptikoen morfologian eraginik duen aztertu nahi izan dugu ikerlan honetan. CB₁ hartzailearen gabezia duten animalietan gertatzen diren nolabaiteko egokitzapenak ZPBSen ultraegitura oinarriak duten eta garuntxo-lobuluek erakusten duten kalteberatasun desberdintasuna besikulen dinamika ezberdin batekin erlazionatuta egon daitekeen aztertu nahi izan dugu.

3. Ikerketaren muina

ZPBSen ezaugarri fenotipikoak ultraegitura mailan aztertzeko jatorrizko sagu helduak (*CB₁-WT* izendaturikoak; ingeleseko, *CB₁-wild-type*) eta CB₁ hartzailearen gabezia duten saguak (*CB₁-KO* izendaturikoak; ingeleseko, *CB₁-knock-out*) erabili genituen. Garuntxoaren zatiketa funtzional desberdinei dagozkien bermiseko V. lobulua eta X. lobuluak aztertu genituen. Ehuna glutaraldehidoz eta paraformaldehidoz hornitutako soluzioarekin fixatu zen. Garuntxoaren 30 µm-tako ebakin parasagitalak burutu eta mikroskopio elektronikoan aztertzeko prestatu genituen osmio tetroxidoa eta berun zitratoa kontraste moduan erabiliz. Ondoren, ZPBSen ultraegiturari lotutako zenbait parametro aztertu genituen, hala nola ZPBSen tamaina, sinapsiaren luzera, eta besikulen distribuzioa.

Erabilitako animalien xehetasunak:

- **CB₁-WT**: C57 anduiko jatorrizko saguak (*CB₁-WT* izendaturikoak; ingeleseko *CB₁-wild-type*). Animalia hauek, CB₁ hartzailearen distribuzio normala dute.
- **CB₁-KO**: C57 anduiko saguak dira; horiek, ez dute CB₁ hartzailearik (*CB₁-KO*; ingeleseko *CB₁-knock-out*).

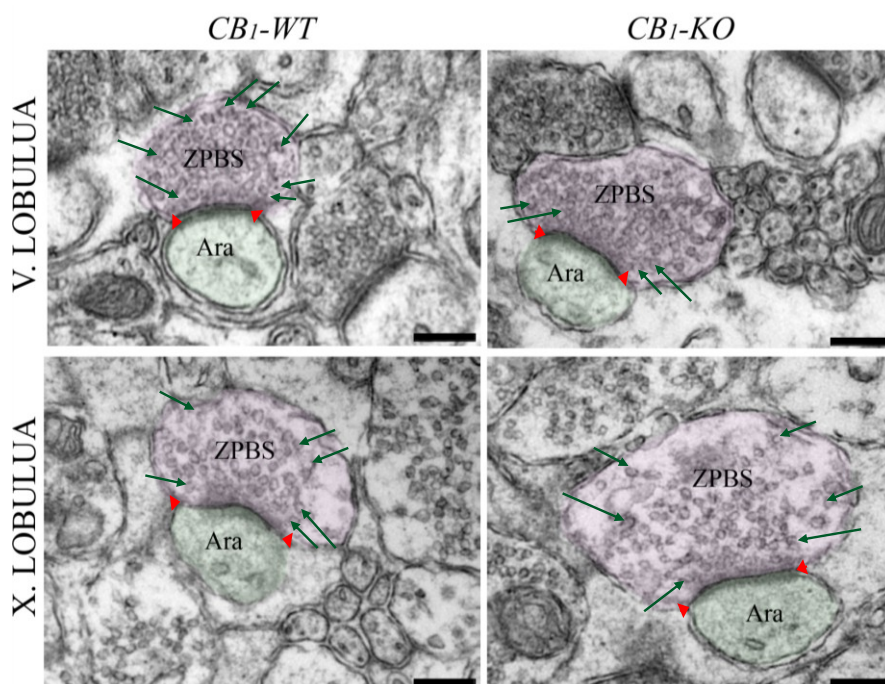
Sinapsiaren eremu aktiboaren hurrentasunean dauden besikulen kopurua zenbatzeko erabilitako irizpideak honako hauek izan ziren: aztertutako ZPBSak zeharka moztutakoak ziren eta ez zuten mitokondriarik eremu aktiboan; eremu aktibo honen arabera lerrokatu ziren ZPBSak. Sinapsiaren goiko aldean kokatutako eta dimentsio konstantedun koadrantea marraztu genuen. Koadrantearen barruan zeuden besikulak eta baita koadrantearen edozein alde ukitzen zuten besikulak kontsideratu genituen.

CB₁-KO saguen ZPBSak *CB₁-WT*ekin alderatu aurretik, jatorrizko saguetan gure intereseko bi lobuluen artean aztergai genituen parametroetan alderik dagoen ezagutu nahi izan genuen. Azterketa horren emaitzek kalteberatasun desberdina duten V. eta X. lobuluen arteko aldeak agerian utzi zituzten. Izan ere, X. lobuluko ZPBSen azalera handiagoa da eta sinapsi luzeagoak dituzte. Horrez gainera, sinapsiaren hurrentasunean, eremu aktiboan, besikula gutxiago eta sakabanatuago dituzte. Emaitza horiek adierazten zuten bi lobuluek aurkezten dituzten kalteberatasun maila desberdinen oinarrian besikulen dinamika eta sinapsi egitura desberdina egon daitezkeela eta ondorioz CB₁ gabeziak bi lobuluetan ondorio desberdinak izan ditzakeela.

Behin jatorrizko animalien lobulu bien arteko aldeak ezagututa, *CB₁-KO* saguen ZPBSen ezaugarri fenotipikoak alderatu genituen *CB₁-WT*ekin. Begi bistaz antzeman genezakeen *CB₁-KO* saguen ZPBSen azalera esanguratsuki handiagoa dela bai V. lobuluan bai X. lobuluan ere (1. irudia, 1. taula). Sinapsiaren luzerari dagokionez, *CB₁-KO*ek *CB₁-WT*ek baino sinapsi luzeagoak dituzte V. lobuluan. X. lobuluan, aldiz, ez dago desberdintasunik animalia bien artean parametro horretan (1. irudia, 1. taula).

Sinapsiaren eremu aktiboan dauden besikulei dagokionez, *CB₁-KO*en lobulu biek *CB₁-WT*ekoek baino besikula gutxiago dituzte eremu aktiboaren hurrentasunean (1. irudia, 1. taula) eta ZPBSetan besikula sinaptikoak sakabanatuago daude aztertutako bi lobuluetan (1. irudia, 2. irudia). *CB₁-KO*en X. lobuluan besikula kopurua txikiagoa dela sinapsiaren hurbiltasunetik nabaria den arren, *CB₁-WT*en patroia berbera jarraitzen du eta animalia bietan, urruneko aldeko tartean, besikulak desagertu egiten dira, sinapsitik 45-60 nm-tara. *CB₁-KO*en V. lobuluan, aldiz, besikulak nahiz eta sinapsiaren hurbiltasunetik egon badauden, horiek bat batean murrizten dira sinapsitik 30 nm-tara (2. irudia).

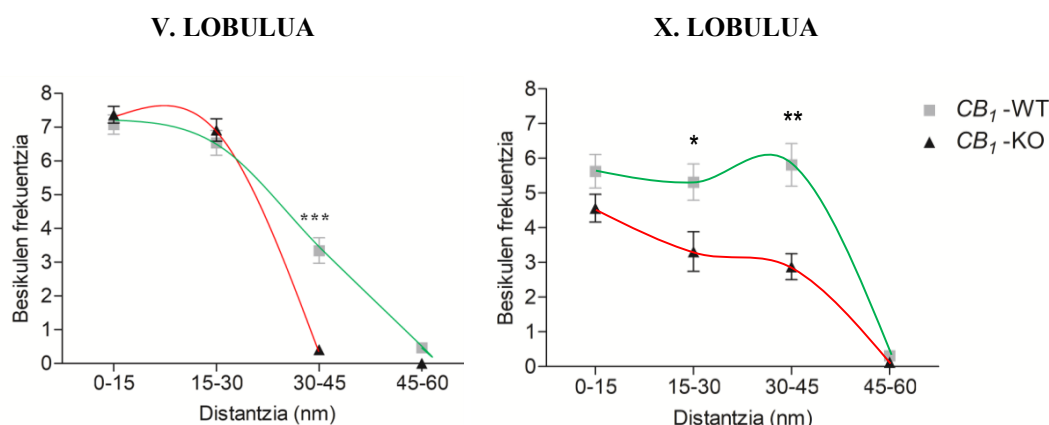
1. irudia. CB_1 -WT eta CB_1 -KO sagu helduen garuntxo-bermisko V. eta X. lobuluen mikroskopia elektroniko argazkiak. Nabaritu desberdintasunak ZPBSen tamainan, sinapsiaren luzeran eta besikulen banaketan. Gezi berdeak, besikulak adierazten dituzte. Gezi-buru gorriek, sinapsiaren luzera mugatzen dute. ZPBS, zuntz paraleloen bukaera sinaptikoa; Ara, arantza. Eskala-barrak: $0.250\ \mu\text{m}$.



1. taula: CB_1 -KOen eta jatorrizko animalien garuntxoaren V. eta X. lobuluetako ZPBSetan aztertutako parametroen alderaketa.

Aztertutako parametroa	CB_1 -WT V. lobulua	CB_1 -KO V. lobulua	CB_1 -WT X. lobulua	CB_1 -KO X. lobulua	Test estatistikoa
ZPBSen azalera (μm^2)	0.31 ± 0.008	*** 0.43 ± 0.013	0.42 ± 0.011	*** 0.56 ± 0.015	Mann-Whitney U
Sinapsiaren luzera (nm)	303.6 ± 5.372	*** 343.8 ± 6.622	346 ± 5.563	357.5 ± 6.137	Mann-Whitney U
Besikulen dentsitatea (μm^2)	66.94 ± 1.798	*** 53.71 ± 1.029	53.23 ± 1.873	*** 46.47 ± 1.625	t-Student

2. irudia. Sinapsiaren eremu aktiboaren hurrentasunean dauden besikulen banaketaren analisi estatistikoa. V. lobuluan 0-15 eta 15-30 nm-ko tartean besikula kopurua ugaria da bi animalietan. 30-45 nm-ko tartean CB_1 -WTetan besikula kopuru ertain bat mantentzen den bitartean, CB_1 -KOetan ia guztiz desagertu egiten dira ($P < 0.0001$). X. lobuluan, 0-15 nm-ko tartean besikula kopurua ugaria bada ere, 15-30 nm-ko tartean CB_1 -KOek besikula kopuru txikiagoa dute (* $P = 0.0109$). 30-45 nm-ko tartean desberdintasuna nabarmenagoa da (** $P = 0.0012$). Aipatzeko da, CB_1 -KOetan V. lobuluan ia besikularik ez dagoela 30-45 nm-ko tartean; X. lobuluan, aldiz, presente daude. *Mann Whitney test-a* $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$.**



4. Ondorioak eta eztabaida

Ikerketa honen lehen urratsa, jatorrizko saguetan (CB_1 -WT) V. eta X. lobuluetako ZPBSen artean alderik dagoen aztertzea izan dugu, garuntxoaren zatiketa funtzional desberdinei dagozkielako. Lortutako emaitzek agerian uzten dute bi lobuluen arteko desberdintasunak. Kalteberatasun txikiagoa erakusten duen lobuluak (X. lobulua) bukaera sinaptiko handiagoak eta besikulak sinapsitik urrunago dituela erakusten du. Baliteke, antzeman ditugun desberdintasunak lobuluen arteko besikula sinaptikoen garraio-dinamikan eta askatzeko probabilitatean desberdintasunak daudenaren adierazle izatea; ezberdintasun horiek ondorio funtzionalak izan ditzakete bai plastikotasun sinaptikoan baita gehiegizko kitzikapenak dituen ondorio toxikoetan ere (Singer eta Diamond, 2006; Guerrier eta Holcman, 2018).

Ondoren, CB_1 -WT eta CB_1 -KOen lobuluetako ZPBSak aztertu eta alderatu ditugu. Bukaera sinaptikoetan besikula-talde desberdinen kopuruak, hauen kaltzioen kanalekiko distantzia eta ondorioz, kaltzio honen fluxuak besikulen dinamika determinatzen duela kontuan izanda, besikulen banaketan aurkitu ditugun desberdintasunak, garrantzi handia izan ditzakete (Böhme et al., 2018; Guerrier eta Holcman, 2018). Izan ere, CB_1 -KOen ZPBSen ultraegitura mailako morfologiak antzekotasun handiak ditu CB_1 hartzailea eKBeek aktibatzen dituztenean ematen direnekin, pikor zeluletan eta beste sistemetan *in vitro* garatutako eta mikroskopia elektronikoz eta elektrofisiologia bidez aztertutako zenbait ikerketak erakutsi dutenez (Ramírez-Franco et al., 2014; García-Morales et al., 2015). Ikerketa horiek, eKB bidez eragindako CB_1 hartzailearen aktibazioak, besikulak sinapsitik urruntzen dituela erakutsi dute, estimulu maila desberdinen aurrean, besikula hauen askatze-probabilitatea jaitsiz (Ramírez-Franco et al., 2014; García-Morales et al., 2015).

Azterlan honetan lortu ditugun emaitzek CB_1 hartzailearen gabezia duen sistemak aktibitate basalorekiko besikulen askatze-probabilitate txikiagoa izan dezakeela aditzera ematen dute, bereziki V. lobuluan. Ondorioz, CB_1 -WT saguetan plastizitatea eragin dezakeen estimuluak, zeinak besikulen askatze-probabilitatea jaitsiko lukeena, ez da CB_1 -KOetan ematen. Nahiz eta ikerketa gehiago behar diren, lortutako emaitzek besikulen dinamika, plastizitate sinaptikoa eta EKS zuzenki erlazionatuta daudela iradokitzen dute. Horrez gain, lan honetan lortutako emaitzek V. eta X. lobuluek estimulu desberdinen aurrean erakusten duten plastizitate sinaptikoan desberdintasunak izan ditzaketela iradokitzen dute, bai CB_1 -WT eta bai CB_1 -KO saguetan.

Gure emaitzek, CB_1 hartzailearen gabeziak ZPBSen ultraegitura mailako ezaugarrietan eragin nabarmena duela erakusten dute. Aldaketa horiek, CB_1 -KOek sinapsian dituzten urritasunak adierazten egon daitezke soilik edo gabezi horri aurre egite aldera egokitze moduan ematen diren aldaketak direla adierazten egon daitezke. Hori izan liteke CB_1 -KOek disfuntzio nabarmenik ez erakustearen oinarria edo arrazoia. Izan ere, eremu askotan, proteina ugariren gabezi edo adierazpen aldaketak, aldaketa morfologikoak, besteak beste, horrelako konpentsazioak eragiten dituzte, proteinaren gabeziak izan ditzakeen ondorioak murrizte aldera (Gaffuri et al., 2012).

CB_1 -KO saguen X. lobuluaren morfologiak sistemari irmotasuna eskaini diezaioke; izan ere, CB_1 hartzailearen gabeziaren ondorioz, CB_1 -KO saguen V. lobuluak badirudi morfologia horren alde egiten duela. Baliteke, CB_1 hartzailea ez izateagatik CB_1 -WTen X. lobuluaren antzeko morfologia lortuz, neuronen aktibitate ez ohikoaren aurrean irmotasun handiagoa eskaintzea eta ondorioz, garuntxoko zirkuitua aldatutako egoera fisiologikora moldatuko luke baldintza horretan izan dezakeen funtzionalitate konpentsatu eraginkorrena lortzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Jatorrizko saguetan garuntxoko zatiketa funtzional desberdinei dagozkien eta kalteberatasun desberdina erakusten duten V. eta X. lobuluetako ZPBSen ultraegitura mailako desberdintasunak daudela erakutsi dugu. Aldaketa horiek bukaera sinaptikoen eta sinapsien tamainan eta besikulen dispersioan nabarmendu dira. Desberdintasun horiek plastizitate sinaptikoan eragina izan dezakete eta gaur arte, ez dago bi lobulu hauen artean sinapsi mailan egon litezkeen desberdintasunak aztertu dituen ikerketa elektrofisiologikorik.

CB_1 hartzaileak besikula sinaptikoen kokapenean eta sinapsian bertan daukan eragina ikusita, interesgarria izango litzateke ultraegitura mailan ikusi ditugun aldaketek transmisio eta plastikotasun sinaptikoan izan ditzaketen ondorioak aztertzea. Horrez gainera, garuntxoaren eremu desberdinek eraso edo patologia desberdinen aurrean erakusten duten erresistentzia desberdintasuna besikulen askapen dinamika desberdinekin erlazionatuta egon daitekeen ikertzeak garrantzi handia izango luke.

Bide horretatik, garuntxo-ataxia mota batzuetan bizkarmuin-garuntxoa da gehien kaltetzen den eremua; izan ere, gure emaitzen arabera, eremu hori da CB_1 gabeziaren aurrean gehien aldatu dena. Gaixotasun horren animalia ereduan, zehazki eremu horretan, CB_1 ean genetikoki zein farmakologikoki eragiteak izan ditzakeen ondorioak zehaztea da gure hurrengo helburua. Izan ere, gure emaitzek CB_1 animalietan ematen diren besikula eta bukaera sinaptiko mailako egokitzenak glutamatoaren askapenean kontrol mekanismo ordezko batez baliatzen dituela iradokitzen dute.

Bestalde, CB_1 hartzaileak garuneko garapeneko prozesuetan parte hartzen du, aurrerago esan bezala. Hartzaile horrek, axoien hazkuntza eta gidan parte hartzen du, besteak beste. Nahiz eta CB_1 hartzailea ez izan, CB_1 -KO saguetan gure ikerketak erakusten duen bezala, ZPBSak beraien itura heltzen dira, hau da, Purkinje zelulen arantza dendritikoetara. ZPBSetan, beste proteina neuromodulatzaile batzuk daude, zeinak CB_1 hartzailearen gabeziaren aurrean, horren funtzioa bete ditzaketen. Hori argitze aldera, interesgarria izango litzateke ezagutzea garapeneko fase goiztiar desberdinetan ultraegitura mailan axoi hauen ibilbidea eta fase horietariko bakoitzean zein proteinekin bete ditzaketen CB_1 hartzaile honen funtzioa.

6. Erreferentziak

- Böhme M., Grasskamp A. eta Walter A. (2018), Regulation of synaptic release-site Ca²⁺ channel coupling as a mechanism to control release probability and short-term plasticity, *FEBS Lett*, 592, 3516-3531.
- Buceta I., Rico-Barrio I., Egaña-Huguet J., Achicallende S., Terradillos I., Puente N., Reguero L., Royo N., Bonilla-Del Río I., Medrano A., Mendizabal-Zubiaga J., Gómez-Urquijo SM., Ramos A., Gerrikagoitia I., Grandes P. eta Elezgarai I. (2018), Endocannabinoid sistema parte-hartzea arratoien garuntxoaren jaio osteko garapenean, *Ekaia*, 34, 123-148.
- Bruckner J., Zhan H. eta O'Connor-Giles K. (2015), Advances in imaging ultrastructure yield new insights into presynaptic biology, *Front Cell Neurosci*, 9, 196.
- Carey M., Myoga M., McDaniel K., Marsicano G., Lutz B., Mackie K. eta Regehr W. (2011), Presynaptic CB1 receptors regulate synaptic plasticity at cerebellar parallel fiber synapses, *J Neurophysiol*, 105, 958-963.
- Chanda P., Gao Y., Mark L., Btsh J., Strassle B., Lu P., Piesla M., Zhang M., Bingham B., Uveges A., Kowal D., Garbe D., Kouranova E., Ring R., Bates B., Pangalos M., Kennedy J., Whiteside G. eta Samad T. (2010), Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system, *Mol Pharmacol*, 78, 996-1003.
- Chevalere V., Takahashi K. eta Castillo P. (2006), Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS, *Annu Rev Neurosci*, 29, 37-76.
- Clark B., LaRegina M. eta Tolbert D. (2000), X-linked transmission of the shaker mutation in rats with hereditary Purkinje cell degeneration and ataxia, *Brain res*, 858, 264-273.
- Cutando L., Busquets-Garcia A., Puighermanal E., Gomis-González M., Delgado-García J., Gruart A., Maldonado R. eta Ozaita A. (2013), Microglial activation underlies cerebellar deficits produced by repeated cannabis exposure, *J Clin Invest*, 123, 2816-2831.
- De la Torre-Ubieta L. eta Bonni A. (2011), Transcriptional regulation of neuronal polarity and morphogenesis in the mammalian brain, *Neuron*, 72, 22-40.
- Di Marzo V., Bifulco M. eta De Petrocellis L. (2004), The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 771-784.
- Fride E. (2005), Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior, *Curr Drug Targets CNS Neurol Disor*, 4, 633-642.
- Gaffuri, A., Ladarre, D. eta Lenkei, Z. (2012), Type-1 cannabinoid receptor signaling in neuronal development, *Pharmacology*, 90, 19-39.
- García-Morales V., Montero F. eta Moreno-López, B. (2015), Cannabinoid agonists rearrange synaptic vesicles at excitatory synapses and depress motoneuron activity in vivo, *Neuropharmacology*, 92, 69-79.
- Guerrier, C. eta Holcman, D. (2018), The First 100 nm Inside the Pre-synaptic Terminal Where Calcium Diffusion Triggers Vesicular Release, *Front Synaptic Neurosci*, 1-12.
- Kaesler P. eta Südhof T. (2005), RIM function in short- and long-term synaptic plasticity, *Biochem Soc Trans*, 33, 1345-1349.
- Kaesler, P., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J. eta Südhof, T. (2011), RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction, *Cell*, 144, 282-295.
- Kawaguchi, S. eta Sakaba, T. (2017), Fast Ca²⁺ Buffer-Dependent Reliable but Plastic Transmission at Small CNS Synapses Revealed by Direct Bouton Recording, *Cell Rep*, 21, 3338-3345.
- Kawamura Y., Fukaya M., Maejima T., Yoshida T., Miura E., Watanabe M., Ohno-Shosaku T. eta Kano M. (2006), The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum, *J Neurosci*, 26, 2991-3001.
- Kishimoto, Y. eta Kano, M. (2006), Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning, *J. Neurosci*, 26, 8829-8837.
- Melis M., Perra S., Muntoni A., Pillolla G., Lutz B., Marsicano G., Di Marzo V., Gessa G. eta Pistis M. (2004), Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoyl-glycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons, *J Neurosci*, 24, 10707-10715.
- Mulder J., Aguado T., Keimpema E., Barabás K., Ballester Rosado C., Nguyen L., Monory K., Marsicano G., Di Marzo V., Hurd Y., Guillemot F., Mackie K., Lutz B., Guzmán M., Lu H., Galve-Roperh I. eta Harkany T. (2008), Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 8760-8765.
- Orvis G., Hartzell A., Smith J., Barraza L., Wilson S., Szulc K., Turnbull D. eta Joyner A. (2012), The engrailed homeobox genes are required in multiple cell lineages to coordinate sequential formation of fissures and growth of the cerebellum, *Dev Biol*, 367, 25-39.
- Qiu D. eta Knöpfel T. (2007), An NMDA receptor/nitric oxide cascade in presynaptic parallel fiber-Purkinje neuron long-term potentiation, *J Neurosci*, 27, 3408-3415.

- Qiu D. eta Knöpfel T. (2009), Presynaptically expressed long-term depression at cerebellar parallel fiber synapses, *Pflugers Arch*, 457, 865-875.
- Ramírez-Franco J., Bartolomé-Martín D., Alonso B., Torres M. eta Sánchez-Prieto J. (2014), Cannabinoid type 1 receptors transiently silence glutamatergic nerve terminals of cultured cerebellar granule cells, *PloS one*, 9, e88594.
- Safo P. eta Regehr W. (2005), Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD, *Neuron*, 48, 647-659.
- Singer, J. eta Diamond, J. (2006), Vesicle depletion and synaptic depression at a mammalian ribbon synapse, *J. Neurophysiol*, 95, 3191-3198.
- Tanimura A., Yamazaki M., Hashimoto-dani Y., Uchigashima M., Kawata S., Abe M., Kita Y., Hashimoto K., Shimizu T., Watanabe M., Sakimura K. eta Kano M. (2010), The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission, *Neuron*, 65, 320-327.
- Tolbert D. eta Clark B. (2000), Olivocerebellar projections modify hereditary Purkinje cell degeneration, *Neuroscience*, 101, 417-433.
- Wang Y., Okamoto M., Schmitz F., Hofmann K. eta Südhof T. (1997), Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion, *Nature*, 388, 593-598.
- Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A., Herkenham, M. eta Bonner, T. (1999), Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 5780-5785.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honek honako diru-laguntzak izan ditu: Euskal Herriko Unibertsitateko doktoretza-aurreko diru-laguntza (UPV/EHU) (PIF09/2009/PIF09228); Eusko Jaurlaritza (BCG IT764-13); MINECO/FEDER, UE diru-laguntza (SAF2015-65034-R).