



III. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

Kongresuko artikulu-bilduma

OSASUN ZIENTZIAK

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
BAIONA, EUSKAL HERRIA





(c) 2019 Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

Paueko eta Aturrialdeko Unibertsitatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Nafarroako Unibertsitateko Publikoa, Mondragon Unibertsitatea (MU), Deustuko Unibertsitatea (DU), Nafarroako Unibertsitatea eta ESTIA laguntzaileak izan dira edizio honetan.

(c) Egileak

Editoreak:

Olatz Arbelaiz, Urtzi Etxeberria, Ainhoa Latatu, Miren Josu Omaetxebarria

Artikuluak *Creative Commons Aitortu-PartekatuBerdin 3.0* lizentziapean daude

ISBNa: 978-84-8438-681-0 Lan osorako

ISBNa: 978-84-8438-684-1 3. liburukia

DOI: <https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.2019.03>

Harremanetarako: argitalpenak@ueu.eus

UEU. Erribera 14 1 D. 48005 Bilbo. Tel.: 94 679 05 46

OSASUN ZIENTZIAK

Aurkibidea

Hitzaurrea.....	6
Batzordeak.....	8
Zelulaz kanpoko matritzeko hevin proteinaren ikerketa giza garunean, <i>Amaia Nuñez, Vincent Vialou, Sylvie Dumas, Luis F. Callado eta Amaia M. Erdozain</i>	12
Bektore biral terapeutiko baten efikazia eta toxizitatearen ebaluazioa Wilson gaixotasundun saguetan, <i>Oihana Murillo, Daniel Moreno, Cristina Gazquez, Miren Barberia, Itziar Cenzano, Iker Uriarte, Iñigo Navarro, Veronica Ferrer, Bernard Bénichou, Jean Philippe Combal, Ruben Hernandez-Alcoceba eta Gloria González Aseguinolaza</i>	18
Selenozianato eta Diseleniuroak: Leishmaniaren aurkako sendagai eraginkor berriak, <i>Mikel Etxebeste-Mitxelorena, Daniel Plano, Esther Moreno, Antonio Jiménez-Ruiz, Espuelas Socorro eta Carmen Sanmartín</i>	24
RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNAk) etxabereetan: RNA-seq datuetan oinarritutako analisi transkriptomikoa ardian, <i>Martin Bilbao-Arribas, Endika Varela-Martínez, Naiara Abendaño eta Begoña M. Jugo</i>	31
Ama hizkuntzaren erabilpenaren eragina Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonaren akonpainamenduan, <i>Maritxu Goyheneche</i>	38
Ingurune aberastuak nerabezaroan alkoholarekin trataturiko C57BL6J saguen iraupen luzeko CB ₁ hartzailearen menpeko plastikotasuna berreskuratzen du. -Paradigma honen azpian ezkututzen diren mekanismo zelularren bila-, <i>Irantzu Rico-Barrio, Sara Peñasco, Ianire Buceta, Nagore Puente, Ane Olea, Leire Lekunberri, Maitane Serrano, Leire Reguero, Jon Egaña-Huguet, Itziar Terradillos, Svein Achicallende, Inmaculada Gerrikagoitia, Izaskun Elezgarai eta Pedro Grandes</i>	49
Eritasun zeliakoarekin asoziatutako rs6822844 polimorfismoaren ikerketa funtzionala heste-zeluletan, <i>Maialen Sebastian-delaCruz, Ane Olazagoitia-Garmendia, Irati Romero-Garmendia, Iñaki Irastorza, Ainara Castellanos-Rubio eta Jose Ramon Bilbao</i>	57
USP9X: Angelman sindromearen tratamendurako iturri berria ote? <i>Nagore Elu, Juanma Ramirez, Benoit Lectez, Nerea Osinalde eta Ugo Mayor</i>	63
Depresioaren teoria noradrenergikoa, <i>Itziar Muneta-Arrate, Igor Horrillo, Jorge Emilio Ortega eta Javier Meana</i>	70

Hiperkolesterolemia Familiarra: PCSK9 aldaeren karakterizazioa tratamendu pertsonalizaturako, <i>Asier Larrea, Shifa Jebari, Unai Galicia, Rocio Alonso, Asier Benito-Vicente, B. Kepa Uribe eta Cesar Martin</i>	76
1 motako diabetesari asoziatutako lncRNAen azterketa funtzionala β -zelulen hanturan eta apoptosian, <i>Itziar Gonzalez-Moro, Ane Olazagoitia-Garmendia, Nora Fernandez-Jimenez, Ainara Castellanos-Rubio eta Izortze Santin</i>	84
Gaixotasun autoimmunei asoziatutako <i>RGS1</i> eremuko lncRNA baten karakterizazio funtzionala, <i>Ane Olazagoitia-Garmendia, Nora Fernandez-Jimenez, Maialen Sebastian-delacruz, Jose Ramon Bilbao eta Ainara Castellanos-Rubio</i>	92
E2F7 proteinaren karakterizazioa DNAren konponketa eta ezegonkortasun genomikoaren modulatzailerako, <i>Jon Vallejo-Rodríguez, Jone Mitxelena, Aintzane Apraiz, Iraia García-Santisteban, Asier Fullaondo, Monica Álvarez-Fernández, Marcos Malumbres eta Ana Zubiaga Ana</i>	99
CB ₁ kannabinoideen hartzaile gabeziaren eragina garuntxoko zuntz paraleloetan, <i>Ianire Buceta, Irantzu Rico-Barrio, Nagore Puente, Jon Egaña, Svein Achicallende, Itziar Terradillos, Itziar Bonilla, Inmaculada Gerrikagoitia, Pedro Grandes eta Izaskun Elezgarai</i>	106
CB ₁ hartzaile astrozitikoa mikroskopio elektronikoko prestakinetan detektatzeko markatzaile astroglialak: GFAP vs GLAST, <i>Svein Achicallende, Itziar Bonilla-Del Río, Itziar Terradillos, Jon Egaña, Irantzu Rico, Ianire Buceta, Nagore Puente, Izaskun Elezgarai, Inmaculada Gerrikagoitia eta Pedro Grandes</i>	114
Mikrogliaaren aktibazioa eta 2 motako hartzaile kannabinoidearen de novo adierazpena loki bihurtzeko epilepsia ereduari, <i>Itziar Terradillos, Itziar Bonilla-Del Río, Svein Achicallende, Jon Egaña, Irantzu Rico, Ianire Buceta, Leire Lekunberri, Leire Reguero, Juan Luis Mendizabal, Julian Romero, Maria Teresa Grande, Cecilia J. Hillard, Nagore Puente, Izaskun Elezgarai, Inmaculada Gerrikagoitia eta Pedro Grandes</i>	122
THC fitokannabinoidearen inplikazioa sagu oozitoen heldutasun-prozesuan eta ernaketan, <i>Lide Totorikaguena, Estibaliz Olabarrieta, Naiara Agirregoitia eta Ekaitz Agirregoitia</i>	130
mGlu2 eta mGlu3 glutamatoaren hartzaile metabotropikoen kokapena CB ₁ hartzaile kannabinoidearekiko hipokampoaren hilusean, <i>Aitor Medrano-Peral, Ianire Buceta, Almudena Ramos-Uriarte, Jon Egaña-Huguet, Itziar Bonilla-Del Río, Naiara Royo, Irantzu Rico-Barrio, Izaskun Elezgarai, Nagore Puente, Leire Reguero, Svein Achicallende, Itziar Terradillos, Edgar Soria-Gómez, Juan Mendizabal, Inma Gerrikagoitia, José Javier Meana, Sonia Gómez-Urquijo eta Pedro Grandes</i>	144
TRPV1 hartzaile gabeziak CB ₁ hartzailearen funtzioan eragina du hipokampoaren bihurtzeko bide zentralerako sinapsietan, <i>Jon Egaña-Huguet, Svein Achicallende, Irantzu Rico-Barrio, Ianire Buceta, Itziar Bonilla-del Río, Nagore Puente, Inmaculada Gerrikagoitia, Izaskun Elezgarai eta Pedro Grandes</i>	149

Multimedia jarduera sedentarioak eta Dieta Mediterraneoarekiko atxikiduraren arteko erlazioa Bilbo Handiko haur eta nerabeetan, <i>Silvia Caballero Sanchez, Amets Jauregi, Irati Ayesta,</i> <i>Julia Fernández, Leyre Gravina eta Itziar Hoyos Cillero</i>	157
AHK2: Duchenne gihar-distrofian potentzial terapeutikoa duen kalstabina modulatzailerria, <i>Haizpea Lasa Fernandez, Laura González Lafuente, Jose Alberto Navarro García,</i> <i>Jaione Lasa Elgarresta, Aitziber Irastorza, Jose Ignacio Miranda, Jesus Maria Aizpurua,</i> <i>Adolfo López de Munain, Gema Ruiz Hurtado eta AinaraVallejo Illarramendi</i>	166
Hantura periferikoa depresio eta antsietate sintomekin batera bularreko minbizia gainditutako emakumeetan, <i>Ainitze Labaka, Amaia Arregi, Oscar Vegas, Larraitx Garmendia,</i> <i>Joana Camba eta Joana Perez-Tejada</i>	172
CRISPR/Cas9 metodologiaren optimizazioa geneen inaktibaziorako, <i>Iraia García-Santisteban,</i> <i>Natividad Alcorta-Sevillano eta Ana Zubiaga</i>	178

IKERGAZTE 2019

Nazioarteko Ikerketa Euskaraz

HITZAURREA

Duela 45 urte sortu zenetik, euskal komunitate zientifiko-intelektuala trinkotzea da UEUk duen helburu garrantzitsuenetako bat. Elkarren berri izatea ezinbestekoa da ezagutzak aurrera egin dezan, are gehiago gure kasuan, euskaraz lanean dihardugun ikertzaileak hain sakabanatuta egonda. Ildo horretatik, UEUk hainbat arlotako adituak bildu izan ditu zenbait ekimenetan azken hamarkadetan: Informatikari Euskaldunen Bilkurak (11 edizio) Historialari Euskaldunen Topaketak (5 edizio), Hizkuntzalari Euskaldunen Bilkura (3 edizio), Matematikari Euskaldunen Bilkura (3 edizio), Osasun Zientzietako eta Natur Zientzietako ikertzaileen bilkurak (3 edizio), besteak beste, horren adibide argiak dira.

Bilkura guzti horiei IkerGazte kongresua gehitu zitzaien 2015.eko maiatzean. Ikerketa, euskara, gazteak, disziplinarrekotasuna izan ziren bilgune haren osagai nagusiak. Durangon hasitako bideak, jarraipena izan zuen 2017.ean Iruñean. Eta heldu da 2019.a eta aurtengoan Baiona dugu topagune; maiatzaren 27, 28 eta 29an, Paueko eta Aturrialdeko Unibertsitatean, Errobiko Campusean (Université de Pau et des Pays de l'Adour, Campus de la Nive) elkartuko gara. Hirugarren edizio honek 2015.ean ziurgabetasun handiz hasitako bideak nolabaiteko oinarri sendoa baduela erakusten digu. Eta aurten, beste behin ere, ikergazteen eskutik jasotako ekarpen kopuruak IkerGazte behar beharrezkoa dela ematen digu aditzera.

“IkerGazte2019: Nazioarteko Ikerketa Euskaraz” goiburu duen kongresu horren artikulu-bilduma dugu hau. Izenburu honetan Ikerketa, Euskara eta Gaztetasuna bildu nahi izan ditugu. Ikusgarri egin nahi dugu Euskal Herriko ikertzaile gazteek egiten duten nazioarte mailako ikerketa. Maiz nazioartean erakutsi eta aurkezten dira lan horiek, Euskal Herrian eta euskaraz aurkezteko aukera izan gabe. Kongresu honen helburua komunitate-zientifiko euskaldunaren ikertzaileak bildu eta elkarren berri izatea da, arlo guztiak jorratuz; hasi humanitateetatik eta gizarte-zientzietatik, eta zientzia zehatz, natur zientzia, ingeniari, arkitektura eta osasun-arloetako gaietaraino. Nazioartean ingelesez argitaratu ohi diren lanak euskaraz ere argitaratzeko eta zabaltzeko aukeraren aldeko apustua da. Hirugarren edizio hau euskaraz egindako ikerketan mugari dela dakigu!

Honelako kongresu bat aurrera ateratzeko ezinbestekoa da bai banakoen lan eskerga, baita erakunde publiko eta pribatu ugariaren laguntza ere: UEUko lan-taldea, Iparraldeko Sostengu Taldea eta UEUkideak; Batzorde Zientifikoko ikertzaileak eta Batzorde Dinamizatzaileko ikergazteak; Unibertsitate eta Ikertalde laguntzaileak; aldizkari zientifikoak eta bestelako laguntzaileak. Aurten azpimarratzekoak dira IKER Euskara eta euskal testuen ikerketa-zentroaren aldetik eta Paueko eta Aturrialdeko Unibertsitatearengandin (UPPA) jasotako interesa eta babesa. Bestalde, Baionako Udalak eta Udalbiltzak sariak babestu dituzte. Horrez gain, hainbat pertsonak eta komunikabidek erakutsitako atxikimendua ere aipatu nahi dugu. Esker mila guztiei.

Egitarau interesgarri eta erakargarria da, arlo guztietako ekarpenak biltzen dituen; 49 ahozko aurkezpenak dira eta 53 poster modukoak. Guztira 102 komunikazio.

Hasieran, 111 komunikazio jaso ziren, baina gainbegiratze-prozesua gainditu ondoren 102 daude bilduma honetan.

Jakintza-arloei dagokionez hauek dira zenbakiak:

Giza Zientziak eta Arteak	19
Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea	19
Zientziak eta Natura Zientziak	21
Ingeniaritza eta Arkitektura	20
Osasun Zientziak	23

Ikertzaileen filiazioari dagokionez, espero bezala, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) da maizen aipatu dena, 76 ekarpenekin. Ondoren Mondragon Unibertsitatea (5 ekarpen), Nafarroako Unibertsitate Publikoa (4 ekarpen) eta Nafarroako Unibertsitatea (4 ekarpen) aurkitzen ditugu maizen. Paueko Unibertsitatetik ere 3 ekarpen bat egon dira, eta IKER ikerketa-zentrotik eta Bordeleko Unibertsitatetik, bana. Beste ekarpen batzuk ere ondoko unibertsitatetatik jaso dira: Bartzelonako Unibertsitatea, Madrigal Unibertsitate Publikoa eta Birmingham City University.

Unibertsitateei loturiko ikerketa-zentroak eta taldeak aipatzen dira ekarpenetako askotan, beheago aipatzen diren Ikertalde laguntzaileez gain, PIE, NU-Cima, NU-Tecnun, INAMAT Institutua, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, BCMaterials, Polymat, AZTI-Teknalia, Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC), Estación Biológica de Doñana (CSIC), Ikerlan, chucarro Basque Center for Neuroscience edo CIC-energyGUNE agertzen dira besteak beste. Euskaltzaindia eta Gipuzkoako Foru Aldundia ere izan dira ikerketagune.

Euskal Herritik kanpoko erakundeei dagokienez, hauek dira lankidetzan aipatzen diren unibertsitate batzuk: Université de Toulon, UEU, Begoñako Andra Mari, Curtin University, Mineral Resources, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Institut de Biologie Paris Seine (NPS – IBPS).

Eta bi urtean behin errepikatzeari eutsiko diogu. Beraz, adi, Ikergazte2021 etorriko da-eta!

Olatz Arbelaitz, Urtzi Etxeberria, Ainhoa Latatu eta Miren Josu Omaetxebarria

BATZORDEAK

Batzorde Zientifikoa

Batzordeburua:

Miren Josu Omaetxebarria (UPV/EHU, UEU)

Urtzi Etxeberria (IKER Euskara eta euskal testuen ikerketa-zentroa)

Koordinatzailea:

Olatz Arbelaitz (UPV/EHU, UEU)

Idazkaria:

Ainhua Latatu (UEU)

Giza Zientziak eta Arteak

Itziar Aduriz (Bartzelonako Unibertsitatea, UEU)

Garazi Arrula (UPV/EHU, UEU)

Haizea Barcenilla (UPV/EHU, UEU)

Aritz Irurtzun (CNRS-IKER, UEU)

Kepa Korta (UPV/EHU)

Aitzpea Leizaola (UPV/EHU, UEU)

Elizabete Manterola (UPV/EHU, UEU)

Ismael Manterola (UPV/EHU, UEU)

Alazne Porcel (UPV/EHU)

Blanca Urgell (UPV/EHU)

Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea

Josu Amezaga (UPV/EHU, UEU)

Aitor Bengoetxea (UPV/EHU, UEU)

Eneko Bidegain (MU, UEU)

K. Josu Bijuesca (Deustuko Unibertsitatea)

Lore Erriondo (UPV/EHU, UEU)

M^aLuz Esteban (UPV/EHU, UEU)

Mikel Iruskieta (UPV/EHU, UEU)

Xabier Landabidea (Deustuko Unibertsitatea, UEU)

Ixusko Ordeñana (UPV/EHU)

Iñaki Peña (Deustuko Unibertsitatea)

Zientziak eta Natur Zientziak

Elizabete Alberdi (UPV/EHU, UEU)

Arantza Aldezabala (UPV/EHU, UEU)

Estibaliz Apiñaniz (UPV/EHU, UEU)

Arturo Apraiz (UPV/EHU, UEU)

Itziar Aretxaga (INAOE)

Inmaculada Arostegui (UPV/EHU, UEU)

Jose Miguel Campillo (UPV/EHU, UEU)

Arturo Elosegi (UPV/EHU, UEU)

Nestor Etxebarria (UPV/EHU, UEU)

Maite Insausti (UPV/EHU)

Kizkitza Insausti (NUP)

Marian Iriarte (UPV/EHU)

Natxo Irigoien (NUP)

Josu Jugo (UPV/EHU, UEU)

Ingeniaritza eta Arkitektura

Gorka Azkune (Deustuko Unibertsitatea)
Haritza Camblong (UPV/EHU, ESTIA, UEU)
Unai Fernandez de Betoño (UPV/EHU, UEU)
Igor Peñalva (UPV/EHU)
Olatz Perez de Viñaspre (UPV/EHU, UEU)
Maialen Sagarna (UPV/EHU)
Ane Sarasola (UPV/EHU)
Arkaitz Zubiaga (University of Warwick)

Osasun Zientziak

Rafael Aldabe (CIMA, NU)
Jose Ramon Bilbao (UPV/EHU, Gurutzetako Ospitalea)
Koldo Callado (UPV/EHU, UEU)
Izaskun Elezgarai (UPV/EHU, UEU)
Felix Elortza (Biogune, UEU)
Karlos Ibarguren Olalde (Osakidetza)
Xabier Isasi (UPV/EHU, UEU)
Nerea Osinalde (UPV/EHU)
Izortze Santin (UPV/EHU)

Beste gainbegirale batzuk

Bakarne Altonaga (UPV/EHU, UEU)
Ander Altuna (UEU)
Noelia Andollo (UPV/EHU)
Aritz Bilbao (Deustuko Unibertsitatea)
Unai del Burgo (UPV/EHU, UEU)
Ibon Cancio (UPV/EHU, UEU)
Idoia Fernandez (UPV/EHU, UEU)
Vanessa García (UPV/EHU)
Unai Lopez-Novoa (Cardiff University)
Jose Martin (UPV/EHU, UEU)
Iñigo Mendialdua (UPV/EHU)
Bea Narbaiza (UPV/EHU)
Jose Antonio Pascual (UPV/EHU)
Igor Rodriguez (UPV/EHU)
Josean Rodriguez (UPV/EHU)
Ainara Sagarna (UPV/EHU)
Itziar San Martin (UPV/EHU, UEU)
Ander Soraluze (UPV/EHU, UEU)
Joseba Zalakain (Siis, Dokumentazio eta Ikerketa Zentroa)
Jon Zarate (UPV/EHU)
Mario Zubiaga (UPV/EHU, UEU)

Batzorde Dinamizatzailea

Haizpea Abrisketa (CNRS-IKER Euskara eta euskal testuen ikerketa-zentroa)
Begoña Altuna (UPV/EHU)
Joseba Fernandez de Landa (UPV/EHU)
Pauline Guelle (UPPA, IUV, UPV/EHU)
Nagore Elu (UPV/EHU)

Batzorde Teknikoa

Ane Sarasua (UEUko Idazkari nagusia)

- Idoia Torregarai (komunikazio arduraduna)
- Ainhoa Latatu (koordinatzaile akademikoa)
- Ander Altuna (hizkuntza zuzentzailea)

Ikerketa-talde laguntzaileak

- ELEBILAB. UPV/EHUren Elebitasunaren Laborategia.
- UPV/EHUko hizkuntzaren tratamendu automatikoaren inguruko IXA Ikerketa Taldea
- UPV/EHUko “Jokabidearen Ekologia eta Eboluzioa” ikerketa taldea.
- NOR. UPV/EHUko Ikus-entzunezko Komunikazio eta Publizitate Saileko Ikerketa Taldea.
- UPV/EHUko Neuropsikofarmakologia ikerketa taldea.
- UPV/EHUko Sinapsi-neuroanatomiaaren ultraegitura eta funtziorako laborategia.

Aldizkari zientifiko laguntzaileak

- ALDIRI. Arkitekturaren inguruko adizkaria
- BAT. Soziolinguistikan eta glotopolitikan espezializatutako aldizkaria.
- EKAIA. Euskal Herriko Unibertsitateko zientzia eta teknologi aldizkaria da.
- ELHUYAR ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA aldizkaria.
- JAKIN. Giza eta gizarte-zientzien alorreko kultur aldizkaria.
- OSAGAIZ. Osasun zientzien aldizkaria
- SENEZ. EIZIE elkarteak kudeatzen duen itzulpengintzako arloko aldizkaria.
- UZTARO. UEUk kudeatzen duen giza eta gizarte-zientziei buruzko aldizkaria.

Hizlari gonbidatuak

- Francesco d’Errico, CNRS-Bordeleko Unibertsitatean Ikerketa Zuzendaria eta Bergeneko Unibertsitatean irakaslea.
- Jesus Mari Txurruka, UPV/EHUko irakasle eta ikertzailea izandakoa. UEUkidea.
- Gwerfyn Wyn Roberts, Galeseko Bangor University-ko School of Health Sciences-eko irakasle titularra izandakoa.
- Josu Martinez, UPV/EHUko ikus-entzunezko Komunikazio saileko ikerlari eta irakaslea da, zinema arloan.

Tailerrak

- «Artikuluak, tesia eta bestelako dokumentu zientifikoak sortu LaTeXekin». Igor Ruiz Agundez. BilbaoTIK – Bilboko Udalaren Informatika Zentroa.
- «Prozedura feministak: ezagutza, ikerketa eta herrigintza». Miren Aranguren. Emagin Formazio eta Ikerketa Feminista Elkarteko kidea eta ikerketa proiektuen arduraduna.
- «Argitalpen zientifikoetarako mapen sorkuntza». Pili Martinez eta Aitor Bastarrika. Geomatika Aplikatua Ikerketa Taldeko partaideak eta UPV/EHUko Geoinformatikako Berezko Tituluko irakasleak.
- HITZALDIA: 1757ko lapurterazko gutunak: jarraipena. Xarles Bidegain. Paueko eta Aturrialdeko Unibertsitatean Euskal Literatura eta Euskal Mintzairako katedraduna, euskaltzain eta ikertzailea.
- Datuak ikusarazteko, Infografia. Joxan Apeztegia. BERRIAko infografista.
- Ikerkuntzan kontuan hartu behar diren gako juridikoak. Ion Turrillas. IKT abokatua, UPV/EHU.
- Zelan aletu zure ikerketa akademiatik harago. Uxune Martinez. Euskampus Fundazioko Kultura Zientifikoko eta Berrikuntza Unitateko Zabalkunde Zientifikorako arduraduna.

- Tailer-bisitak:
 - Euskal Herriko Laborantza Ganbara.
 - ESTIA Ingeniaritza Eskola.

Mahai-ingurua

«Baxoaren ondotik zer? Nazio garapenerako giltzak». Gidaria: Pauline Guelle (UPPA, IUV, UPV/EHU).

Zelulaz kanpoko matrizeko hevin proteinaren ikerketa giza garunean

Núñez, Amaia¹; Vialou, Vincent²; Dumas, Sylvie³; Callado, Luis F.^{1,4} eta Erdozain, Amaia M.^{1,4}

¹ Farmakologia saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU

² Neurosciences Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS – IBPS)

³ Oramacell, Paris, France

⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)

amaia.nunez@ehu.eus

Laburpena

Azkeneko urteotan egindako ikerketa anitzek konexio neuronaletan laugarren egitura batek eragin zuzenak dituela frogatu dute: zelulaz kanpoko matrizea (ZKMa) hain zuzen ere. ZKMko proteina gehienak garunaren garapena ematen den bitartean espresatzen dira, eta garun helduan haien adierazpenaren murrizpena jasaten dute.

Hala ere, hevin proteina maila altuetan espresatzen jarraitzen da garun helduan, non plastikotasun neuronalean parte hartzen duen. Horretaz gain, hevinen adierazpenaren aldaketak neurogarapeneko gaixotasunekin eta gaitz neuropsikiatrikoekin erlazionatu dira.

Beraz, ikerketa proiektu honen helburua giza garun *postmortem*-ean hevin ikertzea da, Western Blot eta FISH teknikak erabiliz. Ikerlan honek, hevin patologiarik gabeko subjektu helduen garunetan espresatzen dela ezagutarazi du.

Hitz gakoak: sinapsia, zelulaz kanpoko matrizea, astrozitoak, hevin, Western Blot, *in situ* egindako hibridazio fluoreszentea.

Abstract

Recent studies have described a fourth structure in neuronal connections, which produces direct effects on them: the extracellular matrix (ECM). Most of ECM proteins are expressed during brain development, and their expression is reduced in adult brain.

However, hevin protein remains highly expressed in adult brain, where it contributes to neuronal plasticity. Besides that, alterations in hevin's expression are related to neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders.

Therefore, the objective of this research project is to study hevin's expression in postmortem human brain, by Western Blot and FISH techniques. The present work reveals the presence of hevin in the brain of non-pathologic adult subjects.

Keywords: synapse, extracellular matrix, astrocytes, hevin, Western Blot, fluorescence in situ hybridization.

1. Sarrera eta motibazioa

Gero eta onartuago dago estresak giza garunean ondorioak eragiten dituela. Azkenengo ikerkuntzek estresa hainbat gaitz neuropsikiatrikoekin erlazionatzen dute zuzen-zuzenean, hala nola, depresioarekin, eskizofreniarekin edo adikzioetara eramaten duen sari-memoriarekin (Gomes eta Grace, 2017; Liu eta Alloy, 2010; Shinohara et al., 2018). Gaitz psikiatrikoen sintomak sari-prozesamenduaren alterazioekin, disfuntzio kognitiboekin eta afektibitate- eta jarrera- disfuntzioekin erlazionatuta daude (Nestler eta Carlezon, 2006). Disfuntzio hauek plastikotasun sinpatikoak eta morfologia neuronalaren aldaketek eragindako garun-aktibitatearen alterazioekin lotu dira (Duman eta Aghajanian, 2012). Alzheimerren gaixotasuna aipatutako mekanismo molekularren adibide ona da, astrozitoen disfuntzioaren ondoriozko plastikotasun sinaptiko anormalarekin erlazionatu egin baita (Acosta et al., 2017).

Testuinguru honetan, jakina da astrozitoak sinaptogenesi neuronalen erregulatzaileak direla. Beraz, nerbio sistema zentralaren (NSZ) garapenean gaitz neuronalak ez gertatzeko ezinbesteko funtzioa dute (Eroglu, 2009; Mendis et al., 1996). Horrelako erregulazioa burutzeko, astrozitoek zenbait molekula jariatzen dituzte garunaren garapena ematen den bitartean. Molekula hauek proteina matrizelularrak dira eta zelulaz kanpoko matrizea (ZKM) osatzen dute (Allen, 2013; Jones eta Bouvier, 2014). ZKMak neurona presinpatikoa, neurona postsinaptikoa eta gliarekin batera, sinapsi tetrapartita bezala izendatu izan den sinapsiaren oinarritzko unitate funtzionala

osatzen du (Dityatev eta Rusakov, 2011). Astrozitoek hainbat proteina matrizelularrak espresatzen eta jariatzen dituzte: tronboespondinak, SPARC, hevin eta tenaszina C, besteak beste (Jones eta Bouvier, 2014).

Lan honetan hevin (SPARC-like1 edo SC1 ere deritzo) proteina aztertuko da. Hevin berezia egiten duen ezaugarria, beste proteina matrizelularrak ez bezala, garun helduan maila altuetan espresatzen jarraitzen dela da. Eta honek iradokitzen du hevinek helduetan etengabe ematen den plastikotasun neuronalean eraginak dituela, eta ez bakarrik garatzen ari den burmuinean (Jones eta Bouvier, 2014). Hevin sinapsi glutamatergikoen tarte sinaptikoan agertzen den glikoproteina bat da, eta zelula-zelula eta zelula-ZKM elkarrekintzan parte hartuz zelulen oinarritzko prozesuetan eragiten du: morfologian, ugaritzean eta migrazioan (Girard eta Springer, 1996; Gongidi et al., 2004; Johnston et al., 1990). Hevinen funtzio azpimarragarrienetako bat sinapsi kitzikatzaile hauen eraketa sustatzea da, sinapsi glutamatergikoen orekatzaile moduan jokatzuz (Kucukdereli et al., 2011). Beraz, garun-kortexaren garapena ematen ari den bitartean, sinapsi talamokortikal egokiak sortzeko eta arantza dendritikoak heltzeko beharrezkoa da (Risher et al., 2014). Funtzio honen mekanismo molekularra orain dela gutxi ezagutu da: hevin neurexina deritzon proteina presinaptikoa eta neuroligina deritzon proteina postsinaptikoa lotzen ditu. Neurexina eta neuroliginaren arteko loturak neurona presinaptikoetan neurotransmisoreen jariaketa eragiten du sinapsi axo-dendritikoetan. Bi proteina hauek, berez, ezin dira lotu baina hevinek zubi bat osatzen du beraien artean. Hortaz, sinapsi glutamatergikoen egonkortasuna eta sinapsi talamokortikalen konexioetan plastikotasuna sustatzen ditu (Singh et al., 2016).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1. Hevin hainbat patologiatan

Hevinen adierazpenaren aldaketak disfuntzio neuronalekin, neurogarapeneko gaitzekin, gaixotasun neurologikoekin edota gaitz psikiatrikoekin erlazionatu egin da:

- 1) Autismoa pairatzen duten subjektuetan hevinen eta hainbat neurexinen eta neuroliginen mutazioak aurkitu direnez, hevinek sortzen duen sinapsien arteko loturak autismoan garrantzia izan dezakeela iradoki da (De Rubeis et al., 2014). Gainera, gaixo hauengan konexio talamokortikal anormalak daudela ikusi da (Nair et al., 2013).
- 2) Autismo eta depresioa bezalako gaitz neuropsikiatrikoetan hevinen adierazpena murriztuta dago (Purcell et al., 2001; Zhurov et al., 2012).
- 3) Estres sozialeko animalia eredu batean (social defeat) hevinek erresilientzia sustatzen du (estresaren aurrean eragin negatiboak ez izateko gaitasuna). Horretaz gain, depresio motako sintomen agerpena murriztu dezake (Vialou et al., 2010).
- 4) X hauskorraren sindromea (Fragile X Syndrome, FXS) bezalako neurogarapeneko gaitzetan hevin proteinaren adierazpena aldatuta dago (Wallingford et al., 2017).
- 5) Alzheimer edo Parkinson gaixotasunak pairatzen duten gaixoen likido zefalorrakideoan (LZR) hevinen gainadierazpena ikusi da (Yin et al., 2009).
- 6) Hevinen adierazpenaren mailak igotzen dira garun-infartu iskemiko baten ondoren, agian, infartuaren ondoriozko heriotza neuronala orekatzeko helburuarekin (Lively et al., 2011).
- 7) Alkoholismoaren kasuan ikusi dugu saguen accumbens nukleoan (drogen sari-gaitasunean parte hartzen duen garun atala) eragindako hevinen adierazpenaren murrizpenak alkoholaren kontsumoa handitzen duela. Era honetan, bai alkoholismoan bai beste substantziekiko menpekotasunean hevinen eginkizun garrantzitsua antzeman dugu.

2.2. Helburuak

Orohar, ikerketa lerro honek hevin proteinak konexio neuronalean, garunaren funtzionamenduan eta gaixotasun psikiatrikoetan duen betebeharrari buruzko informazioa handitzea du helburu. Nahiz eta hevin proteina matrizelularren ikerketak saguan anitzak izan diren, oraindik ez da proteinaren azterketa sakonik egin giza garunean.

Beraz, lan honen helburu orokorra hurrengo izango da: Western Blot eta FISH (*in situ* egindako hibridazio fluoreszentea) tekniken bitartez hevin proteinaren adierazpena karakterizatzea *postmortem* giza garunean, subjektu kontrolak (patologiarik gabekoak) erabiliz. Oinarritzko karakterizazio hau behar-beharrezkoa da ondoren hevin proteinaren adierazpena neurtu ahal izateko gaixotasun neuropsikiatriko ezberdinak pairatu dituzten gizakien garunetan, eta horrela, gaixotasun hauen fisiopatologia izan dezakeen funtzioa ulertzeko.

3. Ikerketaren muina

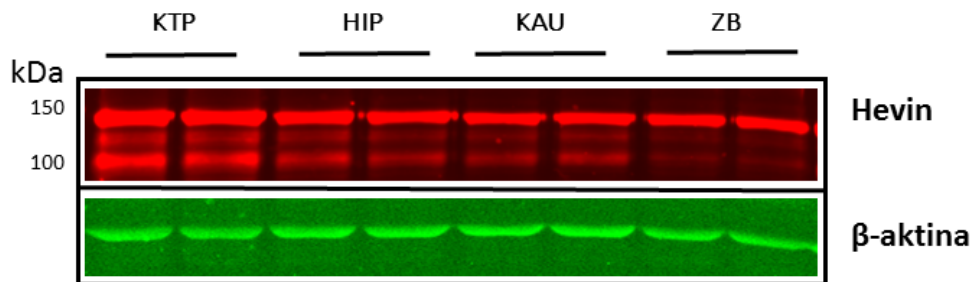
3.1. Hevin proteinaren karakterizazioa Western Blot teknikaren bitartez

Western Blot teknikaren bitartez giza garun ehunean hevin proteina detektatu eta bere adierazpena 4 garun atalen artean (kortex prefrontala, hipokanpoa, nukleo kaudatua eta zerebeloa) konparatu da semikuantifikazioa eginez. Teknika honetan lehenengo eta behin, laginean dauden proteinak tamainaren arabera banatzen dira, eta ondoren, aztertuko den proteinari espezifikoki lotzen zaion antigorputz bat erabiliz (antigorputz primarioa) proteina hori markatu egiten da. Segidan, antigorputz fluoreszente bat erabiliz antigorputz primarioa markatu egiten da eta honen fluoreszentsia infragorri irudi sistema baten bitartez proteinaren seinale immunoerreaktiboa detektatzen da.

Erabilitako lagin kantitateak kasu guztietan berdinak izan direla ziurtatzeko hevinen banden seinale immunoerreaktiboa aktinaren bandaren seinalearekin normalizatu dira. β -aktina era konstitutibo batean espresatzen den proteina bat denez, aztertzen diren proteinen seinale immunoerreaktiboa normalizatzeko erabili daiteke.

Prozesu honi esker hevin proteinaren bi tamaina ezberdineko formen presentzia detektatu ditugu garun atal guztietan, bata 130 kDa-ekoa eta bestea 100 kDa-ekoa. Garun atalen konparaketaren kasuan hevinen bi formek kortex prefrontalean erakutsi dute seinale immunoerreaktibo handiena (1. irudia).

1. irudia. 5 subjektuen adierazgarria den subjektu baten Western Blot irudia. Gorriz hevinen bi formen bandak (130 kDa-ekoa eta 100 kDa-ekoa) eta berdez aktinaren bandak. 4 garun ataletan lagin bakoitzaren bi erreplika egin dira. (KTP: kortex prefrontala, HIP: hipokanpoa, KAU: nukleo kaudatua, ZB: zerebeloa)



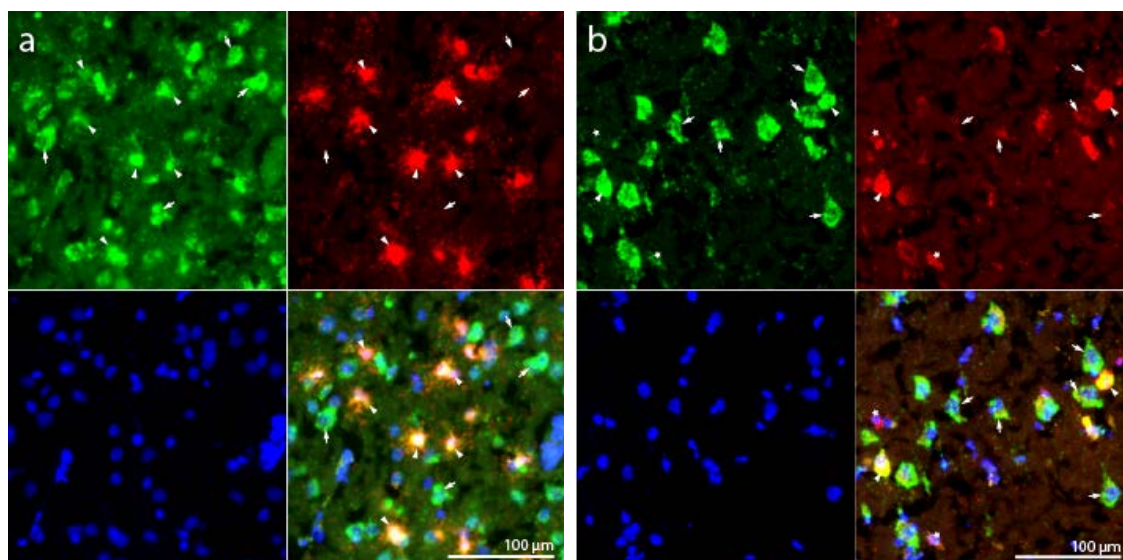
3.2. Hevin proteinaren detekzioa FISH teknikaren bitartez

FISH (*in situ* egindako hibridazio fluoreszente bikoitza) teknikaren bitartez hevin proteinarentzako kodifikatzen duen mRNA (RNA mezularia) detektatu dezakegu zelula mota ezberdinetan. Kasu honetan, oligonukleotidoz osatutako markatutako zunda batekin hevinen mRNA antzeman egin dugu giza garun *postmortem*-ean, zehazki kortex prefrontalean. Hevinen mRNA markatzeaz gain beste hiru mRNA markatzaile erabili ditugu: GLAST (astrozitoen markatzailea), GAD67 (neurona GABAergikoen markatzailea) edota VGLUT1 (neurona glutamatergikoen markatzailea). Gainera, esperimentu guztietan nukleo zelularrak markatu dira DAPI erabiliz.

Zunda hauei esker ikusi izan dugu, alde batetik, hevinen mRNA astrozitoen markatzailearekin aldi berean espresatzen dela. Eta bestetik, hevinen mRNA neurona GABAergikoen markatzailearekin baterako adierazpenaduela (2.irudia). Neurona

glutamatergikoen kasuan gutxi batzuk aldi berean espresatu dute hevinen mRNA. Beraz, esan dezakegu giza kortex prefrontalean hevin astrozitoetan eta neurona GABAergikoetan espresatzen dela batez ere.

2. irudia. 5 subjektuen adierazgarria den subjektu baten FISH irudiak. (a) Hevin astrozitoetan eta (b) hevin neurona GABAergikoetan. Berdez hevinen mRNA, gorriz GLAST (a) eta GAD67 (b), urdinez DAPI eta horiz hevinen mRNA GLAST-rekin (a) edo GAD67-rekin (b) gainjarrita (gezi zuriek zelulak adierazten dituzte) (Mongrédien et al., 2019).



4. Ondorioak

Aipatu den bezala, orain arte dagoen hevinari buruzko informazio gehiena karraskarietan egindako ikerkuntzetatik datorrenez, proteina hau giza garunean ikertzea funtsezkoa da. Ikerlan honek hevin patologiarik gabeko subjektu helduen garunetan espresatzen dela ezagutarazi du, hevinek helduen NSZean funtzio fisiologikoak betetzen dituela iradokiz. Honetaz gain, kortex prefrontala aztertutako garun atalen artean proteina honetan aberatsena dela ikusi da. Bestalde, hevin zelula mota ezberdinetan agertzen dela frogatu da, bai astrozitoetan eta bai neurona GABAergikoetan. Nahiz eta hevinek giza garunean duen funtzio zehatza ezagutzeko informazio gehiago beharrezkoa izan, lortutakoa hevinen adierazpen profila gaitz neuropsikiatriko ezberdinetan agertzen denarekin konparatzea ahalbidetzen du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Behin hevinen adierazpen profila giza garun osasuntsuan deskribatuta dagoela, emango dugun hurrengo pausua hevin bi gaixotasun psikiatrikoetan ikertzea izango da: depresioan eta alkoholismoan. Depresioaren kasuan, hevin ikertzea erabaki dugu erresilientzia sustatzen duela ikusita, ematen duelako depresioa pairatzeko arriskua murrizten duela eta beraz, subjektu depresiboak hevinen espresioa murriztuta erakutsiko lukete (Vialou et al., 2010). Alkoholismoaren kasuan, hevin alkoholarekiko menpekotasunaren garapenean edota menpekotasunaren ondoriozko aldaketa neurologikoetan parte har dezakeela dugu hipotesi bezala. Aurretiko esperimientuetan hevinen espresioaren murrizpena substantzieikiko menpekotasuna garatzeko funtsezko saguen garun atal batetan alkoholaren autokontsumoa handitzen duela ikusi dugulako. Hastear dagoen proiektu hau burutzeko depresioa pairatzen zuten subjektuen eta alkoholismoa pairatzen zuten subjektuen giza garun *postmortem*-ak erabiliko dira.

6. Erreferentziak

Acosta, C., Anderson, H.D., Anderson, C.M. (2017). Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J. Neurosci. Res.*, 95, 2430–2447.

- Allen, N.J. (2013). Role of glia in developmental synapse formation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 23, 1027–1033.
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A.P., Poultney, C.S., Samocha, K., Cicek, A.E., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Fu, S.-C., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P.F., Brownfeld, J.M., Cai, J., Campbell, N.J., Carracedo, A., Chahrour, M.H., Chiocchetti, A.G., Coon, H., Crawford, E.L., Crooks, L., Curran, S.R., Dawson, G., Duketis, E., Fernandez, B.A., Gallagher, L., Geller, E., Guter, S.J., Hill, R.S., Ionita-Laza, I., Gonzalez, P.J., Kilpinen, H., Klauck, S.M., Klevzon, A., Lee, I., Lei, J., Lehtimäki, T., Lin, C.-F., Ma'ayan, A., Marshall, C.R., McInnes, A.L., Neale, B., Owen, M.J., Ozaki, N., Parellada, M., Parr, J.R., Purcell, S., Puura, K., Rajagopalan, D., Rehnström, K., Reichenberg, A., Sabo, A., Sachse, M., Sanders, S.J., Schafer, C., Schulte-Rüther, M., Skuse, D., Stevens, C., Szatmari, P., Tammimies, K., Valladares, O., Voran, A., Wang, L.-S., Weiss, L.A., Willsey, A.J., Yu, T.W., Yuen, R.K.C., Cook, E.H., Freitag, C.M., Gill, M., Hultman, C.M., Lehner, T., Palotie, A., Schellenberg, G.D., Sklar, P., State, M.W., Sutcliffe, J.S., Walsh, C.A., Scherer, S.W., Zwick, M.E., Barrett, J.C., Cutler, D.J., Roeder, K., Devlin, B., Daly, M.J., Buxbaum, J.D. (2014). Synaptic, transcriptional, and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, 515, 209–215.
- Dityatev, A., Rusakov, D.A. (2011). Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 21, 353–359.
- Duman, R.S., Aghajanian, G.K. (2012). Synaptic Dysfunction in Depression: Potential Therapeutic Targets. *Science*, 338, 68–72.
- Eroglu, C. (2009). The role of astrocyte-secreted extracellular matrix proteins in central nervous system development and function. *J. Cell Commun. Signal.*, 3, 167–176.
- Girard, J.-P., Springer, T.A. (1996). Modulation of Endothelial Cell Adhesion by Hevin, an Acidic Protein Associated with High Endothelial Venules. *J. Biol. Chem.*, 271, 4511–4517.
- Gomes, F.V., Grace, A.A. (2017). Adolescent Stress as a Driving Factor for Schizophrenia Development—A Basic Science Perspective. *Schizophr. Bull.*, 43, 486–489.
- Gongidi, V., Ring, C., Moody, M., Brekken, R., Sage, E.H., Rakic, P., Anton, E.S. (2004). SPARC-like 1 regulates the terminal phase of radial glia-guided migration in the cerebral cortex. *Neuron*, 41, 57–69.
- Johnston, I.G., Paladino, T., Gurd, J.W., Brown, I.R. (1990). Molecular cloning of SC1: A putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to osteonectin/BM40/SPARC. *Neuron*, 4, 165–176.
- Jones, E.V., Bouvier, D.S. (2014). Astrocyte-Secreted Extracellular Matrix Proteins in CNS Remodelling during Development and Disease. *Neural Plast.*, 2014, 1–12.
- Kucukdereli, H., Allen, N.J., Lee, A.T., Feng, A., Ozlu, M.I., Conatser, L.M., Chakraborty, C., Workman, G., Weaver, M., Sage, E.H., Barres, B.A., Eroglu, C. (2011). Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 440–449.
- Liu, R.T., Alloy, L.B. (2010). Stress generation in depression: A systematic review of the empirical literature and recommendations for future study. *Clin. Psychol. Rev.*, 30, 582–593.
- Lively, S., Moxon-Emre, I., Schlichter, L.C. (2011). SC1/hevin and reactive gliosis after transient ischemic stroke in young and aged rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 70, 913–929.
- Mendis, D.B., Shahin, S., Gurd, J.W., Brown, I.R. (1996). SC1, A SPARC-related glycoprotein, exhibits features of an ECM component in the developing and adult brain. *Brain Res.*, 713, 53–63.
- Mongrédien, R., Erdozain, A.M., Dumas, S., Cutando, L., del Moral, A.N., Puighermanal, E., Rezai Amin, S., Giros, B., Valjent, E., Meana, J.J., Gautron, S., Callado, L.F., Fabre, V., Vialou, V. (2019). Cartography of hevin-expressing cells in the adult brain reveals prominent expression in astrocytes and parvalbumin neurons. *Brain Struct. Funct.* doi: 10.1007/s00429-019-01831-x.
- Nair, A., Treiber, J.M., Shukla, D.K., Shih, P., Müller, R.-A. (2013). Impaired thalamocortical connectivity in autism spectrum disorder: a study of functional and anatomical connectivity. *Brain*, 136, 1942–1955.
- Nestler, E.J., Carlezon, W.A. (2006). The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biol. Psychiatry*, 59, 1151–1159.
- Purcell, A.E., Jeon, O.H., Zimmerman, A.W., Blue, M.E., Pevsner, J. (2001). Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurology*, 57, 1618–28.

- Risher, W.C., Patel, S., Kim, I.H., Uezu, A., Bhagat, S., Wilton, D.K., Pilaz, L.-J., Singh Alvarado, J., Calhan, O.Y., Silver, D.L., Stevens, B., Calakos, N., Soderling, S.H., Eroglu, C. (2014). Astrocytes refine cortical connectivity at dendritic spines. *eLife*, 3, 1-24.
- Shinohara, F., Asaoka, Y., Kamii, H., Minami, M., Kaneda, K. (2018). Stress augments the rewarding memory of cocaine via the activation of brainstem-reward circuitry. *Addict. Biol.* doi: 10.1111/adb.12617.
- Singh, S.K., Stogsdill, J.A., Pulimood, N.S., Dingsdale, H., Kim, Y.H., Pilaz, L.-J., Kim, I.H., Manhaes, A.C., Rodrigues-Junior, W.S., Pamukcu, A., Enustun, E., Ertuz, Z., Scheiffele, P., Soderling, S., Silver, D.L., Ji, R.-R., Medina, A.E., Eroglu, C. (2016). Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging *Nrx1α* and *NL1* via Hevin. *Cell*, 164, 183–196.
- Vialou, V., Robison, A.J., LaPlant, Q.C., Covington, H.E., Dietz, D.M., Ohnishi, Y.N., Mouzon, E., Rush, A.J., Watts, E.L., Wallace, D.L., Iniguez, S.D., Ohnishi, Y.H., Steiner, M.A., Warren, B., Krishnan, V., Neve, R.L., Ghose, S., Berton, O., Tammenga, C.A., Nestler, E.J. (2010). Δ FosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nat. Neurosci.*, 13, 745–752.
- Wallingford, J., Scott, A.L., Rodrigues, K., Doering, L.C. (2017). Altered Developmental Expression of the Astrocyte-Secreted Factors Hevin and SPARC in the Fragile X Mouse Model. *Front. Mol. Neurosci.*, 10, 1-12.
- Yin, G.N., Lee, H.W., Cho, J.-Y., Suk, K. (2009). Neuronal pentraxin receptor in cerebrospinal fluid as a potential biomarker for neurodegenerative diseases. *Brain Res.* 1265, 158–170.
- Zhurov, V., Stead, J.D.H., Merali, Z., Palkovits, M., Faludi, G., Schild-Poulter, C., Anisman, H., Poulter, M.O., (2012). Molecular Pathway Reconstruction and Analysis of Disturbed Gene Expression in Depressed Individuals Who Died by Suicide. *PLoS ONE*, 7, 1-13.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa lan honek Fundación Vital eta ERAB-en (The European Foundation For Alcohol Research) (EA 1819) diru-laguntzak jaso ditu. Nuñez A. Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza sailaren Doktoratu Aurreko Programaren laguntza baten jabea da.

Bektore biral terapeutiko baten efikazia eta toxizitatearen ebaluazioa Wilson gaixotasundun saguetan

Murillo, Oihana^{1,2*}; Moreno, Daniel^{1,2*}; Gazquez, Cristina^{1,2*}; Barberia, Miren^{1,2};
Cenzano, Itziar^{1,2}; Uriarte, Iker^{2,3}; Navarro, Iñigo⁴; Ferrer, Veronica⁵; Bénichou, Bernard⁵;
Combal, Jean Philippe⁵; Hernandez-Alcoceba, Ruben^{1,2†}; González Aseguiolaza, Gloria^{1,2,3†}.

¹ Terapia genikoa eta geneen erregulazio programa, CIMA (ikerketa biomediko aplikaturako zentroa), Nafarroako unibertsitatea, Iruñea, Nafarroa.

² IDISNA, Nafarroako osasun ikerketa institutua, Iruñea Nafarroa.

³ CIBERehd, Carlos III osasun institutua, Iruñea, Nafarroa.

⁴ Kimika eta lurzoru zientziak departamentua, Nafarroako unibertsitatea, Iruñea, Nafarroa.

⁵ Vivet-Therapeutics SAS, Paris, Frantzia.

mbarberiau@unav.es

Laburpena

Wilson gaixotasuna (WD), gaixotasun monogeniko arraro bat da herentzia autosomiko errezesiboa duena, non *ATP7B* genean azaltzen diren mutazioen ondorioz elikagaietatik hartzen den kobrea giblean metatzen den toxikotasuna eta kalteak eratu. Egungo tratamenduek albo ondorio handiak dituzte eta ez dute gaixotasuna sendatzen. Hori dela eta tratamendu alternatiboen ikerketa guztiz beharrezkoa da. Ikerketa honetan terapia genikoa erabiliz, 6 asteetako WD-dun saguei falta zaien *ATP7B* proteina bideratu zaie gibelera. Ikerketa tratamenduak, aztertutako parametro gehinak hobetu ditu denbora luzez. Datuek erakusten duten moduan, terapia genikoa etorkizun handiko tratamendua izan daiteke WD sendatzeko.

Hitz gakoak: Wilson gaixotasuna, terapia genikoa, *ATP7B*

Abstract

Wilson disease (WD) is a rare autosomal recessive disorder of copper metabolism in which mutations that appear in ATP7B gene lead to copper accumulation in the liver producing toxicity and liver damage. Treatments for WD have lots of side effects and they don't cure the disease. That's why research in alternative treatments is very necessary to find a cure for them. In this work, gene therapy has achieved to introduce the ATP7B protein in the liver of 6-week-old WD mice model. In the most of the analyzed parameters has achieved to correct them during long period of time. Data indicate that gene therapy could be encouraging treatment for WD.

Keywords: Wilson Disease, gene therapy, ATP7B

1. Sarrera eta motibazioa

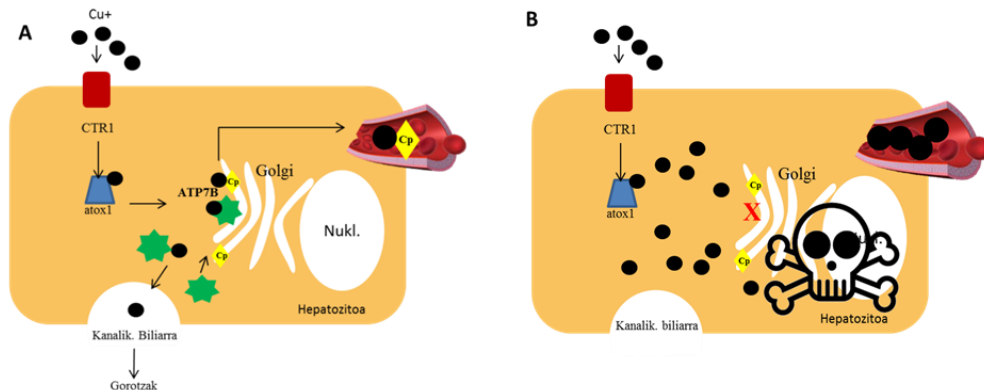
Wilson gaixotasuna (ingelesez Wilson Disease, WD), kobreakin metabolismoan eragina duen gaixotasun genetiko arraro bat da, herentzia autosomiko errezesiboa duena. Gaixotasuna, kobreakin garraiatzailea den *ATP7B* genean (*ATP7B*) azaltzen diren mutazioen ondorioz sortzen da, kobreakin eskrezio fisiologikoan eraginez (Patil et al., 2013 ;Roberts et al., 2003).

Kobrea, elementu esentziala da, kopuru oso txikiak beharrezkoak direlarik. Izane ere, kofaktore oso garrantzitsua da prozesu zelular ezberdinetan inplikaturik dauden entzimentzat, hala nola, arnasketa zelularrean inplikaturik daudenak, etab (Bandmann et al., 2015).

Kobrea hesteetatik hartu eta gero, gibelera zeluletara garraiatua izaten da. Behin hepatozitoetan, kobrea proteina ezberdinen bitartez garraiatua izaten da, *ATP7B* proteinara iristen den arte. *ATP7B* proteina, hepatozitoen Golgi aparatuko *trans*-bidean kokatzen da eta behin kobrea lotua duela, zeruloplasminari (Cp) igaro egiten dio, hau ere *trans*-Golgi bidean kokatuta dagoelarik (Roberts et al., 2003; Bandmann et al., 2015). Kobrea zeruloplasminari

lotuta odol zirkulaziora ateratzen da, gorputz osoko zeluletara kobrea barreatuz modu seguruan. Hepatozitoetara gehiegizko kobrea heltzen denean, ATP7B proteina gai da *trans*-Golgi bidetik behazun hodixkaren mintzera lekualdatzeko eta behazun hodixkara eskretatzeko gehiegizko kobrea, gorotz bitarteko eskrezio fisiologikoa burutuz (1.irudia) (Murillo et al., 2016; Lutsenko et al. 2008).

1. irudia. Kobrearen metabolismoa paziente osasuntsuetan eta WD pazienteetan. A. Paziente osasuntsua. B. WD pazienteak. **Cu⁺**: kobrea. **CTR1**: kobre garraiatzailea 1. **CP**: zeruloplasmina. Patil et al. ClinExpHepatol (2013)-etik modifikatua.



WD duen pazienteetan, *ATP7B* genean azaltzen diren mutazioen ondorioz, ATP7B proteina ez da sintetizatzen edo ez da funtzionala eta beraz, kobrea ezin da zeruloplasminari lotu, ezta behazun hodixkatik eskretatu. Hori dela eta, kobrea hepatozitoetan progresiboki metatzen doa. Metaketa honek toxizitatea eta oxigeno erradikal askeen produkzioa eragiten du, zeluletan kalteak eraginez. Kalte hauen ondorioz, hepatitis edo/eta zirrosia ager daiteke besteen artean. Gainera, zelulak hiltzen direnean, metatutako kobrea modu askean ateratzen da odol zirkulaziora, beste ehunetan metatuz eta kaltetuz tratatzen ez bada. Hala nola, erretinan (Kaysner Fleischer ring), garunean, desorden neurologikoak eratzuz (dystonia, antzietatea, jokabide asaldurak etab.) edota giltzurrunetan, kobrea gertuaren bitartez kanporatzen delarik modu ez-fisiologikoan (Bandmann et al., 2015).

Tratamenduei dagokionez, helburua kobre mailak murriztea da. Horretarako, kelatzaileak erabiltzen dira absortzioa murrizteko eta diuresi bitartez eskretatzeko. Dena den erabilitako tratamenduek albo ondorio anitzak dituzte eta tratamendu sendakor bakarra gibel transplantatzea da. Gibel transplantatzea muturreko kasuetan ematen da non pazienteek ez duten tratamenduari erantzuten. Hala ere, nahiz eta pazienteak transplantatuta izan, kobreak eragindako asaldura neurologikoak adibidez, gehienetan ez dira itzulgarriak. Hori dela eta ordezkio tratamenduen beharra oso handia da (Patil et al., 2013 ;Roberts et al., 2003).

Gaixotasun monogenikoen ikerketan, etorkizun handiko tratamenduetako bat terapia genikoa da. Terapia genikoa gene mutatuaren bertsio zuzendua, beharrezkoak diren zelula edo organoetara bideratzeko, bertsio zuzendua espresa dadin. Geneak, zelula edo organoetara bideratzeko, bektore biralen erabilera izugarri handitu da azken urteetan. Hain zuzen ere, bektore hauen propietateak aldatu eta egokitu egin dira segurtasuna handitzeko eta gaixotasunari egokitzeke (Lundstrom K., 2018). Seguruaren artean bektore adeno-asoziatuak ditugu (Adeno-associated vector ingelesez, AAV), zeintzuk gaixotasun ezberdinak tratatzeko erabili diren eta entsegu klinikoetan emaitza onak eman dituzten, A-hemofilian hain zuzen ere (Greig et al., 2017). Organo jakinak infektatzeko, serotipoak erabiltzen dira, hau da, bektoreek kapsidean dituzten proteinak. Bektoreak kapsidean duen proteinen arabera, gai izango da ehun jakinak efizienteago infektatzeko besteak baino.

WD-ri erreparatuta, AAV baten bitartez, ATP7B genea WD duten sagu gazteetara bideratzea lortu da, eta saguen fenotipoaren zuzenketa lortu ere (Murillo et al., 2016). Erabili diren saguek, ATP7B genearen bigarren exoi osoa delezionatuta dute eta hori dela eta, ez dute ATP7B proteinarik sintetizatzen. Gaixotasun aldetik, oso ongi erreproduzitzen dituzte gaixoei.

ikusitako gibel sintomak. Neurologikoei dagokionez, ez dira ikerketa nahikorik burutu animalia eredu honetan (Lutsenko et al., 2008). Hala ere, bektorearen produkzioan, ATP7B genearen DNA osagarria (cDNA) nahiko handia da, bektorearen klonazio kapazitatea gaindituz. Hori dela eta, bektore terapeutikoaren produkzioaren errendimendua murrizten da (Chamberlain et al., 2016).

Laborategian, ATP7B genearen forma murriztu bat eraiki da, miniATP7B. Gene honek, Wild type (Wt) formaren 489 aminoazido delezionatu dira. Aldaketa horiei dagokionez, ikusia izan da proteinaren produkzioan eta funtzioan aparteko eraginik ez direla sortzen (Yu et al., 2017; Cater et al., 2004).

Ikerketa honetan, anc80 serotipoa duen AAV baten bitartez (AAVanc80), miniATP7B genea WD saguen giblean espresatu nahi izan da, bektore eta gene terapeutikoaren efizientzia eta toxikotasuna aztertzeko.

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa zientifiko honen helburua Anc80 serotipoa duen eta laborategian eratu berri den miniATP7B gene terapeutikoa kodetzen duen AAV baten efizientzia eta toxikotasunaren neurketa da. Bektorearen bitartez, WD pairatzen duten saguen sendapena bilatzen da, toxikotasuna ere ezagutu nahiaz.

Helburua aurrera eramateko, hurrengo azpi-helburuak planteatzen dira:

- 1) Gene terapeutikoaren espresioaren azterketa
- 2) Saguen gernuan kobre kantitatearen murrizpena
- 3) Gibel eta garuneko kobre metaketa murriztea
- 4) Toxikotasunaren azterketa parametro biokimikoen neurketaren bitartez odol serum-ean

3. Ikerketaren muina

3.1. Ikerketaren planteamendua

Aurretik esan bezala, 6 asteetako 6 sagu eme eta 6 sagu ar erabili ziren dosi bakoitzerako (3×10^{10} genoma biral/saguko (gb/sagu), 10^{11} gb/sagu eta 3×10^{11} gb/sagu). Kontrol moduan, WT eta WD duten saguei PBSa (Phosphate buffered saline) injektatu zitzairen. Saguk injektatu eta 14 asteetara (20 aste) saguak hil eta organoen analisisa burutu zen. Analizatutako parametroak eta denbora hurrengo taulan laburbiltzen dira (1.Taula):

1.Taula: 6 asteetako sagu ar zein emeek jasotako tratamendua (dosia), analizatutako parametroak eta laginak hartutako eta analizatutako denbora (a: astea; Gibel: gibela, Gar:garuna, Giltz: Giltzurrunak; P: parametro; Gen: genoma).

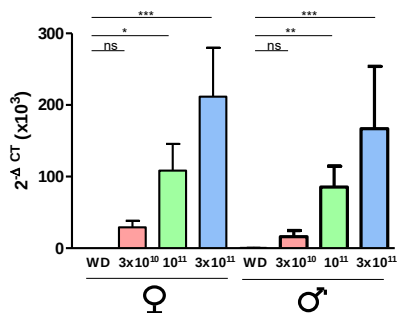
Sexua	Kopurua	Dosia (gb/sagu)	RNA	Gernua	Gib., Gar.	P. biokim
♀	6 WD	PBS	20a	6a(basala), 10a, 15a, 20a	20a	6a(basala), 10a, 15a, 20a
	6 WT	PBS				
	6 WD	3×10^{10}				
	6 WD	10^{11}				
	6 WD	3×10^{11}				
♂	6 WD	PBS	20a	6a (basala), 10a, 15a, 20a	20a	6a(basala), 10a, 15a, 20a
	6 WT	PBS				
	6 WD	3×10^{10}				
	6 WD	10^{11}				
	6 WD	3×10^{11}				

3.2. Gene terapeutikoaren espresioaren analisisa

Hasteko, infekzioa modu egokian eman zela ziurtatzeko, gibleko zeluletan genoma biralen presentzia aztertu zen rt-PCR bitartez DNA genomikoa erauzi eta gero. Datuen arabera infekzioa modu egokian eman zela ziurtatu zen (datu ez eskuragarriak). Genoma biralen presentzia analizatuta, genoma biral horiek lortzen duten gene terapeutikoaren espresioa aztertu zen. Horretarako gibleko zelulen RNA erauzketa burutu zen eta retrotranskripzioaren bitartez cDNA (DNA konplementarioa) lortu zen. Bertan, miniATP7B genearen espresioa rt-PCR

bitartez zehaztu zen. Sagu arrek, nahiz eta genoma biral kantitate txikiago batek gibela iritsi, gene terapeutikoaren espresioa zertxobait handiagoa zela ikusi zen. Gainera, genoma biralen kasuan bezala, injektatutako dosi altuenak miniATP7B espresio handiena lortu zuen, estatistikoki adierazgarria izanik (2. irudia).

2. irudia. Gene terapeutikoaren espresioaren analisisa WD pairatzen duten saguek AAVanc80-miniATP7B bektorearekin infektatu eta 14 asteetara. Espresio genikoa GAPDH-ren bitartez normalizatu da. Datuen konparaketarako anova test-a erabili da; ns: ez adierazgarria, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

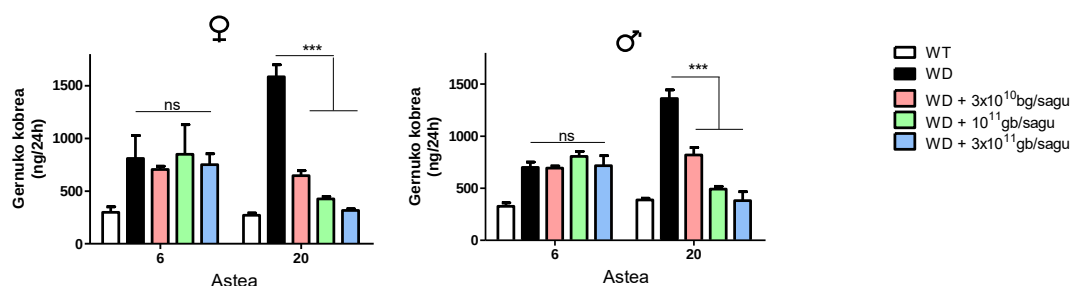


3.3. Gernuko kobreakaren analisisa

Gernuko kobreakaren analisisa, grafito kamara metodo kimiko-analitikoaren bitartez burutu zen. Saguak injektatu eta 4 asteetara (10 aste) gernuko kobreakaren kontzentrazioa tratatutako saguetan murriztu zen, dosi dependentzia aurkeztuz (datu ez eskuragarriak). Tendentzia berdina azaldu zen injekzioetik 8 asteetara (15 asteko bizitza denbora) (datu ez eskuragarriak). Esperimentuaren azken neurketan, injekzioetik 14 asteetara (20 aste), WD zuten saguek gernuko kobreak emendapen bat jasan zuten, denboran zeharreko metaketaren ondorio. Trataturakoek aldiz, kobreak kantitate gutxiago aurkeztu zuten gernaldian dosi arteko ezberdintasunak azalduz. Murrizpena estatistikoki adierazgarria izan zen sagu eme zein arretan (3. Irudia).

3. irudia. Gernuko kobreakaren neurketa saguak injektatu aurretik (6 aste) eta 14 asteetara (20 aste).

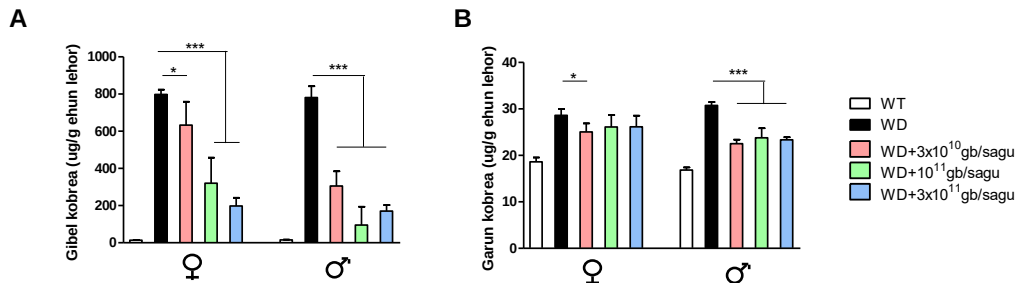
Gene terapeutikoaren espresioa gernuko kobreak mailak murriztea eragiten du. Gernuko kobreak ng/24h-ko neurketa dago. Datuak Anova test estatistikoaren bitartez analizatu ziren. Ns: ez adierazgarria, ***: $p < 0.001$.



3.4. Kobreak metaketa gibelean eta garunean

Organo ezberdinetan egindako kobreakaren neurketa, grafito kamara metodo kimiko-analitikoaren bitartez burutu zen. Kobreakaren metaketa organo hauetan eta tratatu gabeko WD saguetan progresioa izan zen (datu ez eskuragarriak). Aldaketarik nabarmenak gibelean eman ziren, dosiaren arabera kobreak jaitsiera aztertuz sagu ar zein emeen gibeletan, emaitzak adierazgarriak izanik (4. Irudia A). Garunean, arren kasuan kobreak mailak murriztu ziren tratamenduarekin, estatistikoki adierazgarriak izanik emaitzak. Emeen kasuan jaisterako tendentzia aurkitu zen, nahiz eta kasu guztietan adierazgarriak ez izan (4. Irudia B).

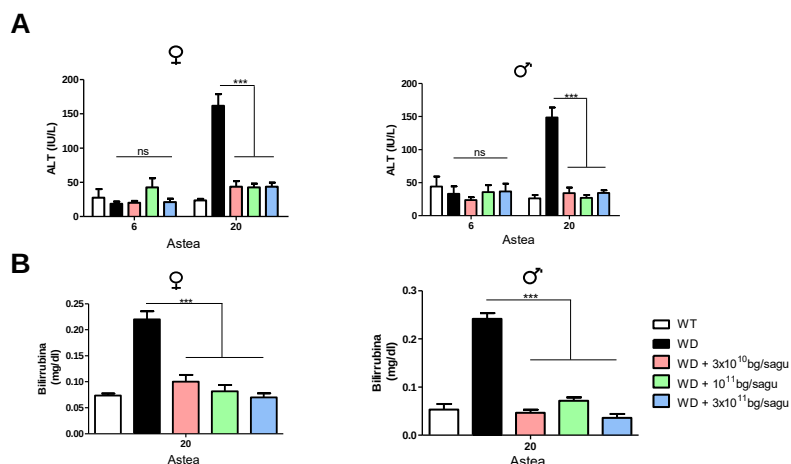
4. irudia. Kobre neurketak organo ezberdinetan. Tratamendu dosi guztiek kobre mailak jaitsi zituzten aztertutako organo guztietan. Neurketak ug kobre/g ehun lehor-etan eman ziren. Datuak Anova test estatistikoaren bitartez analizatu ziren. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$.



3.5. Parametro biokimikoen analisia

Toxikotasunaren azterketarako, serum-eko parametro biokimiko batzuen analisia burutu zen. Horien artean, alanina aminotransferasa (ALT) entzimaren mailak saguak tratatu aurretik aztertzean (6 aste), ez ziren aldaketa adierazgarriak azaldu taldeen artean. Izan ere, kobre metaketaren ondoriozko kalteak 6 asteetatik aurrera antzematen dira sagu eredu honetan. Hala ere 14 aste ondoren, tratamendurik jaso ez zuen taldeak (WD), ALT mailak izugarri emendatuta zituzten. Aldiz, tratatutako taldeen kasuan mailak murriztu ziren bai eme zein arretan (5. Irudia A). Transaminasen igoera gibleko kalteekin zuzenki erlazionatuta dago, beraz tratamenduak guztiz murrizten du toxikotasunaren ondoriozko kalteak. Bestetik, bilirrubinaren aztertzean, azido biliarren sintesiaren markatzailea izanik, neurketak azken puntuak burutu ziren soilik (20 aste). Aztertu daitekeenez, bilirrubina mailak murriztazkoak izan ziren tratamendua jaso zuten taldeetan, giblearen funtzioa hobetzen dela adieraziz bai sagu eme zein arretan (5. Irudia B). Toxikotasunari dagokionez, datu hauek zein aztertutako beste parametro batzuen arabera (datuak ez eskuragarri), toxikotasunarik ez dagoela aztertutako talde zein dosien artean aditzera ematen dute.

5. irudia. Serumeko ALT eta bilirrubina mailen neurketa. Tratamenduak mailak murrizten ditu. Neurketak unitate internacional/ml-ko eta mg/dl-ko eman ziren. Datuak Anova test estatistikoaren bitartez analizatu ziren. Ns: ez adierazgarria, ***: $p < 0.001$.



4. Ondorioak

- 1) Anc80 serotipodun AAV bektore biralak efizienteeki infektatzen du WD-dun sagu eme zein arrak eta *miniATP7B* gene terapeutikoaren espresioa infekzio mailen arabera da.
- 2) Sagu eme zein arretan gurnuko kobre mailak murriztea lortu da tratamenduarekin, baita maila horiek denboran zehar mantendu ere.
- 3) Giblean eta garunean kobrea progresiboki akumulatuz doa sagu eredu honetan. Tratamenduak aldiz, metaketa murrizten du batez ere giblean.

- 4) Serum-eko ALT eta bilirrubina mailak murriztu egin dira tratamenduari esker, toxikotasun eza adieraziz eta gibelako egoera hobetuz.

5. Etorkizunerako planteamendua

Behin ikusita 6 asteetako WD-dun saguekin tratamenduak funtzionatzen duela, sagu helduago batzuekin probatzea izango litzateke hurrengo pausoa. Izan ere, klinikan diagnostikatzen diren pazienteek jadanik gibelako eta garuneko asaldurak dituzte, kasu batzuetan itzulkorrak ez direnak eta benetan tratamendua behar dutenek paziente huraxek dira. Bestetik ere, toxikotasun azterketa gehiago egin beharko dira bestelako animalia ereduetan (*Macaca fascicularis* adib.) bektorea segurua dela ziurtatzeko. Behin ikusita bektorea segurua dela gizakion gertuko espezieetan, Wilson gaixotasuna pariatzen duten pazienteekin entsegu klinikoa egitea izango litzateke hurrengo pausoa eta bide batez, bestelako gaixotasun monogenikoen sendapenerako ate irekiera.

6. Bibliografia

- Cater, M. A., Forbes, J., La Fontaine, S., Cox, D. & Mercer, J. F. B. (2004): *Intracellular trafficking of the human Wilson protein: the role of the six N-terminal metal-binding sites*. *Biochem. J.* 380, 805–813.
- Roberts, E. A. & Schilsky, M. L. (2003): *A practice guideline on Wilson disease*. *Hepatology*. Baltimore, Md 37, 1475–1492
- Bandmann, O., Weiss, K. H. & Kaler, S. G. (2015): *Wilson's disease and other neurological copper disorders*. *Lancet Neurol.* 14, 103–113
- Murillo, O. et al. (2016): *Long-term metabolic correction of Wilson's disease in a murine model by gene therapy*. *J. Hepatology*. 64, 419–426
- Lutsenko S. (2008): *Atp7b^{-/-} mice as a model for studies of Wilson's disease*. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1233–1238
- Lundstrom K. (2018): *Viral Vectors in Gene Therapy*. *Diseases* 6
- Greig, J. A. et al. (2017): *Characterization of Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Human Factor VIII Gene Therapy in Hemophilia A Mice*. *Hum. Gene Ther.* 28, 392–402
- Chamberlain, K., Riyad, J. M. & Weber, T. (2016): *Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids*. *Hum. Gene Ther. Methods* 27, 1–12
- Yu, C. H., Dolgova, N. V. & Dmitriev, O. Y. (2017): *Dynamics of the metal binding domains and regulation of the human copper transporters ATP7B and ATP7A*. *IUBMB Life* 69, 226–235
- Patil, M., Sheth, K. A., Krishnamurthy, A. C. & Devarbhavi, H. (2013): *A Review and Current Perspective on Wilson Disease*. *J. Clin. Exp. Hepatology*. 3, 321–336

7. Eskerrak

Benetako eskerrak lan honetan parte hartu duten guztiei eskeinitako denboragatik.

Selenozianato eta Diseleniuroak: Leishmaniaren aurkako sendagai eraginkor berriak

Etxebeste-Mitxelorena, Mikel^{1,3}; Plano, Daniel¹; Moreno, Esther^{1,3}; Jiménez-Ruiz, Antonio²; Socorro, Espuelas^{1,3} eta Sanmartín, Carmen^{1,3}

¹Nafarroako Unibertsitatea, Teknologia eta Kimika Farmazeutikoak Saila

²Alcala de Henareseko Unibertsitatea, Biokimika eta Biologia Molekularra Saila

³Nafarroako Unibertsitatea, ISTUN

metxebeste@alumni.unav.es

Laburpena

Lan honetan, selenozianato edo diseleniuro nukleoa barnean duten, 35 molekula berriren sintesia azaltzen da. Molekula hauek *Leishmania infantum* promastigote eta amastigote axenikoetan *in vitro* frogatu dira euren eraginkortasuna ezagutzeko. Bestalde, THP-1 zelula linean ere testatu dira, selektibotasun indize bat ezartzearen. Lortutako datuak (IC₅₀), erreferentziatzat erabiltzen diren farmakoen (edelfosina eta miltefosina) datuekin parekatu dira. Frogatutako hainbat molekulek erreferentziazko farmakoak baino IC₅₀ hobe dute, selektibitate antzeko edota hobearekin. Hauek, makrofago infektatuen gain frogatu dira eta konposatu “liderraren” (2a) eragina kontrastezko mikroskopikopean behatu da.

Hitz gakoak: Leishmaniasia, selenioa, eraginkortasuna, selektibitatea

Abstract

In the presented work, 35 new molecules selenocyanate or diselenide moieties have been synthesized. The new compounds have been evaluated in vitro for their cytotoxicity activity against Leishmania infantum promastigotes and axenic amastigotes. In order to establish their selectivity indexes (SI) the cytotoxic effect of each compound was also assayed in THP-1 cell line. Some of the compounds presented a better activity (IC₅₀) than the reference drugs Edelfosine or Miltefosine, and similar or better SI. These compounds have also been tested against infected macrophages and the leader (2a) compound activity has been checked under contrast microscopy.

Keywords: Leishmaniasis, selenium, activity, selectivity

1. Sarrera eta motibazioa

Leishmaniasia, munduko osasun erakundeak klasifikatutako 17 ahaztutako gaixotasun tropikaletako bat, *Leishmania* generoko parasito protozario ezberdinek eragiten dute. Mundu mailako osasun arazo larri bat da, bereziki baliabide urri eta pobrezia handiko herrialdeetan. 88 herrialdeetan endemikoa da 12 milioi pertsona kalteturik. Urtero bi milioi kasu berri estimatzen ditu MOEak.(1,5,15)

Trypanosomatidae familiako *Leishmania* generoko espezie infektibo ezberdinen baitako kutsatzean, gaixotasunean hiru forma kliniko bereizten dira: Biszerala, larruazalekoa edo muko-kutaneoak. Guztira, 21 espezie ezberdinez kutsa daiteke gizakia, 30 flebotomoren ziztadaren eraginez. (4,6,8,25)

Gaixotasuna kontrolpean edukitzeko modua bektorearen eta gaixoen kudeaketan datza, transmisioa murriztearen, edota gaixoen tratamenduan, ez baitago eraginkorra den txertorik. Hala ere, gaur egun existitzen diren tratamendu edo sendagailak (Antimonio pentabalenteak, miltefosina, edelfosina, B anfoterizina, paramomizina, etab.) ondorio kaltegarri ugari sortzen dituzte. Hain zuzen ere arrazoi hauengatik, administratzeko errazak diren eta ondorio kaltegarri gutxi sortzen dituzte sendagai eraginkor berriak sortzea behar beharrezkoa izan beharko litzateke. (2,7,10,18,24)

Gure lan taldean sintetizatutako hainbat seleniodun konposaturen ahalmen antitumoralak ikusita, pentsatzekoa da droga hauek eraginkorrak izan daitezkeela, Leishmanisiaren aurka, gaur egun erabiltzen diren hainbat sendagai (Miltefosina, Edelfosina) minbiziaren tratamenduan erabiltzen baitziren. Taldean, aurrez sintetizatutako hainbat seleniodun molekulak aktibitate leishmanizida aurkeztu zuten. (9,11,12,13,17,19,21,22,23,26)

Bestalde, organoseleno konposatu ezberdinak parasitemiaren murrizketa suertatzen dutela demostratua da. Are gehiago, arratoietan manifestazio klinikoak eta heriotza-tasa murrizten dute. Beraz, selenioaren erabilera estrategi berri eta eraginkora izan liteke gaixotasun honen tratamenduan. Jakina da gainera, tripanosomatidoek, ugaztunek ez bezala, estres oxidatiboari aurre egiteko mekanismo ezberdina daukatela, zeinetan hainbat selenoproteina propiok hartzen duten parte, hala nola, Sel-Tryp izenekoa. (16)

2. Ikerketaren helburuak

Alor honetako ikerkuntzaren egoera ikusita, ondorengo helburuak proposatu dira proiektu honetan:

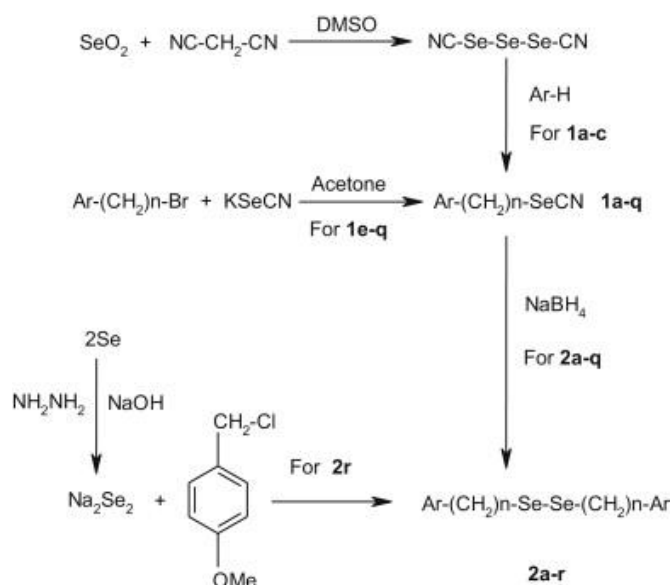
- 35 seleniodun molekula berriren sintesia.
- Kimika organikoan ohikoak diren teknikak erabiliz (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C, analisi elementala, masa espektrometria eta fusio puntua) konposatu berriak karakterizatzea.
- Leishmania infantum promastigote eta amastigote axenikoetan konposatu berrien eraginkortasuna behatzea eta selektibotasun indize bat lortzea THP-1 zeluletan duten eraginkortasunarekin alderatuta.
- Konposatu eraginkor eta selektiboak, makrofago infektatuetan duten eragina frogatu.
- Konposatu liderraren eragina mikroskopikoki ikusi.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

1) Kimika

1. Irudian irudikatua dagoen moduan, selenozianato eta diseleniuroak sintetizatze bidea sinple eta pauso gutxikoa da. Amaierako produktuen sintesia, aurrez sintetizatutako aminen eta haloarenoen arteko erreakzioaren bidez burutzen da.

1. irudia. I. serieko konposatuak



Selenozianato deribatuak ezberdinak bi modu ezberdinez lortu dira. 1a-c molekulak sintetizatzeke, malononitriloa eta selenio dioxidoak eratutako triseleniuroaren gainean aminoaril ezberdinak gehitzen dira. Erreakzioa DMSO disolbatzailean burutzen da, 25 graduan, 24 orduz irabiatuz. Beste konposatuak (1e-q) lortzeko, dagozkion haloareno ezberdinak potasio selenozianatoarekin erreakinatuz lortu dira. Aldiz, 2a-q konposatuen erapena, dagozkien 1 serieko analogoen erredukzioaren bidez burutu da, borohidruro sodikoaren laguntzaz.

2) Biologia

L. infantum amastigote axenikoak, 10% FCS, 1g/L β -alanina, 100mg/L *L*-asparagina, 200 mg/L sakarosa, 50mg/L sodio pirubato, 320 mg/L azido maleiko, 40mg/L azido fumariko, 70mg/L azido sukziniko, 200mg/L azido zetoglutariko, 300mg/L azido zitriko, 1.1 g/L bikarbonato sodiko, 5g/L MES, 0.4 mg/L hemina, 10mg/L gentamizina osatutako M199 (Invitrogen, Leiden, The Netherlands) ingurunean hazi ziren 5.4 pHan, 37 °Ctan. THP-1 zelulak, Dr. Michele hornituta, 10% FCS, 1nM HEPES antibiotiko, 2nM glutamina eta 1nM sodio pirubatoaz osatutako ingurunean hazi ziren, 7.2ko pHan, 37°Ctan eta %5eko CO₂ atmosferan.

Lehenik eta behin, konposatuen eragina promastigoteen gain frogatu zen, 25 μ M-eko kontzentrazioan. Parasitoen hazkundearen % 50 eragozteko lortu zutenak, hurrengo faserako aukeratuak izan ziren. Hogei konposatu hauekin amastigote axenikoetan egindako tratamendua, parasitoen hazkunde fase logaritmikoan zehar egin zen, 10⁶ parasito/ml-ko kontzentrazioan 37°Ctan, 24 orduz. THP-1 monozito zelulen tratamendua berriz, hauen hazkunde fase logaritmikoan egin zen 4x10⁵ zelula/ml-ko kontzentrazioan, 37°Ctan, %5-eko CO₂ atmosferan, 24 orduz. 0.08, 0.4, 2.0, 10.0 eta 50.0 μ M kontzentrazioak bahetu ziren.

Bizirik geratutako zelulen portzentajea propidio ioduroaren (PI) eskusio metodoaz neurtu zen, fluxu zitometriaren bidez. Zelulen ebaluaketa mikroskopikorako parasitoen zuzeneko behaketa burutu zen 96 platertxoko plaketan, kontrastezko mikroskopia edo mikroskopia fluoreszente bidez. (1,3,20)

Esperimentua burutzean jasotako amastigoteetarako eta THP-1 zeluletarako IC₅₀ (zelulen hazkundearen %50a galarazten duen dosia) datuak 1. taulan ikus daitezke.

1.taula. Konposatuen IC₅₀ Promastigote, Amastigote eta THP-1 zeluletan eta SI balorea

Erreferentzia	-Ar-	IC ₅₀ Promastigote $\pm$ errorea (μ M)	IC ₅₀ Amastigote $\pm$ errorea (μ M)	IC ₅₀ THP-1 $\pm$ errorea (μ M)	SI
1a	4-aminofenil	11.2 $\pm$ 1.10	9.29 $\pm$ 1.16	>50	>5
1b	4-(N,N-dimetilamino)-fenil	9.24 $\pm$ 0.33	2.79 $\pm$ 0.17	44.7 $\pm$ 3.4	16
1e	4-Nitrofenil	4.30 $\pm$ 0.74	0.68 $\pm$ 0.08	16.8 $\pm$ 1.8	25
1f	3-Nitrofenil	4.18 $\pm$ 1.06	0.57 $\pm$ 0.08	9.32 $\pm$ 0.1	16
1g	2-Nitrofenil	3.32 $\pm$ 0.16	0.34 $\pm$ 0.19	7.10 $\pm$ 0.2	21
1h	4-Bromofenil	11.6 $\pm$ 0.60	7.95 $\pm$ 1.02	28.9 $\pm$ 3.9	4
1i	4-Trifluorometilfenil	11.3 $\pm$ 0.40	2.14 $\pm$ 1.05	19.8 $\pm$ 2.7	9
1j	4-Metiltiofenil	11.6 $\pm$ 0.70	3.02 $\pm$ 0.59	17.0 $\pm$ 0.2	6
1k	4-Metilfenil	11.8 $\pm$ 0.30	3.33 $\pm$ 0.79	24.0 $\pm$ 2.2	7
1l	4-Zianofenil	4.14 $\pm$ 0.23	0.55 $\pm$ 0.21	7.97 $\pm$ 1.0	15
1m	3-Zianofenil	6.06 $\pm$ 1.70	0.53 $\pm$ 0.11	7.60 $\pm$ 2.0	14
1n	2-Zianofenil	7.75 $\pm$ 0.20	3.16 $\pm$ 0.02	17.1 $\pm$ 1.1	5
1o	Fenil	7.95 $\pm$ 0.34	2.58 $\pm$ 0.21	25.0 $\pm$ 2.9	10
1p	Naftil	11.2 $\pm$ 1.20	3.72 $\pm$ 1.08	16.8 $\pm$ 3.1	5
1q	4-Nitrobenzil	11.9 $\pm$ 0.90	3.80 $\pm$ 0.27	17.2 $\pm$ 2.2	5
2a	4-aminofenil	0.96 $\pm$ 0.07	0.65 $\pm$ 0.02	15.3 $\pm$ 0.8	24
2b	4-(N,N-dimetilamino)	3.18 $\pm$ 0.23	0.77 $\pm$ 0.03	22.1 $\pm$ 1.4	29

-fenil					
2e	4-Nitrofenil	4.04 ± 0.38	0.38 ± 0.03	29.1 ± 2.3	77
2g	2-Nitrofenil	12.5 ± 2.80	0.29 ± 0.10	2.42 ± 0.1	8
2o	Fenil	17.8 ± 1.90	0.63 ± 0.05	32.2 ± 2.5	51
Edelfosina	-	3.65 ± 0.19	0.82 ± 0.13	4.96 ± 0.16	6
Miltefosina	-	15.0 ± 0.80	2.84 ± 0.10	18.5 ± 0.60	7

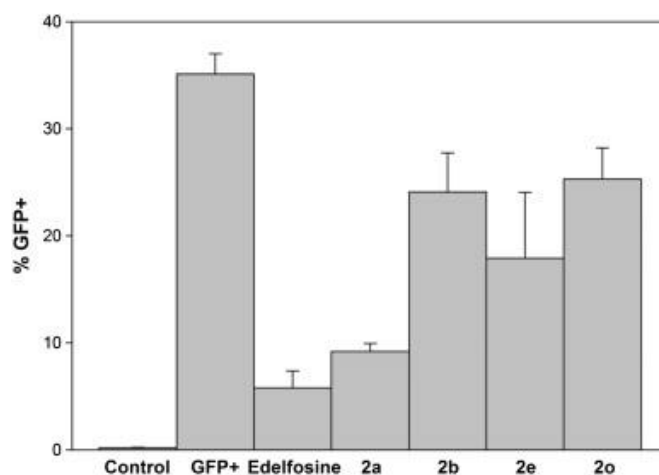
Taulan ikusgai den moduan, sintetizatutako 14 konposatuk 3tik beherako IC₅₀ dute, gaur egun erabiltzen den Miltefosina sendagailaren aktibitatearen ordenan. Selektibotasun indizeak, orokorrean erreferentziatzat hartutako sendagailenak baino hobeak dira 15 kasutan, 10 aldiz handiagoa izaki 2e konposatuarentzat adibidez.

Konkretuki, 13 konposatuk (1a, 1e, 1f, 1g, 1i, 1l, 1m, 1o, 2a, 2b, 2e, 2g eta 2o) Miltefosina baino eraginkortasun handiagoa dute (IC₅₀ = 0.29-2.79 µM) eta horietatik hamarrek (1e, 1f, 1g, 1l, 1m, 2a, 2b, 2e, 2g eta 2o) Edelfosinak baino hobeak (IC₅₀ = 0.29-0.77 µM).

Nahiz eta dauzkagun datuekin ezin den estruktura-eraginkortasun korrelazio on bat egin, bai ikus daiteke, orokorrean, diseleniuroak (2 seriea) eraginkorragoak direla, 1 µM azpiko IC₅₀ baloreak erakutsita. Gainera, 2a, 2b, 2e eta 2o konposatuak dira selektibotasun altuena erakutsi dutenak. Hau dela eta, konposatu hauen eraginkortasuna makrofago infektatuen gain frogatu da.

Honetarako, THP-1 zelula monozitarioak, makrofagoetan transformatu dira PMA-ren eraginez. Ondoren, eratutako makrofago hauek *L. infantum* amastigote fluoreszenteekin (GFP+) infektatu dira. 24 ordu ostean, behin infekzioa garatuta, makrofago infektatu hauek aukeratutako 4 konposatuekin tratatu dira 48 orduz eta zitometroaren bidez, bizirik geratutako parasito fluoreszente kopurua neurtu da. Edelfosina sendagaia kontrol positibotzat hartuta, haren IC₅₀ balioaren dosian hau da 3 µM, erabili dira konposatuak ere.

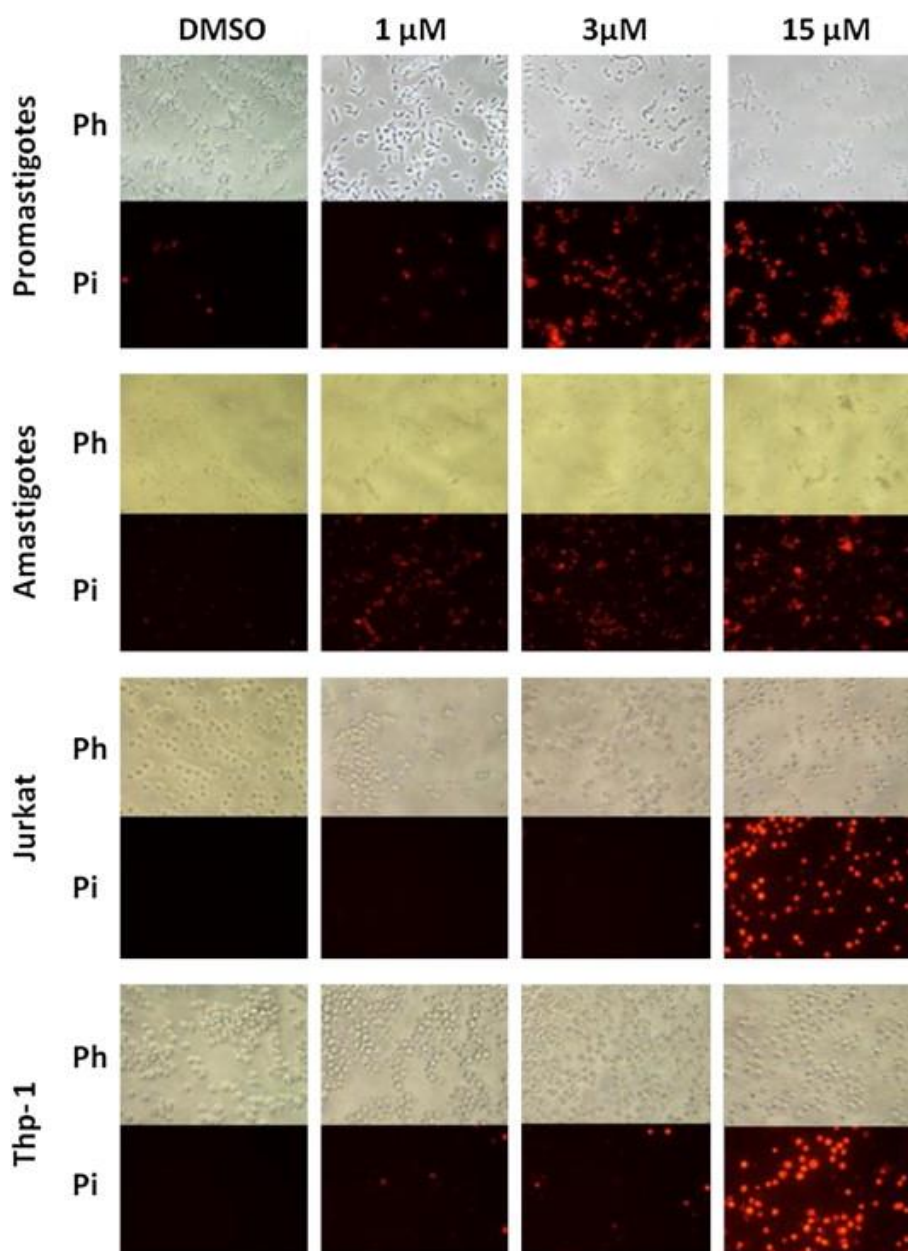
2. irudia. 2a, 2b, 2e eta 2c konposatuen eraginkortasuna GFP+ parasitoen aurka



Taulan ondo ikus daitekeen bezala, 2a konposatuaren tratamenduak 48 orduren ostean, parasitoen % 74 hil egin zuen, egungo sendagailaren pare, baina hare selektiboagoa izaki.

Azkenik, konposatu honen (2a) eraginkortasuna mikroskopikoki ere behatu da. Promastigoteak, amastigoteak, THP-1 zelulak eta Jurkat zelula monozitarioak, konposatu honen 1 µM, 3 µM eta 15 µM dosiekin tratatu dira. Ondoren ioduro propidioa gehitu eta kontrastezko mikroskopioan behatu dira. Bertan erraz ikusi daiteke ez dagoela inongo zitotoxiziterik 1 eta 3 µM dosietan giza zelulendako. Aldiz, amastigoteen % 100-a hiltzen du 3 µMean.

3. irudia. 2a konposatuaren eraginkortasuna mikroskopikoki behatuta Promastigote, Amastigote, Jurkat eta THP-1 zelulen gain.



4. Etorkizunerako planteatutako norabidea

- Konposatu guztien eraginkortasuna, zepa ezberdinetako promastigote eta amastigoteetan frogatu.
- Konposatu liderrak, eraginkorrak eta selektiboak baldin badira, *in vivo* testatu leishmaniadun arratoietan, bai toxizitatea bai eraginkortasuna.
- Konposatuen nanoformulazioa eraginkortasuna eta selektibitatea hobetzeko.

5. Erreferentziak

1. Alzate JF, Álvarez-Barrientos A, González VM, Jiménez-Ruiz A. (2006) Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression *Apoptosis* 11:161-171.
2. Alzate JF, Arias A, Mollinedo F, Rico E, De la Iglesia-Vicente J, Jimenez-Ruiz A. (2008) Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3779-3782.
3. Alzate JF, Arias A., Moreno-Mateos D, Alvarez-Barrientos A, Jiménez-Ruiz A. (2007) Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *L. infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 152:192-202
4. Bates, P.A. (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies". *Int J Parasitol* 37(10): 1097-1106.
5. Bern C, Maguire JH, Alvar J. (2008) Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2:313.
6. Botero, D., Restrepo, M. Colombia (1992). "Parasitosis humanas". *Corporación para Investigaciones Biológicas*. Segunda edición.
7. Cabrera-Serra MG, Valladares B, Piñero JE. (2008) In vivo activity of perfosine against *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop* 108:20-25.
8. David CV, Craft N. (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 22:491-502.
9. Fernandez-Rubio C, Campbell D, Vacas A, Ibañez E, Moreno E, Espuelas S, Calvo A, Palop JA, Plano D, Sanmartin C, Nguewa P. (2015) Leishmanicidal activities of novel mmethylseleno-imidocarbamates. *ACC* 59:5705-5713.
10. Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. (2009) Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules* 14:2317-2336.
11. Ibañez E, Agliano A, Prior C, Nguewa P, Redrado M, Gonzalez-Zubeldia I, Plano D, Palop JA, Sanmartin C, Calvo A. (2012) The Quinoline Imidoselenocarbamate EI201 Blocks the AKT/m TOR Pathway and targets cancer stem cells leading to a strong antitumor activity. *Current Medicinal Chemistry* 19:3031-3043.
12. Ibañez E, Plano D, Font M, Calvo A, Prior C, Palop JA, Sanmartin C. (2011) Synthesis and antiproliferative activity of novel symmetrical alkylthio- and alkylseleno-imidocarbamates. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46:265-274.
13. Ibañez E, Stoedter M, Hofmann P, Plano D, Calvo A, Nguewa P, Palop JA, Sanmartin C, Schomburg L. (2010) Structure- and cell-specific effects of imidoselenocarbamates on selenoprotein expression and activity in liver cells in culture. *Metallomics* 4:1297-1307.
14. Iriepa I, Villasante FJ, Galvez E, Bellanato J, Martín A, Gomez-Sal P. (2004) Synthesis, spectroscopic and crystallographic study of some carbamates from an azabicyclic chloroformate and primary heterocyclic amines. *New J. Chem.* 28:618-624.
15. Lindoso JA, Lindoso AA. (2009) Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51:247-253.
16. Lobanov AV, Gromer S, Salinas G, Gladyshev VN. (2006) Selenium metabolism in *Trypanosoma*: characterization of selenoproteomes and identification of Kinetoplastida-specific selenoproteins. *Nucleic Acids Res* 34:4012-4024.
17. Moreno D, Plano D, Baquedano Y, Jimenez-Ruiz A, Palop JA, Sanmartin C. (2010) Antileishmanial activity of imidothiocarbamates and imidoselenocarbamates. *Parasitol Res* 108:233-239.
18. Palumbo E. (2008) Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. *Braz J Infect Dis* 12:2-4.
19. Plano D, Baquedano Y, Ibañez E, Jimenez I, Palop JA, Spallholz J, Sanmartin C. (2010) Antioxidant-prooxidant properties of a New Organoselenium Compound Library. *Molecules* 15:7292-7312.
20. Plano D, Baquedano Y, Moreno-Mateos D, Font M, Jimenez-Ruiz A, Palop JA, Sanmartín C. (2011) Selenocyanates and diselenides: A new class of potent antileishmanial agents. *Eur J Med Chem* 46:3315-3323.
21. Plano D, Ibañez I, Calvo A, Palop JA, Sanmartin C. (2001) Novel library of selenocompounds as Kinase Modulators. *Molecules* 16:6349-6364.

22. Plano D, Sanmartín C, Moreno E, Prior C, Calvo A, Palop JA. (2007) Novel potent organoselenium compounds as cytotoxic agents in prostate cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17:6853-6859.
23. Romano B, Font M, Encío I, Palop JA, Sanmartín C. (2014) Synthesis and antiproliferative activity of novel methylselenocarbamates. *Eur. J. Med. Chem.* 83:674-684.
24. Rosenthal E, Delaunay P, Jeandel PY, Haas H, Pomares-Estran C, Marty P. (2009) Liposomal amphotericin B as treatment for visceral Leishmaniasis in Europe. *Med Mal Infect* 39:741-744.
25. Sharma U, Singh S. (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45:255-272.
26. Zuazo A, Plano D, Ansó E, Lizarraga E, Font M, Martínez de Irujo J. (2012) Cytotoxic and proapoptotic activities of imidoselenocarbamate derivatives are dependent on the release of methylselenol. *Chem Res Toxicol* 25:2479-2489.

RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNAk) etxabereetan: RNA-seq datuetan oinarritutako analisi transkriptomikoa ardian

Bilbao-Arribas, Martin; Varela-Martínez, Endika; Abendaño, Naiara eta Jugo, Begoña M.

*Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila,
Zientzia eta Teknologia Fakultatea*

martin.bilbao@ehu.eus, begonamarina.jugo@ehu.eus

Laburpena

RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNAk), proteinak kodetzen ez dituzten eta 200 nukleotido baino luzeagoak diren transkriptoak, oso gutxi ikertu dira etxabereetan gizakiarekin konparatuz, eta oso mugatua da espezie batetik bestera eratorri daitekeen gene hauen egitura edo funtzioari buruzko informazioa. RNA-seq datu-multzo bat baliatuz ardien lncRNAk identifikatu, kontserbazioa aztertu eta aluminiodun txertoen aurrean erakusten duten jokaera aztertu dugu. Bi ehun desberdinetan fidagarritzat eman dira 2284 eta 3004 lncRNA transkripto. Horietako batzuk posizio genomikoa mantendu dute gertuko espezieekiko, sekuentzia mailako kontserbazio maila altua transkripto gutxitan ikusi bada ere. Gainera, diferentzialki adierazita daude hainbat lncRNA aluminiodun txertoak jaso zituzten animalietan. Analisi gehiago beharrezkoak dira mRNA eta miRNA geneekin dituzten erlazioak argitzeko.

Hitz gakoak: lncRNA, RNA-seq, adierazpen diferentziala, aluminioa, txerto-laguntzaileak

Abstract

Long non-coding RNAs (lncRNAs), transcripts without coding capability and longer than 200 nucleotides, have been poorly studied in livestock comparing with other mayor model organisms, and the information about structure and function that can be inferred from other species is limited. Using a sheep RNA-seq dataset we identified, performed conservation analyses and profiled the response to aluminium adjuvants of lncRNAs. 2284 and 3004 transcripts have been confidently classified as lncRNAs. Some of them show conserved genomic position relative to close species, even if few had a high level of sequence conservation. Besides, several lncRNAs are differentially expressed in animals that received aluminium-containing vaccines. More analyses are needed to shed light on the relations with mRNAs and miRNAs.

Key words: lncRNA, RNA-seq, differential expression, aluminium, adjuvants

1. Sarrera eta motibazioa

RNAk ez du funtzio bakar gisa DNA eta proteinen arteko mezularia izatea, gene-adierazpenaren eta genomaren antolaketaren doitzaila ere bada. Ugaztunetan ia genoma guztia nonahi transkribatzen da, ez bakarrik mRNAk sortzeko, mota askotako RNA ez-kodetzaileak sortzen dira ere, gene intergenikoetan, gene kodetzaileen kontrako harizpian edo intronetan esaterako (Morris & Mattick, 2014). RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNAk) proteinak kodetzen ez dituzten eta 200 nukleotido baino luzeagoak diren transkriptoak dira. Egitura aldetik askok RNA mezularien antza izan arren, hau da, poliadenilatu egiten dira, 5' txanoa dute eta moztitsasketa jasaten dute (Deveson et al., 2017), lncRNAk adierazpen maila baxuagoa dute, adierazpen ehun- edo garapen-espezifikoa dute eta sekuentzia mailan kontserbazio txikia erakusten dute, salbuespenak badaude ere.

Kontserbazioari dagokionez, lncRNAen sekuentzien eboluzio azkarrak zaildu egiten du lncRNAekin lan egitea eredu ez diren espezieetan, izan ere espezieen arteko ohiko konparaketa filogenetikoak ez dira erabilgarriak (Ulitsky, 2016). Gizakian bilduma zabal eta fidagarri bat dagoen bitartean, abereetan balidatutako gene-eredu gutxi daude. Arrazoi hauek direla-eta, bestelako analisiak erabiltzea beharrezkoa da, adibidez, gene-ordenaren (sintenia), funtziodun azpisekuentzien, adierazpenaren edo RNA molekulen egituren kontserbazioa (Hezroni et al., 2015).

Transkripto hauen funtzioak, oraingoz gutxi batzuk funtzionalki karakterizatu direnak, burutu diren ikerketen arabera lotura izan dezakete gene-adierazpenaren erregulazioaren maila desberdinetan: transkripzioan, transkripzioaren ostekoan, edo kromatinaren antolaketan (Dykes & Emanueli, 2017). RNAk hainbeste egitura desberdin hartzen ahal ditu, ezen, lncRNAk molekula mota askorekin elkarrekintzak izaten ahal baitituzte, eta hauen bitartez euren zereginak gauzatu. Besteak beste, DNA, proteinak edo bestelako RNA motak (miRNAk edo mRNAk kasu) dira RNA ez-kodetzaile hauen ituak. Karakterizazio funtzionalerako, teknika esperimentalez gain, lan-fluxu bioinformatikoak garatu dira. Hauek gene-adierazpenean (adierazpen diferentziala edo ko-adierazpena) eta elkarrekintzen auresatean oinarritzen dira (Cao et al., 2018; Signal et al., 2016).

Oinarritzko sailkapen argi ez-anbiguo baten faltak erronka desberdinak dakartza lncRNAk ongi anotatzeko eta datu transkriptomikoak ulertzeko (Laurent et al., 2016). Azkenaldian lncRNAk klaseetan banatzeko gailendu den hurbilketa beste geneekiko zein kokapen kromosomiko duten aztertzea da, izan ere, kokapenak ekintza-mekanismoei buruzko orokortasun batzuk egitea ahalbidetzen duela ikusi da. Horrela, gene kodetzaileen artean kokatzen direnak lincRNA (RNA ez-kodetzaile intergeniko luzeak) bezala ezagutzen dira. Berriz, gene kodetzaile batetik gertu kokatzen direnak talde propioa osatzen dute. Horietatik promotorea elkarbanatzen dutenei, esaterako, lncRNA dibergente esaten zaie (Luo et al., 2016). Gene kodetzaile baten kontrako harizpian kokatzen direnak kontrako harizpiko lncRNA (*antisense* lncRNA) deitzen dira eta intronetatik eratortzen direnak lncRNA intronikoak dira.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Etxabereen hainbat ehunetatik lortutako RNA-seq liburutegiak genoma osoko lncRNA bildumak lortzeko erabili izan dira behia, txerria, zaldia edo ardia bezalako espezieetan (1. taula). Bilduma hauetan, milaka lncRNA deskribatzen diren arren, gene bakoitzaren funtzioari edo gaixotasunekin dituzten asoziazioei buruzko informazio gutxi dago oraindik. Lan honetan ardietan egindako esperimentu batetik lortutako RNA-seq datu-multzo bi erabili dira lncRNA berriak identifikatzeko eta tratamendu batekin erlazioa izaten ahal dutenak aztertzeko, lanabes bioinformatikoak erabiliz.

1. taula. Transkriptoma osoko sekuentziazioaren bidez etxabereen lncRNAk bilatzeko egin diren entseguak. Ensembl-ek edo NCBIk informatikoki auresandako geneak ez dira kontutan hartu.

Espezia	Ehunak	LncRNA kopurua	Egilea
Ardia (<i>Ovis aries</i>)	50+	12296	(Bush et al., 2018)
Ahuntza (<i>Capra hircus</i>)	9	2657	(Bush et al., 2018)
	3	13864	(Foissac et al., preprint)
Behia (<i>Bos taurus</i>)	18	9778	(Koufariotis et al., 2015)
	3	22724	(Foissac et al., preprint)
Zaldia (<i>Equus caballus</i>)	8	20800	(Scott et al., 2017)
Txerria (<i>Sus scrofa</i>)	3	12587	(Foissac et al., preprint)
Oiloa (<i>Gallus gallus</i>)	2	20516	(Kuo et al., 2017)
	2	2193	(Muret et al., 2017)
	3	7502	(Foissac et al., preprint)

Datuak gure taldeak burutu duen ikerketa batetik datoz, zeinetan RNA-seq eta miRNA-seq bidez karakterizatu egin baita aluminio hidroxidoaren eragina txertoen laguntzaile bezala eta bere ondorioak txertaketaren osteko erantzun immunean. Oraingoz sekuentziatu diren ehunak odol-zelula mononuklearrak (Varela-Martínez et al., 2018) eta entzefaloa (artikulua prestakuntzan) izan dira. Laguntzaileen erabilerak historia luzea du txertoen konposizioan, antigorputz erantzunak bultzatuz babes hobea lortzeko. Aluminio konposatuak gehien erabiltzen

diren laguntzaileak dira, dena den, erantzun immunea pizteko darabilten mekanismoa ez da ongi ezagutzen oraindik eta ardietan albo-kalteak ikusi izan dira (Asín et al., 2019). Oso ikerketa gutxi aztertu dute aluminioaren eragina nerbio-sistema zentrolean. Berriki, aluminioarekin tratatu ziren arratoien hipokanpoetan diferentzialki adierazitako mRNAk eta lncRNAk identifikatu dituzte, horien artean glia-zelulekin erlazionaturiko geneak (Xu et al., 2018).

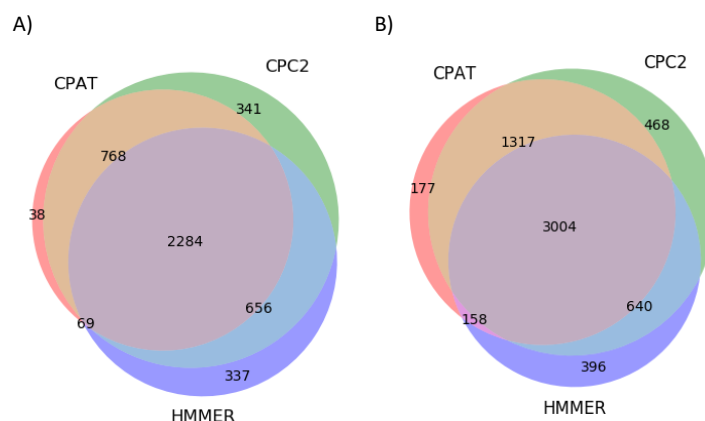
Aurrekari hauek kontuan izanda, analisi honen bitartez lortu nahi den helburua bikoitza da: Batetik, ardiaren RNA ez-kodetzaile luzeen identifikazioa egitea RNA-seq datuetatik eta azterketa deskriptiboa eta funtzionala egitea, ezaugarri orokorrak eta gene-kodetzaileekin duten erlazioa aztertuz. Bestetik, tratamenduarekin lotura duten lncRNAk identifikatzea, hau da, aluminioaren aurrean jokaera aldatzen dutenak.

3. Ikerketaren muina

3.1. LncRNA berrien identifikazioa eta sailkapena

Anotatu gabe dauden transkripto berriak aurkitu ahal izateko, adierazpenaren kuantifikaziorako ohiko prozedura bioinformatikoez gain transkriptoma mihiztatu egin zen eta Ensembl datu-baseko ardi geneekin konparatu. Hainbat iragazki ezarri ziren lncRNAk beste transkriptoetatik bereizteko. Baztertu egin ziren anotatutako geneekin bat egiten zuten transkriptoak eta hautatu egin ziren intergenikoak, intronikoak edo kontrako harizpikoak zirenak. 200 nukleotidoko luzera minimoa ezarri zen transkripto poliexonikoentzako eta 2000koa exon bakarra zutenentzako. Ondoren, proteinak kodetzeko potentziala kalkulatu zen transkripto bakoitzeko hiru programa erabilita: CPAT eta CPC2, ikasketa automatikoa oinarrituta, eta HMMER, sekuentzietan proteina domeinu ezagunak bilatzen dituen (1. irudia). Kodetzaile bezala sailkatutakoak arbuia egin ziren. Iragazki guztiak aplikatu eta gero odoleko zelula mononuklearretatik eta entzefalotik eratorritako 2284 eta 3004 transkriptorekin geratu ginen, hurrenez hurren.

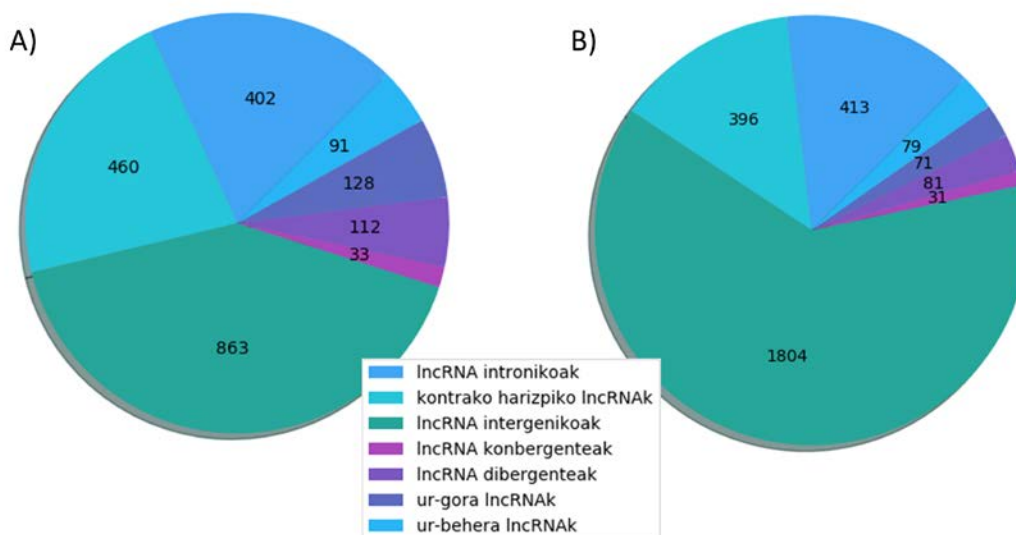
1. irudia. Transkriptoen potentzial-kodetzailearen ebaluazioa hiru tresna erabiliz. A) Odol-zelula mononuklearretan. B) Entzefaloan



LncRNA berrien ezaugarriak antzekoak izan ziren bi ehunetan eta beste ikerketa batzuetan lortutako emaitzekin bat egiten dute. Luzera askotako transkriptoak lortu ziren, tamaina ohikoena 2000 eta 5000 nukleotido artekoa bazen ere, entzefaloan 5000 nukleotido baino gehiagoko transkripto kopuru handiagoa aurkitu zen. Exon bakarreko gehienak 2000-5000 nukleotido zituzten, hau da, luzera txikikoak ziren. 2000 nukleotidotik beherako transkripto monoexonikorik ezin zen egon, analisitik kanpo utzi ziren, sekuentziazioa irakurketa motzeko RNA-seq bat zenez transkripto hauek ezin baitira fidagarritasun handiarekin *de novo* mihiztatu. LncRNA guztiak gertuen duten gene kodetzailearekiko posizio erlatiboaren arabera sailkatu

ziren (2. irudia). Espero bezala, lncRNA intergenikoen klasea gailentzen zen, entzefaloan hauen proportzioa handiagoa bada ere.

2. irudia. lncRNA transkriptoek kokapenaren arabera sailkapena klase desberdinetan. A) Odol-zelula mononuklearretan. B) Entzefaloan

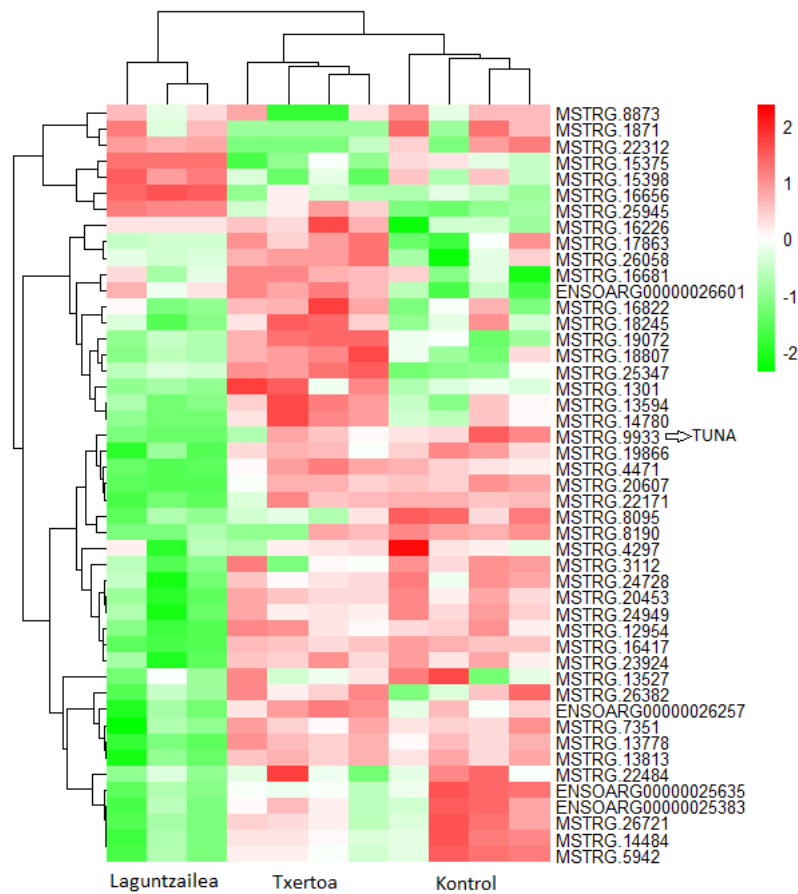


Eraikitako lncRNA-ereduak beste espezie batzuetan agertzen badira, geneok sekuentziazio-edo prozesamendu-erroreengatik agertu izanaren probabilitate txikiagoa egongo litzateke eta funtzionalak izateko babes handiagoa izango lukete. Hortaz, sekuentzien kontserbazioa aztertzeko asmoz, Blast tresna erabili zen transkripto bakoitza RNAcentral datu basearekin konparatuz. Identitate ona izateaz gain, sekuentziek antzeko luzera izatea bilatu zen. Analisi honek emaitza gutxi eman zituen, izan ere, aipatu bezala, sekuentzia mailako kontserbazioa txikia da lncRNAetan. Hala ere, gizakian edo behian aurkitu diren batzuk bat egin zuten, esaterako NORAD, HCG11, TUNA edo COPG2IT1. Gauzak horrela, sinteniaren analisia burutu zen: behiaren eta gizakiaren genomak gene kodetzaileen ordena ardiaren anotazioarekiko mantentzen diren eremuak identifikatu ziren eta bi espezieetan lncRNArik zegoen aztertu zen. Ardia eta gizakiaren arteko konparaketan 279 kontserbaturiko bloke sinteniko aurkitu ziren eta ardia eta behiaren arteko konparaketan 871. Ondoren, bloke berdinean kokatzen diren lncRNAekin binakako lerrokaketak egin ziren, 20 nukleotido baino gehiagoko azpisekuentzien identitate perfektuan arreta jarritz. Behiaren konparaketan 39 bat egite lortu ziren eta gizakiarenean bakarra.

3.2. Adierazpen diferentziala

Esperimentu honetan animaliak hiru taldetan bananduta zeuden: kontrol taldea, txerto komertzialak jaso zituzten ardiaren taldea eta laguntzailea soilik jaso zuten ardiaren taldea. Binakako hiru konparaketetan guztira 304 eta 47 lncRNA identifikatu ziren diferentzialki adierazita (DA), odol zelula mononuklearretan eta entzefaloan, hurrenez hurren. 3. irudian entzefaloaren DA lncRNAk erakusten dira. Kopuru hauetan gehituta daude Ensembl-en lncRNA bezala anotatuta dauden eta DA zeuden 28 eta 4 gene. Aipatzekoa da, entzefaloan, behian eta gizakian kontserbatuta dagoen TUNA lncRNA laguntzailea jaso zuten animalietan negatiboki erregulatuta zegoela. lncRNA hau nerbio-sistema zentrolean soilik adierazten da eta beharrezkoa da neuronan desberdintzapenerako eta zelula amen pluripotentzia mantentzeko (Lin et al., 2014).

3. irudia. Diferentzialki adierazita dauden lncRNA guztien eta laginen taldekatzea entzefalo ehunean. Berdeak azpiadierazpena adierazten du eta gorriak gainadierazpena. TUNA lncRNA kontserbatua MSTRG.9933 kodeari dagokio.



4. Ondorioak

Lan honetan RNA-seq datu-multzo bat erabilita ardien lncRNAk identifikatu, kuantifikatu eta aluminioaren aurrean duten jokaera aztertu da. Ugaztunen transkriptomak oso konplexuak direla argi geratu da azkenaldian eta mRNA klaseaz haraindi bestelako funtzioak dituzten RNA klaseak garrantzia hartzen ari dira. LncRNA geneen eboluzioa aztertzeke sekuentzietatik haratago doazen hurbiltze berriak beharrezkoak agertu dira, filogenetikoki gertu dauden espezieen arteko konparaketen kasurako ere, behiaren eta ardiaren artekoak adibidez. Azkenik, txertoen laguntzaile bezala erabiltzen den aluminioak dirudienez lncRNA batzuen adierazpena aldatzen du odol zelula mononuklearretan, baina harrigarriagoa dena, entzefaloan ere eragina du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Eskura ditugun sekuentziazio datuak probestuz lncRNA, miRNA eta mRNA datuak integratzen ari gara. Geneen ko-adierazpen analisien bitartez aztertuko dugu lncRNA hauek zein gene kodetzaileekin batera adierazten diren, lncRNAk miRNA-ituak diren eta miRNA hauek mRNA molekulengan egiten duten errepresioa lncRNA transkriptoen eraginez ahuldu daitekeen. Bestalde, RNA ez-kodetzaile hauen elkarrekintzak auresaten ari gara. Horrela, ardien lncRNA geneen ezagutza zabaldu eta aluminioarekin lotutako hautagaiak identifikatuko dira eurekin analisi funtzionalak egiteko.

6. Erreferentziak

- Asín, J., Pérez, M., Pinczowski, P., Gimeno, M., & Luján, L. (2019). From the bluetongue vaccination campaigns in sheep to overimmunization and ovine ASIA syndrome. *Immunologic Research*. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9059-7>
- Bush, S. J., Muriuki, C., McCulloch, M. E. B., Farquhar, I. L., Clark, E. L., & Hume, D. A. (2018). Cross-species inference of long non-coding RNAs greatly expands the ruminant transcriptome. *Genetics Selection Evolution*, 50(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12711-018-0391-0>
- Cao, H., Wahlestedt, C., & Kapranov, P. (2018). Strategies to Annotate and Characterize Long Noncoding RNAs: Advantages and Pitfalls. *Trends in Genetics*, 34(9), 704–721. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.06.002>
- Deveson, I. W., Hardwick, S. A., Mercer, T. R., & Mattick, J. S. (2017). The Dimensions, Dynamics, and Relevance of the Mammalian Noncoding Transcriptome. *Trends in Genetics*, 33(7), 464–478. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.04.004>
- Dykes, I. M., & Emanuelli, C. (2017). Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 15(3), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.005>
- Hezroni, H., Koppstein, D., Schwartz, M. G., Avrutin, A., Bartel, D. P., & Ulitsky, I. (2015). Principles of Long Noncoding RNA Evolution Derived from Direct Comparison of Transcriptomes in 17 Species. *Cell Reports*, 11(7), 1110–1122. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.023>
- Koufariotis, L. T., Chen, Y. P. P., Chamberlain, A., Jagt, C. Vander, & Hayes, B. J. (2015). A catalogue of novel bovine long noncoding RNA across 18 tissues. *PLoS ONE*, 10(10), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141225>
- Kuo, R. I., Tseng, E., Eory, L., Paton, I. R., Archibald, A. L., & Burt, D. W. (2017). Normalized long read RNA sequencing in chicken reveals transcriptome complexity similar to human. *BMC Genomics*, 18(1), 323. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3691-9>
- Laurent, G. S., Wahlestedt, C., & Kapranov, P. (2016). The Landscape of long non-coding RNA classification Georges. *Trends in Genetics*, 31(5), 239–251. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.007>
- Lin, N., Chang, K. Y., Li, Z., Gates, K., Rana, Z. A., Dang, J., Zhang, D., Han, T., Yang, C. S., Cunningham, T. J., Head, S. R., Duester, G., Dong, P. D. S., & Rana, T. M. (2014). An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Molecular Cell*, 53(6), 1005–1019. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.021>
- Luo, S., Lu, J. Y., Liu, L., Yin, Y., Chen, C., Han, X., Wu, B., Xu, R., Liu, W., Yan, P., Shao, W., Lu, Z., Li, H., Na, J., Tang, F., Wang, J., Zhang, Y. E., & Shen, X. (2016). Divergent lncRNAs regulate gene expression and lineage differentiation in pluripotent cells. *Cell Stem Cell*, 18(5), 637–652. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.024>
- Muret, K., Klopp, C., Wucher, V., Esquerré, D., Legeai, F., Lecerf, F., Désert, C., Boutin, M., Jehl, F., Acloque, H., Giuffra, E., Djebali, S., Foissac, S., Derrien, T., & Lagarrigue, S. (2017). Long noncoding RNA repertoire in chicken liver and adipose tissue. *Genetics Selection Evolution*, 49(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0275-0>
- Scott, E. Y., Mansour, T., Bellone, R. R., Brown, C. T., Mienaltowski, M. J., Penedo, M. C., Ross, P. J., Valberg, S. J., Murray, J. D., & Finno, C. J. (2017). Identification of long non-coding RNA in the horse transcriptome. *BMC Genomics*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3884-2>

- Signal, B., Gloss, B. S., & Dinger, M. E. (2016). Computational Approaches for Functional Prediction and Characterisation of Long Noncoding RNAs. *Trends in Genetics*, 32(10), 620–637. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.08.004>
- Ulitsky, I. (2016). Evolution to the rescue: Using comparative genomics to understand long non-coding RNAs. *Nature Reviews Genetics*, 17(10), 601–614. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.85>
- Varela-Martínez, E., Abendaño, N., Asín, J., Sistiaga-Poveda, M., Pérez, M. M., Reina, R., De Andrés, D., Luján, L., & Jugo, B. M. (2018). Molecular signature of aluminum hydroxide adjuvant in ovine PBMCs by integrated mRNA and microRNA transcriptome sequencing. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 2406. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02406>
- Xu, Y., Zhang, H., Pan, B., Zhang, S., Wang, S., & Niu, Q. (2018). Transcriptome-Wide Identification of Differentially Expressed Genes and Long Non-coding RNAs in Aluminum-Treated Rat Hippocampus. *Neurotoxicity Research*, 34(2), 220–232. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9879-1>

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Nafarroako Agrobioteknologia Institutuarekin eta Zaragozako Unibertsitateko Albaitaritza Fakultatearekin batera dugun proiektuari (MINECO: AGL2013-49137-C3-3-R, AGL2013-49137-C3-2-R eta AGL2013-49137-C3-1) esker burutu da. UPV/EHUko doktorego aurreko kontratua dute M. Bilbao-Arribas-ek (PIF17/306) eta E. Varela-Martínez-ek (PIF15/361), eta UPV/EHUko doktorego ondoko kontratua N. Abendaño-k (ESPDOC16/43).

Ama hizkuntzaren erabileraren eragina Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonaren akonpainamenduan

Goyheneche, Maritxu

(ergoterapeuta) LURO fundazioa

m.goyheneche@hotmail.com

Laburpena

Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonak, ama hizkuntza erabiltzearen joera luke. Ikerketa honek « zein izango litzateke ama hizkuntzaren erabileraren eragina Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonaren akonpainamenduan » galderari erantzunen dio. Horrentzat Alzheimer dementziaz hunkituak diren 4 pertsonaren garbitze denborak bai euskaraz, bai frantsesez eginak eta ebaluatuak izan dira. Medikuntzako hamar profesional galdezkatuak izan dira ere, haien iritzi subjektiboa gai honi buruz biltzeko. Oro har, egiaztatu da, ama hizkuntzak eragin baikorra duela Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonaren motibazioaren gainean, baita haien esku hartzean eta jarreraren ere.

Hitz gakoak : Alzheimer Dementia, ama hizkuntza, motibazioa, esku hartzea.

Abstract

People with Alzheimer's disease will be more likely to use their mother tongue. This is why this research answer the question " what would be the impact of the mother tongue in the support of a person suffering from Alzheimer's disease ". For this, the toilets of people were made and evaluated in Basque and French. 10 medical professionals were also interviewed, in order to have their subjective opinion on this subject. In short, it proves that the mother tongue would have a positive impact on the motivation of a person with Alzheimer's but also on his participation and his behavior.

Keywords : Alzheimer's disease, mother tongue, motivation, participation.

1. Sarrera

Munduan zehar, herri anitzetan bi hizkuntza bederen mintzatzen dituzten herritarrak aurkitzen dira, baita kultura ezberdinak partekatzen dituztenak ere. Gaur egungo Europan, bere hizkuntza erabiltzen duen komunitate batek, bere aberastasun kulturala, besteeikiko irekidura, eta komunikatzeko nahia erakusten du. Ipar Euskal Herrian eta zehazkiago Euskal Hirigune Elkargoan euskal kultura oso errotatua da. Euskara etxeetan erabilia izateaz gain, lehengo eta gaurko belaunaldiek erabiltzen dute ere bai. Euskararen Erakunde Publikoaren arabera (1), 2016an, Euskal Hirigune Elkargoan 51 200 pertsona inguru euskalduna zen, eta honek eskualde honen populazioaren % 20,5 errepresentatzen du.

Horrekin, interesgarria izango litzateke jakitea ea ama hizkuntzaren erabilerak (kasu honetan euskarak) eragin positiboak litzuzkeen segipen terapeutikoan eta konfiantza harreman bat sortzea artatzailearen eta pazientearen artean ahalbidetzen duen.

Gaur egun, Alzheimer dementzia gero eta gehiago aurkitzen den patologia neurodegeneratibo bat da. 2016an, Fondation de Recherche Médicale -en arabera eta Organisation Mondiale de la Santé (OMS)(2)-ren arabera, munduan 47.5 milioi pertsona dementziaz hunkitua dela estimatzen da, eta hauen artean % 60 eta % 70 Alzheimer dementziaz (AD).

Barkat-Defradas, M., & Frederique Gayraud (2013) (3), De Vreese, L. P., Motta, M., & Toschi, A., -ren ikerketaren arabera, elebiduna den eta Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonari, hizkuntzen nahasketa fenomeno bat agertzen zaio, eta zehazten dute ere bai ama hizkuntza dela pertsona horiek erabiltzen duten lehentasunezko hizkuntza. Baina literatura hori, ez da oraindik oso zabala, eta ez digu oraindik ahalbidetzen ziurtasun handiarekin erratea ea ama hizkuntza elementu laguntzaile bat den Alzheimer dementzia duen pertsonaren akonpainamenduan. Horrez gain, euskarari buruz hori zehazten duen ikerketarik ere ez dago, nahiz eta gaur egun gai honek euskaldun jende anitz hunkitzen duen.

Ikerketa honen helburua ama hizkuntzaren erabileraren abantaila erakustea da AD duten pertsonaren akonpainamenduan, eta gure kasuan, euskararen erabilera euskaldunekin. Ikerketa galdera hortik doa « zein izango litzateke ama hizkuntzaren erabileraren eragina Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonaren akonpainamenduan ? » eta hortik ama hizkuntzak Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonaren motibazioan, parte hartzean eta portaeran influentzia bat duela hipotesia ateratzen da.

2. Arloko egoera

2.1. Alzheimer tipoko dementzia (AD)

Alzheimer dementziaren garapenarekin, hizkuntza arazoak agertzen dira. Melissa Barkat-Defradas eta kideek (4) erraten dute, ADan, hizkuntza arazoak oso heterogeneoak direla. Baina, esplikatzen dute arazoak lehenik hitz ekoizpenean agertzen direla eta ulermena eta idatzia berantago kaltetzen direla. Zehazten dute ere bai, hizkuntza arazoak, ez direla arazo kognitiboak bezala aldatzen.

Melissa Barkat-Defradas eta kideek (2008) (4) dementziaren garapena segitzen duten 3 multzo ezberdintzen dituzte : hitz falta, semantika bereizketa eta diskurtsoaren pobretzea.

Beti Melissa Barkat-Defradas eta kideen arabera (4), ADak komunikazio arazoak ekarriko ditu, eta horrek, pertsona zailtasun egoera baten aurrean emanen du bere eguneroko behar sozial edota emozionalen adierazteko. Komunikatzeko arazo horiek usu pertsonaren haserrealdia sortuko dute eta gehienetan frustrazio handi bat, pazientearen nahiak edo beharrak gaizki ulertuak izanen direlako.

Barkat-Defradas, M., eta Frederique Gayraud-ek (3), esplikatzen dute De Vreese, L. P., Motta, M., eta Toschi, A-en ikerketarekin, sintomak agertu eta hizkuntzen nahasketa fenomeno bat agertzen dela, eta iduri luke pertsonak zailtasunak dituela egokia den hizkuntza hautatzeko. Gainera, elebidunak diren pertsonen zailtasunak lituzkete haien bi hizkuntzak bereizteko. Zailtasun hauek agertuko dira, dementziak, beharrezkoak diren arreta iturriak hunkiko baititu. Ondorioz, dementziak komunikatzeko beharrezkoa den egoeraren espezifikizitatea hizkuntza egokian mintzatzeko hunkiko du. Hau da, hizkuntzak bereizteko eta hizkuntza egokia aukeratzeko kontrola galtzen dute ADaz hunkituak diren pertsonen.

Barkat-Defradas, M eta kideek azpimarratzen dute, elebidunak diren gizarteetan, solaskideak elebidunak izateak komunikazio modifikazioen eragina ttipitzen ahal lukeela. Aldiz, elebakarrak diren gizarteetan, Frantzia bezala (ofizialak ez diren hizkuntza anitz baldin baditu ere, euskara, korsikera bezala...) komunikazio arazoak agertzen ahal dira.

Demoures eta Strube-ek. (2006) (5), esplikatzen dute, jarrera eta sintoma psikologiko ezberdinak agertzen direla ADaren garapenarekin: ezinegona, antsietatea, apatia, hiperemotibitatea... Gatchel, J. R., eta kideen (2017) (6) ikerketarekin, esplikatzen dute, ADan, apatia dela gehienetan agertzen den sintoma. Motibazioaren eta usaian egindako aktibitateen interesa murriztearen ondorioz, eguneroko aktibitateetan parte hartzea apaltzen dela diote.

2.2. Ergoterapeutaren esku hartzea, Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonarekin eta aliantza terapeutikoa.

Ergoterapeutaren xede nagusia, bere akonpainamendua pertsonaren inguruan zentratzea da. Horrentzat, egokitze gaitasun ona beharrezkoa du, aurkituko dituen profil ezberdinen aitzinean bere akonpainamendua osoa eta egokitua izan dadin.

Gaitasunen erreferentzialaren arabera (2018) (7), ergoterapeutak deszentralizatzeko gai izan behar du, bere kulturaz haratago ikusteko eta horri esker, artatzen dituen pertsona guzietan bizi proiektu berezi eta pertsonal bat finkatzeko gisan.

“Artatzaile eta paziente harremana” aipatzen delarik, aliantza terapeutikoa aipatzen da ere bai. Hau da, « sortua den harremana artatzailearen eta pazientearen artean, bata bestearekin elkarlanean aritzea engaiatu denean, pazientearentzat hobekuntza bat aurkitzeko asmoarekin » BOSSIO L, DHONT M. (2012) (8).

Anne Lacroix (2010) (9)k aliantza terapeutikoa partekatze esperientzia bat bezala definitzen du, non ikusmoldeak, jarrerak eta portaerak aldaketa jasan dezaten, eta non artatzaileak « harremanari » pentsatu behar dion « ekintzari » pentsatu baino lehen. Azpimarratzen du ere bai ikusmolde kliniko horrek pazientearen hitza biltzea lagunduko duela, hitzen bitartez pertsonak bere zailtasun eta trabak partekatuko baititu.

Aldiz, Pascal Grouber -ek (10) zehazten duen bezala, pertsona ez da bere dementzian bakarrik ttipitua eta oso garrantzitsua da akonpainamendu etiko bat eraikitzea, portaera sozial egokiek, pertsonaren gaitasunak sustatzeko gisan. Aurkezten du ere bai, dementzia instalatua delarik, garrantzitsua dela bizi estruktura egonkortasun bat atxikitzea pertsonarentzat, dituzten konpetentziak sustatzeko erritua eta programekin. Bestalde, oinarritzat dela ADA duen pertsona bat artamendu erlazio zentroan ematea, diote ere bai.

Oro har, jakinez ulermen on batek konfiantza lagunduko duela, eta ADaz hunkituak diren pertsonak ama hizkuntzara berriz itzultzeko joera luketela, ergoterapeutak, baita medikuntzako diziplina guztiek ere (pertsonaren eguneroko usaietan parte hartzen baitute) haien gaitasunen arabera, haien hizkuntza eta hitz egiteko usaiak pertsonaren maila gizarte-kulturalean egokitu behar dituzte.

3. Ikerketaren muina

3.1. Ikerketaren egitura eta helburua

Ikerketa hori, LURO fundazioan egin da (Izpuran kokatua). Euskal Herrian eta zehazkiago Nafarroa Beherean kokatua den zahar etxe hori bereziki hautatua izan da, pertsona elebidun kopuru handi bat biltzen duelako, bai artatzaileetan, bai pazienteetan ere ; eta gehiengo batek ama hizkuntza euskara duelako. Ondorioz, ingurumen multikultural hori oso egokia da elebidunak (euskara/frantsesa) eta ADaz hunkitua den pertsonaren akonpainamendua ikertzeko.

Lehen partean ADaz hunkitua diren lau pertsona eguneroko egoeretan aztertuak izan dira. Hala nola, terapeutak, goizeko garbitze momentua bi tarte ezberdinetan egiten du, bat euskaraz eta bestea frantsesez. Artatze mementu horiek “Volitional Questionnaire” (1.eranskina) delakoarekin ebalatuak izan dira.

Ebaluazio hori motibazioak zoin diren erakustea gai ez den pertsonarentzat pentsatua izan da. Galdeketa honetan, artatzaileak 14 sail bete beharko ditu pazienteak egindako aktibitatea behatu ondoren. Saila bakoitzean, aldi oro pazienteak definitzen duten lau hitzen artean bakar bat hautatu beharko du, lau hitzak izanki : 1)pasiboa, 2)dudakorra, 3)inplikatua eta 4)bere baitatik.

Eta sailak besteak beste izanki :

- Aktibitatearekiko kuriositatea erakusten du.
- Iniziatibak hartzen ditu.
- Agertzen diren arazoak konpontzen saiatzen da.
- Aktibitatea bukaera arte segitzen du.
- ...

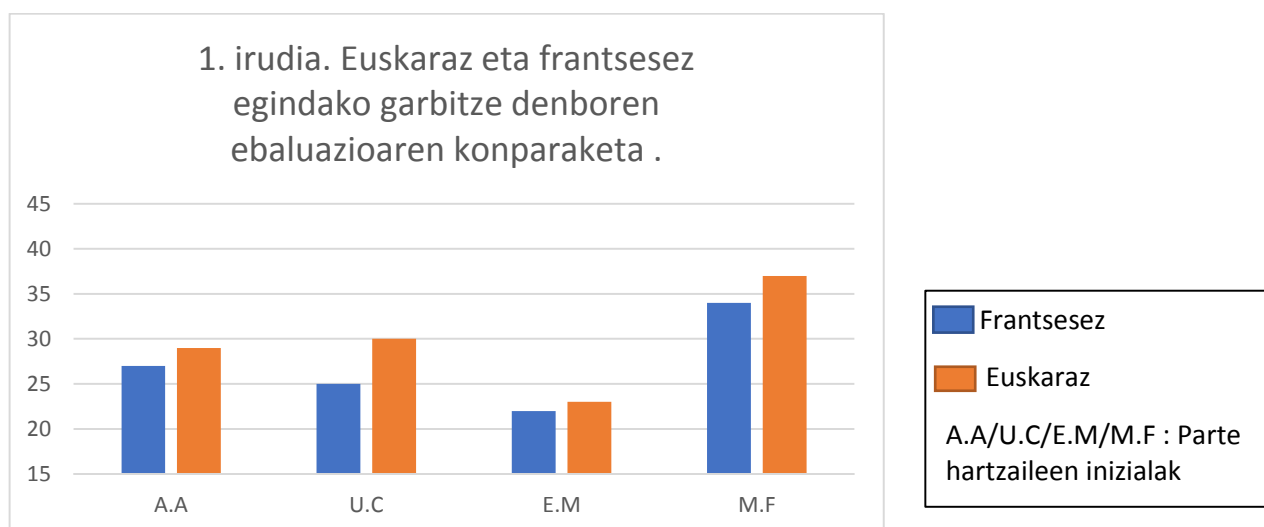
Ondotik puntuatzea kontatuko da, jakinez gero eta emaitza goragoa izan, orduan eta motibazioa goragoa izanen dela. Aktibitate anitz behatu ondoren, edo kasu honetan, ber aktibitatea ingurumen ezberdin batean (hizkuntzaren erabilpena), emaitza ezberdinek pertsonaren motibazioaren aldaketa erakusten digute baita motibazio gehien ekartzen duen testuingurua ere. (11)

Behaketa eta ebaluazio horren helburuak hauek ziren : aktibitate denboran, ea euskararen erabilerak eraginik duen motibazioan eta parte hartzean.

Bigarren partean, galdeketa kualitatibo bat eginga izan da, zahar etxeko profesionalekin, elkarrizketa erdi estrukturatu baten bidez (hala nola, galderak nahitara zabalak eta irekiak ziren, errazkiago profesionalen esperientzia eta pentsatzeko manierak biltzeko). (2.eranskina). Helburua, profesionalen esperientzia subjektiboen bidez ikustea zen, ea euskararen erabilerak motibazioan, parte hartzean baita portaeran ere eragina duen ADaz hunkitua den pertsonarengan.

3.2. Emaitzak

3.2.1. Eguneroko egoeren emaitzak (motibazioa, eta parte hartzea ebaluatzen dutenak)



3.2.2. Galdeketen emaitzak

- Ama hizkuntzaren erabileraren eragina, motibazioan ADaz hunkitua den pertsonarengan.

Profesionalen iduriko, pertsonak ez du hain apatikoa iduri eta aktibitate proposamenari irekiagoa da bere ama hizkuntza erabiltzen duelarik. Iruditzen zaie, euskarazko hitz batzuekin aski dela, hari beharrezkoa den kuraia emateko eguneroko aktibitate baten egiteko. Profesionalen ustez, konfiantzazko harreman batetik etorriko litzateke, ama hizkuntzarekin sortzen den hurbiltasunari esker.

Erizainek eta ergoterapeutak, baieztatzen dute euskaraz mintzatzean ADaz hunkitua den pertsona batekin, kuriositate gehiago duela eta bere buruaz askoz gehiago hitz egingen duela. Pertsona erneago atzematen dute eta eguneroko aktibitateetan gehiago parte hartzen duela sentitzen dute. Segurtatzen dute artatzaileak beste irudi bat duela pazientearen begietan ama hizkuntza erabiltzen duelarik. Eta horri esker errazago zaie pertsonaren egoera psikologikoa ezagutzea baita haien sentimen afektiboak ere. Mediku geriatrikoak azaltzen du « ama hizkuntza, buruan errotuena den hizkuntza da eta ondorioz semantika bereizketak urriagoak izanen dira edo berantago agertuko dira ». Ama hizkuntzaren erabilerari esker pertsonak elkarrizketan gehiago parte hartuko du, eta ondorioz bere ingurumenari interesa gehiago ekarriko dio.

- Ama hizkuntzaren erabileraren eragina, ADaz hunkituak diren pertsonaren parte hartzean.

Profesional guztiek, esplikatzen dute, ADaz hunkitua den pertsonak aktibitate batean gehiago parte hartuko duela, aktibitate hori euskaraz esplikatua edota pasatzen denean. Haien ustez, ama hizkuntza erabiltzeak, pertsona hauen entzumena baita ulermena ere errazten du, mezua argiagoa eta zehatzagoa izanen baita haientzat. Gero eta onuragarriagoa litzateke, haien iduriko, sentimendu eta emozioen adierazpena laguntzen baitu. Batzuek sentitzen dute pertsona erneagoa izanen dela eta atentzio askoz gehiago erakutsiko duela bere hizkuntza erabiltzen dugularik. Ergoterapeutak, beste profesionalek bezala dio, pertsona konfiantza handiagoan sentitzen dela, baina, gehitzen du helburuak eta aginduak hobeki ulertuak izanen direla ama hizkuntza erabiliz. Horri esker, aktibitatea adierazgarriagoa izanen da eta ondorioz parte hartzea hobea.

- Ama hizkuntzaren erabileraren eragina, ADaz hunkituak diren pertsonaren portaeran.

Profesionalak ohartzen dira, euskara erabiltzean, portaeraren alderdi batzuk aldatzen direla. Hala nola, gehienek (8/10 gain) sentitzen dute pertsona seguritatean dela, trukaketa euskaraz egiten denean. Erizain batek zion « bere gorputza lasaituko da, errazkiago utziko du jendea beregana hurbitzen, eta artatzaile baten laguntza ere errazkiago onartuko du, dutxa denboran adibidez ». Honek antsietatea zinez ttipitzen duela diote, pertsona askoz lasaituagoa sentituko baita eta ez hain galdua. Erizain laguntzaileek eta erizainek azaltzen dute eguneroko bizian, ADaz hunkituak diren pertsonak, usu herstura edota ezinegon gertakariak dituztela eta batzuetan oldarkorrak ere bai. Ohartu dira gertakari hauek lasaitzea

askoz errazago dela euskaraz aritzen direnean. Horrez gain, baieztatzen dute zinez ama hizkuntzaren erabilerak errazten duela mintzatu nahi ez duen pertsona batekin hitz egiteko eta eguneroko aktibitate batean parte hartzeko negoziatzeko tenorean. Erizainek esplikatzeko, trukaketan sortutako konfiantzari esker, pertsona gustura izanen dela eta berekiko informazio gehiago partekatuko dituela baita sentimendu anitz ere, eta horri esker artaren kalitatea hobetuko dela.

4. Ondorioak

Ikerketa honen galdera nagusia « zein izango litzateke ama hizkuntzaren erabileraren eragina Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonaren akonpainamenduan » zen.

Hortik ama hizkuntzak Alzheimer dementziaz hunkitua den pertsonaren motibazioan, parte hartzean eta portaeran eragina lukeelako hipotesia aztertu zen. Horri erantzuteko, garbitze egoerak antolatuak izan dira (bai euskaraz, bai frantsesez) zahar etxeko 4 pertsonarekin, eta galdeketa bat pasarazia izan da LURO fundazioko hamar bat profesionalei.

Eguneroko aktibitate bat egitekoan, goizeko garbitze denbora bezala adibidez, iduri luke ama hizkuntzak pertsonaren parte hartzean eta motibazioan inpaktu bat lukeela.

LURO fundaziotik galdezkatuak izan diren profesionalek azpimarratu dute ama hizkuntzaren erabilpenak eragin positibo bat duela ADaz hunkituak diren pertsonen parte hartzean, motibazioan eta portaeran. Profesional hauek azaltzen dute pertsona bakoitzaren arabera akonpainamendua egokitzen dutela eta ondorioz usu euskara erabiltzen dutela LURO fundazioko pertsonekin. Esplikatzeko ere bai hizkuntza honek pertsonaren mintzamina laguntzen duela baita sentimendu eta emozioen ulermena ere. Sentitzen dute pertsona konfiantza handiagoan dela eta horri esker artak errazkiago onartuko dituela. Gainera, haien portaera egokituz eta euskara erabiliz, ohartu dira ADaz hunkitua den pertsona aktibitate proposamenari askoz irekiagoa dela. Pentsatzen dute ere bai kontsignak eta helburuak ulergarriagoak direla eta ondorioz aktibitatea adierazgarriagoa izanen dela. Oro har, haien iritziz ama hizkuntzaren erabilerak artaren kalitatea zinez laguntzen duela baieztatzen dute.

Bukatzeko, ikerketa hori ADaz hunkitua den pertsonari zuzendua zaio, baina, profesional batzuen arabera, ama hizkuntzak pertsonaren akonpainamenduan eragina luke beste eritasun neurologikoetan ere bai, hala nola istripu zerebrobaskularren (iktus) artamenduan adibidez. Ezagutza hauekin, interesgarria izango litzateke ama hizkuntzaren eragina ikertzea istripu zerebrobaskular bat ukan duen pertsonaren akonpainamenduan eta errehabilitazioan.

5. Erreferentziak

1. Office Public de la Langue Basque (OPLB), Sous-Ministère à l'Éducation, Gouvernement de Navarre. Situation de la langue basque Résultats de la 6ème enquête sociolinguistique 2016 [Internet]. 2016 [cited 2018 Apr 13]. Available from: http://www.mintzaira.fr/fileadmin/documents/Enquete_sociolinguistique/Syn-these_2016_francais.pdf
2. Fondation Recherche Médicale. L'ampleur de la maladie d'Alzheimer en France et dans le monde [Internet] [Lieu inconnu]. [cited 2017 Nov 18]. Available from: <https://www.frm.org/alzheimer/ampleur-maladie.html>
3. Barkat-Defradas M, Frederique Gayraud. Bilinguisme et maladie d'Alzheimer. Rééducation orthophonique. 2013;Les pathologies acquises du langage chez le patient bi- ou multilingue(253):31–52.
4. Barkat-Defradas M, Sophie M, Rico-Duarte L, Brouillet D. Les troubles du langage dans la maladie d'Alzheimer. In: 27^e journée d'études sur la Parole [Internet]. Avignon, France; 2008. p. actes électro-niques non numérotés. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00321233>
5. Demoures G, Strubel D. Prise en soin du patient Alzheimer en institution. Issy-les-Moulineaux: Masson; 2006.
6. Gatchel JR, Donovan NJ, Locascio JJ, Becker JA, Rentz DM, Sperling RA, et al. Regional 18F-Fluorodeoxyglucose Hypometabolism is Associated with Higher Apathy Scores Over Time in Early Alzheimer Disease. The American Journal of Geriatric Psychiatry. 2017 Jul;25(7):683–93. DOI : 10.1016/j.jagp.2016.12.017
7. Ministère du travail, de la solidarité et de la fonction publique, ministère de la santé et des sports. Diplôme d'état d'ergothérapeute référentiel de compétences [Internet]. [cited 2018 Jan 19]. p 178. Available from: <http://www.unilim.fr/ilfomer/files/2012/03/R%C3%A9f%C3%A9rentiel-de-comp%C3%A9tences-DEE.pdf>
8. BOSSIO L, DHONT M. Alliance thérapeutique, socle de la collaboration soignant – soigné - 200912bossio.pdf [Internet]. Congrès du département infirmier. 2012 Sep 20 [cited 2018 Apr 11]; Available from: <http://www.chu-charleroi.be/sites/default/files/documents/200912bossio.pdf>
9. Lacroix A., construire l'alliance thérapeutique, sur quoi, comment ?, dans Education du Patient et Enjeux de Santé, vol 28, n°3, Yvoir, 2010, pages 125 à 126
10. Question Santé - Alzheimer. Changer le regard des intervenants [Internet]. Question Santé. [cited 2018 Feb 28]. Available from: <http://questionsante.org/nos-publications-periodiques/bruxelles-sante/anciens-numeros/58-bs-76/68-alzheimer-changer-le-regard-des-intervenants>
11. . Jen-Suh Chern, Gary Kielhofner, Carmen, Gloria de las Heras, Livia C. Magalhaes. The Volitional Questionnaire: Psychometric Development and Practical Use [Internet]. [cited 2018 Mar 7]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/61d4/57480bcc77d6180031673aefadded25648a7.pdf>

6. Eskerrak

Lehenik, ene tutorea LEROY anderea HELHA eskolan Montignies-sur-Sambre-en erakasle dena eskertu nahi nuke. Honek, sustengatu, aholkatu eta segitu nau ene metodologian baita lan honen idazketa guzian ere. Ene bigarren tutorea, OSTROWIECKI anderea, LURO fundazioan ergoterapeuta dena eskertu nahi nuke ere bai, enekin partekatu dituen esperientzia eta ezagutzentzat. Ene esker onak bereziki LURO fundazioaren ekipa guztiari eskaintzen ditut, ene ikastaro osoan sustengatu nautelako eta erakutsi duten interesa eta suhartasunarentzat baita partekatu dituzten esperientzia guzientzat ere.

QUESTIONNAIRE VOLITIONNEL

Grille de résultats – QV

Centre de référence du modèle de l'occupation humaine (www.fmed.ulaval.ca/crmoh)

Client :	Situation d'observation :		
Âge :	Thérapeute :		
Diagnostic :	Date :		
	Hospitalisé :		
	Externe :		

DIMENSION ÉVALUÉE	ÉCHELLE DE COTATION				COMMENTAIRES
	P	H	I	S	
1. Fait preuve de curiosité	P	H	I	S	
2. Prend des initiatives	P	H	I	S	
3. Tente de faire quelque chose de nouveau	P	H	I	S	
4. Montre de la ténacité	P	H	I	S	
5. Cherche des défis à relever	P	H	I	S	
6. Cherche à assumer plus de responsabilités	P	H	I	S	
7. Essaie de corriger ses erreurs	P	H	I	S	
8. Essaie de résoudre les problèmes	P	H	I	S	
9. Montre ses préférences	P	H	I	S	
10. Poursuit l'activité jusqu'à la fin	P	H	I	S	
11. Maintient sa participation à une activité	P	H	I	S	
12. S'investit dans ses activités avec plus d'énergie, d'émotion et d'attention	P	H	I	S	
13. Fixe des objectifs	P	H	I	S	
14. Montre qu'une activité est significative ou qu'elle a un attrait particulier	P	H	I	S	
TOTAL					
	P = 1	H = 2	I = 3	S = 4	

Légende :	P = passif	H = hésitant	I = impliqué	S = spontané
Échelle de cotation :				

Traduction par Monique Gilel, du « The Volitional Questionnaire » (version 4.0) de Carmen Gloria de Las Heras, Rebecca Geist et Gary Kohnen, Université de l'Illinois, Chicago. CRMCH, janvier 2005

2. Eranskina : **Galdeketa**

1. Zoin da zure ama hizkuntza ?

2. Zahar etxeko pertsonarekin zoin hizkuntzetan hitz egiten duzu ?

3. Zertan ama hizkuntzaren erabilerak Alzheimer dementziaz hunkia den pertsona baten ulermenean eragiten du ?

4. Zure ustez, Alzheimer dementzia duen pertsona bat, gehiago konfiantzan sendituko da bere ama hizkuntzan hitz egiten badiozu ?

5. Zure ustez, pertsona hori motibatuago izanen da bere ama hizkuntzan hitz egiten badiozu ? Nola ?

6. Senditzen duzua ADz hunkitua den pertsona batek, aktibitate batean gehiago parte hartuko duela hizkuntza bat edo bestean hitz egiten badiozu ? Zergatik ?

7. Zure ustez, erabilitako hizkuntzak eragin bat ukan dezake ADz hunkitua den pertsona baten portaeran aktibitate denboran ? Zergatik ?

8. Beste aldaketa batzuk badirela pertsonaren portaeran euskaraz hitz egiten diozunean (bere ama hizkuntzean) ? Zerbait gehitu nahi zenuke ?

Ingurune aberastuak nerabezaroan alkoholarekin trataturiko C57BL6J saguen iraupen luzeko CB₁ hartzailearen mendeko plastikotasuna berreskuratzen du.

-Paradigma honen azpian ezkutatzen diren mekanismo zelularren bila-

Rico-Barrio, Irantzu^{1,2}; Peñasco, Sara^{1,2}; Buceta, Ianire^{1,2}; Puente, Nagore^{1,2};
Olea, Ane^{1,2}; Lekunberri, Leire^{1,2}; Serrano, Maitane^{1,2}; Reguero, Leire^{1,2};
Egaña-Huguet, Jon^{1,2}; Terradillos, Itziar^{1,2}; Achicallende, Svein^{1,2};
Gerrikagoitia, Inmaculada²; Elezgarai, Izaskun^{1,2} eta Grandes, Pedro^{1,2}

¹Neurozientziak Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea,

²Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHU Zientzia Parkea

irantzu.rico@ehu.eus

Laburpena

Gizartean duen prebalentzia-tasa altua dela eta, gehiegizko alkohol-kontsumoa, batez ere nerabezaroan, osasun arazo larria bilakatzen ari da. Alkohol kontsumoaren erregulazioan, endokannabinoiden sistemak funtsezko eginkizun bat betetzen du. Izan ere, etanolaren gehiegizko kontsumoak CB₁ hartzailearen mendeko iraupen luzeko plastikotasunaren galera eragiten du. Ingurune aberastuak (IAk) hainbat aldaketa mesedegarri eragiten ditu garunaren garapen prozesuan; garun lesio ezberdinen berreskurapenean duen parte-hartzea egiaztatuz. Gure xedea, nerabezaroan alkohol-kontsumoaren ondorioz sorturiko iraupen luzeko plastikotasun asalduren aurrean IAk duen potentzialtasun terapeutikoa aztertzea da; baita onura posible horien azpian dauden mekanismo zelularrak ere.

Hitz gakoak: Alkohol-kontsumoa, endokannabinoiden sistema, ingurune aberastua, plastikotasuna.

Abstract

Abusive alcohol consumption, especially during the adolescent stage, has become one of the main problems that most concern our society. There is considerable evidence for the involvement of the endocannabinoid system in alcohol. In fact, alcohol abuse promotes long-term CB₁ mediated loss of plasticity. Enriched environment (EE) significantly facilitates recovery from brain injury through the interaction with functional changes occurring along brain development. Our aim is to investigate the therapeutic potential long-term effect of the EE on the plasticity impairment induced by chronic ethanol intake during adolescence; including the cellular mechanisms that underlie the possible beneficial effects.

Keywords: Alcohol, endocannabinoid system, enriched environment, plasticity.

1. Sarrera eta motibazioa

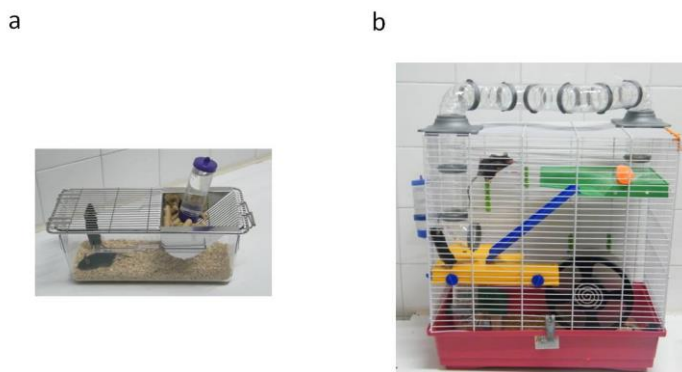
Alkohola nerabeek astebururo gehien kontsumitzen duten mendekotasun-sortzailea da. Munduko Osasun Erakundearen (MOE) arabera alkohola da; kokainaren, bizigarri sintetikoen, haluzinogenoen edo kannabisaren deribatuen gainetik, pertsonen osasun fisikorako, psikikorako eta sozialerako drogarik arriskutsuena. Adingabeko gazteak gero eta goizago hasten dira gehiegizko alkohol-kontsumo intentsiboan murgiltzen eta asteburuetako mozkorraldiak, botiloia edo “litroak egin” deritzon ohiturak handipen nabarmena adierazi du azken hamarkadan (Osasun Saila, 2014). Botiloia bi orduko tartean bost edari edo gehiago hartzean datza. Ohitura horrek epe luzeko ondorio neurobiologikoak eta psikopatologikoak eragiten ditu; neurogenesiararen inhibizioa, neurotransmisioaren galera, plastikotasunaren asaldura (Keshavan et al., 2014), eta prozesu hauekin zuzenki erlazionatuta dagoen narriadura kognitiboa aipatzekoak dira, besteak beste (Rico-Barrio et al., 2018). Hori gutxi balitz bezala, alkoholak arre-ta maila murrizten du, gizarte harremanak zaildu, portaera arazoak sortu eta epe luzera, mendekotasuna sortzeko arriskua handitzen du.

Aipatutako kalte horiek jasateko arriskua handiagotu egiten da kontsumoa nerabezaroan hasi bada, non garunean etengabeko garapen eta heltze prozesu bat ematen den (Crews et al., 2016). Nerabezaroa bizitzako bigarren hamarkadarekin bat datorren aldaketa denboraldi garrantzitsu bat da. Tarte horretan, garun sentikortasuna handitzen da; etengabeko garapen fisiko, psikiko, emozional eta soziala gertatuz. Hortaz, nerabezaroko gehiegizko alkohol kontsumoak, epe luzeko garun erasana jasateko arriskua esanguratsuki handiagotzen du (Kyzar et al., 2016).

Sistema kannabinoide endogenoa (SKE) garuneko komunikazio sistema fisiologiko moldakor neuromodulatzaile bat da eta alkohol kontsumoaren erregulazioan, funtsezko eginkizun bat betetzen du. SKE bi oinarritzko endokannabinoidetaz (eKB) konposatuta dago: anadamina (AEA) eta 2-arakinodilglizerol (2-AG). EKB hauen efektuak bi hartzaile nagusien bitartez gauzatuko dira: CB₁ eta CB₂. Azken urteotako ikerketek ere TRPV1 hartzailea SKEarekin zuzenki erlazionatuta dagoela agerian utzi dute (Ianotti et al., 2016). N-azil fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD) eta diazilglizerol lipasa (DAGL) entzimek AEA eta 2-AGren biosintesian parte hartzen dute. Bestalde, gantz azidoen amida hidrolasa (FAAH) eta monoazilglizerol lipasa (MAGL); AEA eta 2-AGren degradazioaz arduratuko dira, hurrenez hurren (Ianotti et al., 2016). SKE alkohol kontsumo eta mendekotasun portaeren iturri garrantzitsu gisa identifikatu da (Pava eta Woodward, 2012). CB₁ hartzaile kannabinoideen agonisten administrazio akutua, dosiaren mendeko alkohol kontsumoaren handipen bat dakar (Colombo et al., 2002); CB₁ hartzailearen alderantzizko agonistak, aldiz, borondatezko alkohol kontsumoaren murriztapen esanguratsua erakutsi dute (Economidou et al., 2006).

Ingurune aberastua (IA) “objektu desberdinen, elkarrekintza soziala eta ariketa fisikoaren konbinazioa da” (Rosenweig et al., 1978). Ingurugiro berezi hauek ohiko laborategi kaiolak (1. irudia a) baino handiagoak dira. Bertan, korrika egiteko gurpilak, aldapak, tunelak eta kolore, tamaina eta ehundura ezberdinetako objektuak kokatzen dira. Objektu hauei esker, animalien zentzumenen kitzikapena, ariketa fisikoa eta elkarrekintza soziala sustatu egiten dira, garunaren gaitasun motorra, sentsitiboa eta kognitiboa sustatuz eta garapen prozesuko aldaketa molekular, anatomiko zein funtzionalak bermatuz (Yau et al., 2014). IAK plastikotasun aldaketa nabarmenak bultzatzen ditu eta deskribatutako onura hauek, faktore neurotrofikoaren askapenaren areagotzearekin, arborizazio dendritiko handiago batekin eta helduaroan behatutako sinaptogenesi (sinapsien eraketa) eta neurogenesi (neuronen sorrera) hipokanpalaren handipenarekin lotuta daude (Yau et al., 2014). Hortaz, ingurune aberastuaren paradigma honek garun lesio ezberdinen berreskurapenean izan dezakeen parte-hartze garrantzitsua zein onuragarria azpimarratu beharra dago.

1. irudia. a) Ohiko laborategi kaiola eta b) ingurune aberasturiko kaiola



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gehiegizko alkohol kontsumoaren ohitura, sahiestu edo ekidin daitekeen lehen hilkortasun kausa da. Oro har, MOEk onartutako datuen arabera, alkoholaren gehiegizko kontsumoak edo alkoholismoak 3,3 milioi hildako eragiten ditu urtero. Azken urteetan betekadetan oinarritutako alkohol-kontsumoa,

sendo nagusitu da gazteen ohituren artean, eta inkesten arabera, 14-18 urte bitarteko gazteriaren herena tradizio horretan murgildu da azken hilabeteen (Osasun Saila 2014). Alde batetik, epe motzeko arriskuak ekar ditzake eta hain ezagunak ez diren, eta berriki behatu izan ditugun iraupen luzeko narriadura kognitiboa eta plastikotasun sinaptikoan inplikaturako dagoen seinaleztapen endokannabinoiden fisiologikoa aupadatzen du. Zehazki, nerabezaroko 4 astetan zehar aldizkako %20ko alkohol kontsumoan egon diren sagu arren CB₁ hartzailearen mendeko iraupen luzeko plastikotasuna galtzen da [Peñasco et al., 2015 (argitaratzeko zain)].

Ingurune aberastuak hainbat aldaketa eragiten ditu garunean; kortexaren pisua, lodiera zein tamaina handiagotu eta ikas-ahalmenarekin eta oroimen prozesuekin erlazionatuta dagoen hipokanpoa deritzon eremu anatomiko bolumenaren handipena deskribatu dira besteak beste (Bennett et al., 1969; Diamond et al., 1976). Zentzumenen garapena eta kitzikapena bultzatzeaz gain, angiogenesia (lehendik dauden odol-hodietatik odol-hodi berriak sortzea) (He et al., 2017), sinaptogenesia (Birch et al., 2013), neurogenesia eta faktore neurotrofikoaren adierazpena eta askapena sustatzen ditu (Ickes et al., 2000), hipokanpoan bereziki. Horrez gain, apoptosi (zelulen heriotza programatua) prozesuaren murriztapenean ere parte hartzen duela frogatu da (Chen et al., 2017).

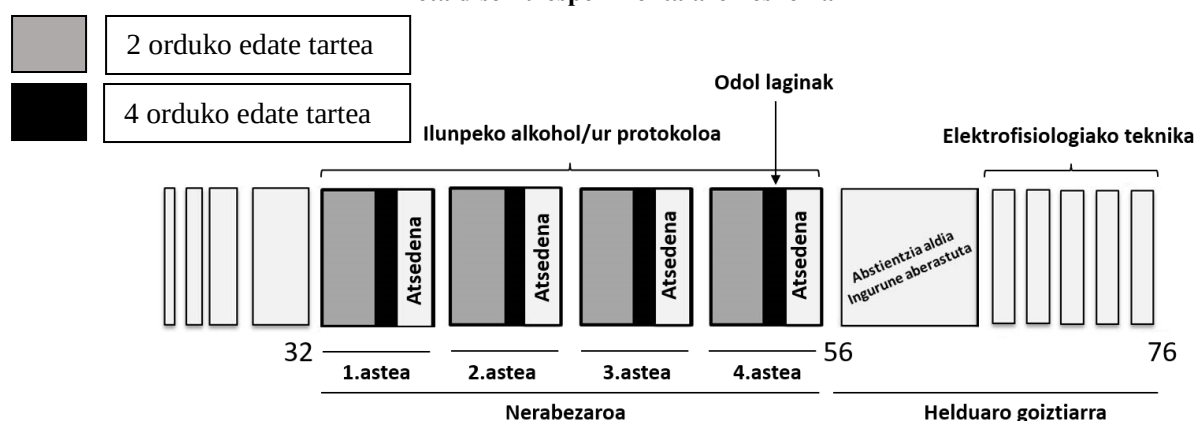
Ingurune berastuak eskaintzen duen berritasunak, ariketa fisikoak eta gizarte-elkarrekintzak, garuneko sari-zirkuituak behin eta berriz aktibatzea eramaten du, drogen mendekotasunean hain bereizgarria den substantzia psikoestimulatzaileen autokudeaketa konpulsiboa murriztuz. Era berean, arratoietan aurkeztu den drogekiko kalteberatasuna ere gutxiagotu egiten dela egiaztatu da (Green et al., 2002). Prozesu hauen guztien egiaztapenaren ondorioz, aberastutako ingurugiroak tresna preziazatutako bilakatu dira drogen mendekotasunari aurre egiteko. Izan ere, paradigma esperimental honek nerabezaroko gehiegizko alkohol kontsumoak eragindako desoreka, koordinazio motorren kaltea eta narriadura kognitiboa berreskuratzen ditu (Rico-Barrio et al., 2018).

Ikerlan honen helburua, nerabezaroan gehiegizko alkohol-kontsumoaren ondorioz sorturiko iraupen luzeko plastikotasun asalduren aurrean ingurune aberastuak duen potentzialtasun terapeutikoa aztertzea da: baita onura posible horien azpian dauden mekanismo zelularren ikerketa ere. Lortutako emaitzen ekarpenei esker, paradigma honek helduaroan eduki dezakeen ahalmen terapeutikoa aztertzei aukera emango digu.

3. Ikerketaren muina

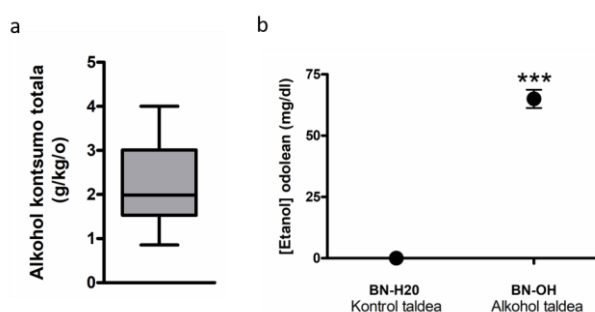
Azterlan honen helburua gauzatzeko, lau astetan zehar (jaio osteko 32. egunetik 56. egunera arte), nerabezaroko C57BL6J ar saguei (5 animali talde esperimental bakoitzeko), alkohol/ur edateko ilunpeko protokolo batean barneratu zitzaizkien. Asteko lehenengo hiru egunetan, animaliak bi orduz segidan egon ziren alkohola % 20an (alkohol taldea) edota ura (kontrol taldea) era aske batean edaten. Laugarren egunean, edateko denbora-tartea lau orduz luzatu zen eta asteko gainontzeko hiru egunak atsedena gisa hartu ziren (ura eta janaria *ad libitum*) (2. irudia) (Rhodes et al., 2007).

2. irudia. C57BL6J ar saguei ezarritako alkohola edateko lau asteko ilunpeko alkohol/ur protokoloa eta diseinu esperimentalaren eskema



Alkohol eredu honen egiazkotasuna baieztatzeko, prozeduran zehar edandako batz besteko alkohol kontsumo totala [(g/kg/o)] neurtu zen (3a. irudia), 2.10 g/kg/o-ko balioa lortuz. Horrez gain, odol laginak buztaneko alboko zainetik hartu ziren, ilunpeko alkohol/ur esposizio prozeduraren 4 orduko azkenengo saioa bukatu eta 30 minututara. Horrela, kit komertzial baten bitartez odoleko alkohol kontzentrazioa aztertu zen (3b. irudia). Alkohol taldeko saguek (BN-OH) kontrolekin alderatuz (BN-H2O) odoleko etanol kontzentrazio esanguratsuak aurkeztu zituzten, eredu honen baliotasuna bermatuz (2b irudia). Ilunpeko alkohol/ur esposizioa amaitu ostean, animaliak abstinentsia denboraldian barneratu ziren (jaio osteko 56. egunetik 76. egunera arte) helduaro goiztiarrera arte, alegia. Bi asteko abstinentsia aldiaz baliatuz, animaliak ingurune aberastuko karioletan barruratu ziren. Beraz, ikerketa honi hasiera emateko lau talde esperimental osatu ziren: Baldintza normaletan hazitako kontrol taldea (BN-H2O; n=5), baldintza normaletan hazitako alkohol taldea (BN-OH; n=5), ingurune aberastuko kontrol taldea (IA-H2O; n=5) eta ingurune aberastuko alkohol taldea (IA-OH; n=5).

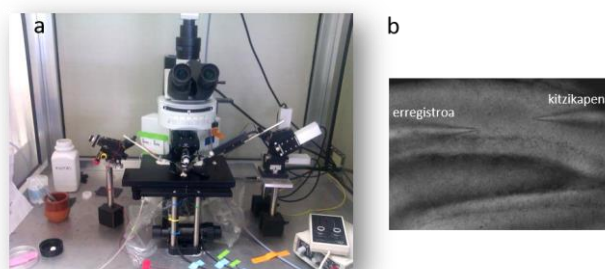
3. irudia. C57BL6J ar saguek lau astetan zehar edandako a) batz besteko alkohol kontsumo totalaren maila tratamenduan zehar eta b) odoleko etanol kontzentrazioaren neurketa tratamenduaren azkenengo egunean (p=0.000)**



3.1. Teknika elektrofisiologikoak

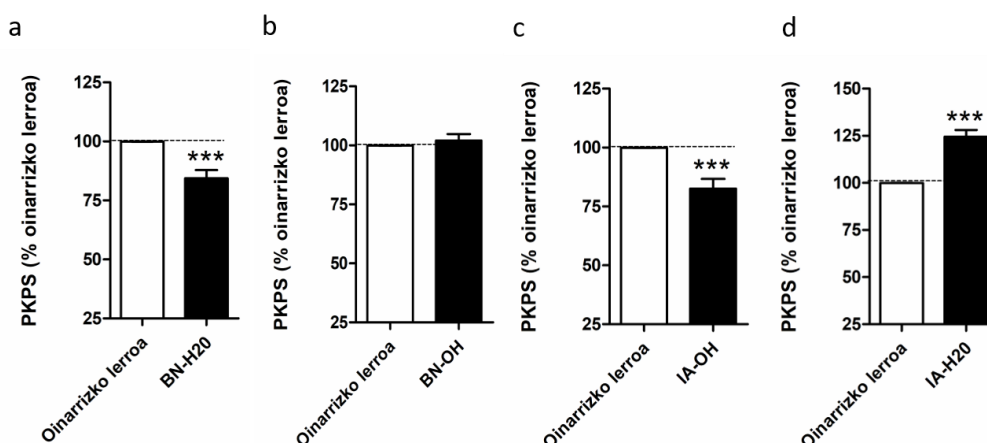
C57BL6J sagu helduak, abstinentsia aldia eta gero, elektrofisiologiako tekniken bitartez (4a. irudia), talde esperimental ezberdinen (BN-H2O/BN-OH/IA-OH/IA-H2O) hipokanpoko iraupen luzeko plastikotasunaren ikerketa zertu zen; baita behatutako plastikotasun mota bakoitzaren azpian ezkutatzen ziren mekanismo zelularren azterketa ere. Elektrodo kitzikatzaila erdialdeko bide zulatzailearen zuntzetan kokatu zen eta erregistroko elektrodoa, berriz, hortz bihurguneko geruza molekularren barneko herenean (4b. irudia). Esperimentu hauetan, iraupen luzeko depresioaren (ILD) plastikotasun motaren azterketa sakona egin zen. Ikerlanean erabilitako maiztasun baxuko kitzikapenaren protokoloa (10 minutu 10 Hz-tara) CB₁ hartzaile kannabinoidearen mendeko iraupen luzeko transmisio sinaptiko kitzikatzailaren depresio (CB₁-ELD) motako plastikotasun sinaptikoa eragiteko gai zela frogatu zen aldezturik gure laborategian (Pueente et al., 2011).

4. irudia. a) Elektrofisiologiako aparatua eta b) elektrodo kitzikatzailaren eta erregistro elektrodoaren kokapena hipokanpoan.



BN-OH taldeko animalia alkoholikoek, kontrolekin parekatuz (BN-H2O) CB₁ hartzailearen bitarteko iraupen luzeko plastikotasunaren galera esanguratsua adierazi zuten; kontroletan maiztasun baxuko kitzikapenaren protokoloarekin lortutako ILDk deuseztatuz (5.a,b irudia, Peñasco et al., argitaratzeko zain). Harrigarriro, animalia alkoholiko hauek aberastutako katioletan sartzean (IA-OH), kontrol taldeko bezalako ILDa erakutsi zituzten (5.c irudia). Bestalde, IA-H2O taldeko animaliek beste motako plastikotasun mota bat adierazi zuten, iraupen luzeko indartzea (ILI) deritzon plastikotasuna, hain zuzen ere. BN-H2O taldean behatutako ILDa CB₁, mGluR1, mGluR5 hartzaileen bitartez eta 2-AG endokannabinoiden bidez ematen dela egiaztatu zen (Peñasco et al., argitaratzeko zain)

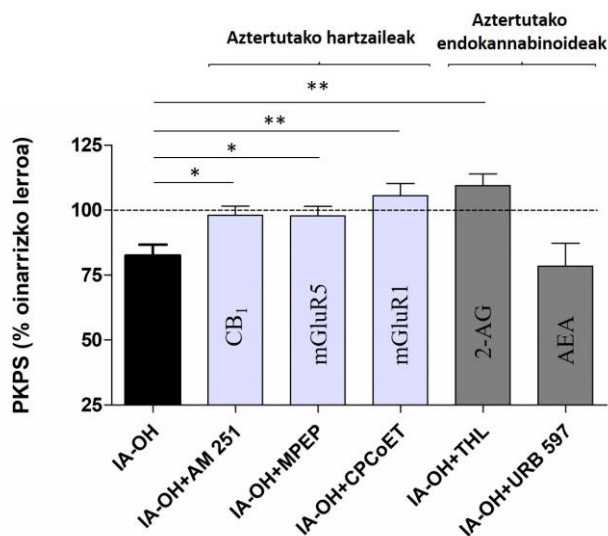
5. irudia. a) BN-H₂O, b) BN-OH, c) IA-OH eta d) IA-H₂O taldeetako iraupen luzeko plastikotasunaren azterketa. Potentzial kitzikatzailer postsinaptikoa (PKPS). ***p=0.000. Balioak t t-testaren bidez tartez analizatu dira talde esperimental bakoitza bere oinarritzko lerroarekin konparatuz.



3.2. SKEren inplikazioa IA-OH taldean

IA-OH taldeak plastikotasunean eragiten zituen onurak aztertu ondoren, farmako antagonista ezberdinen erabilpenaz, SKE osagaien inplikazioa aztertu zen; plastikotasun mota honen azpian aurkitzen ziren mekanismo zelularren bilaketari hasiera emanez. Zehazki CB₁ hartzailearen, 2-AGren eta AEA-ren endokannabinoiden eta mGluR5 eta mGluR1 hartzaile metabotropikoen inplikazioa ikertu zen. Emaitzek nola CB₁, mGluR5, mGluR1 hartzaileen hala 2-AG endokannabinoiden inplikazio zuzena adierazi zuten behatutako iraupen luzeko depresioetan. Izan ere, hartzaile hauen antagonistek eta 2-AG entzimaren inhibizioak jatorrizko animalian behatutako iraupen luzeko depresioa desagerrarazten du, beraien inplikazioa iradokiz. Anandamidak, berriz, ez zuen inongo eraginik aurkeztu plastikotasun mota hau aztertzerakoan, URB 597 farmakoa erabiltzean jatorrizko animalian behatutako ILD mantenduz (6. irudia).

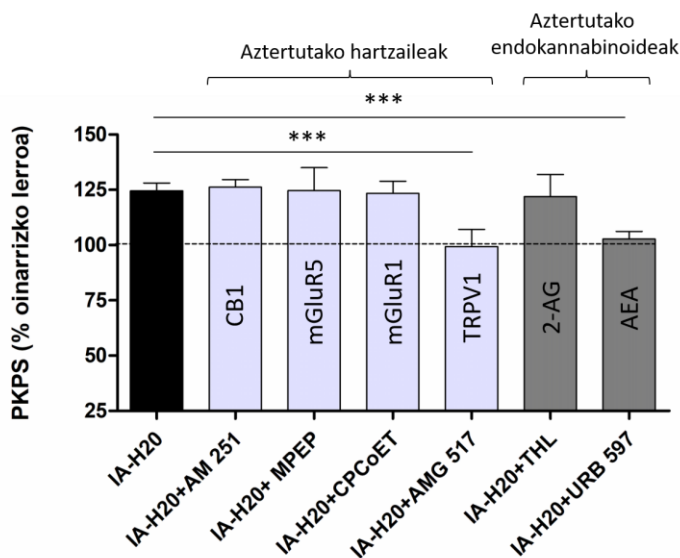
6. irudia. IA-OH taldeko plastikotasunaren azpian dauden hartzaile ezberdinen inplikazioa (AM 251: CB₁ hartzailearen antagonista; MPEP: mGluR5 hartzailearen antagonista; CPCoET: mGluR1 hartzailearen antagonista) eta d) IA-OH taldeko plastikotasunaren azpian dauden endokannabinoiden ezberdinen inplikazioa (THL: DAGL-ren inhibitzailea; URB 597: FAAH-ren inhibitzailea)



3.3. SKeren inplikazioa IA-H20 taldean

Bestalde, IA-H20 taldean lortutako iraupen luzeko indartzearen azpiko mekanismo zelularrak aztertu nahian, beste behin, farmako antagonista ezberdinen erabilpenaz, SKE osagaien inplikazioa ikertu zen plastikotasun mota honetan (7. irudia). Emaitzek TRPV1 hartzailearen eta AEA endokannabinoiden inplikazioa adierazi zuten behatutako iraupen luzeko indartzean. CB₁, mGluR1, mGluR5 hartzaileek eta 2-AG endokannabinoidak, berriz, ez zuten inongo eraginik adierazi ILIari (7. irudia)

7. irudia. IA-H20 taldeko plastikotasunaren azpian dauden hartzaile ezberdinen inplikazioa (AM 251: CB₁ hartzailearen antagonista; MPEP : mGluR5 hartzailearen antagonista; CPCoET: mGluR1 hartzailearen antagonista; AMG 517: TRPV1 hartzailearen antagonista) eta IA-H20 taldeko plastikotasunaren azpian dauden endokannabinoiden ezberdinen inplikazioa (THL: DAGL-ren inhibitzailea; URB 597: FAAH-ren inhibitzailea)



4. Ondorioak

Emaitza hauei esker bi ondorio nagusi atera daitezke. Batetik, ingurune aberastuko baldintza berezia nerabegaroko gehiegizko alkohol kontsumoak plastikotasunean eragiten dituen kalteak berreskuratze-ko gai dela; bere potentzialtasun terapeutikoa bermatuz. Bestetik, garuneko egoera fisiologikoaren arabera, ingurune aberastuaren paradigmak, plastikotasun mota ezberdinetarako bidea emango duela (ILD edo ILI).

Aztertutako plastikotasun mota bietan; bai ILDan baita ILIn ere, SKeren parte-hartzea agerikoa da. Lortutako emaitzen arabera, ingurune aberastuaren paradigmak eragiten dituen onurak, garunaren egoera fisiologikoaren arabera, mekanismo zelular ezberdinen bitartez bideratuko dira.

5. Etorkizunerako planteatzeko den norabidea

Nerabezaroa, funtzio kognitiboak, emozionalak eta sozialak garatzen diren denboraldi erabakigarri bat izateaz gain, alkoholaren kontsumoaren hasierarekin kointziditzen duen aldia da. Garai honetan gazteek ez dituzte alkoholak eragiten dituen iraupen luzeko (helduaroko) kalteak aintzat hartzen eta droga hau, adingabeko gazteen artean, arrisku gutxien eragiten duen substantzia psikoaktibo gisa kontsideratuta dago (Osasun Saila 2016). Munduko osasun erakundearen arabera, alkoholaren kontsumorik handiena mundu garatuan ematen da eta 200 gaixotasun eta lesio baino gehiagoren eragile nagusia bilakatu da. Horrez gain, 20 eta 39 urte bitarteko pertsonetan gertatzen diren heriotzen % 25aren erantzule zuzen gisa kontsideratuta dago (Munduko Osasun Erakundea, 2015). Adingabeko gazteen gehiegizko alkohol kontsumoaren intzidentzia eta prebalentzia-tasaren ohartarazpenak, hortaz, terapia eraginkor berrien ikerketak burutzeko eta jorratzeko egitasmoen beharra erakusten du.

Testuinguru horretan, ingurune aberastua, arestian gure laborategian egindako ikerketetan terapia ez farmakologiko fidagarri bat bezala aurkeztzen da, botiloak eragindako kalteak leheneratuz. Alde batetik, gehiegizko alkohol kontsumo horrek epe luzera sortutako narriadura kognitiboa berreskuratzen du; baita kaltetutako koordinazio motorra eta oreka ere. Bestalde, ikerlan honetan behatutako emaitzek ere ildo beretik doaz, alkohol-kontsumoaren ondorioz ager daitezkeen iraupen luzeko plastikotasun kalteak berrezarritik. Hori dela eta, etorkizunari begira, baldintza berezi honen potentzialtasun terapeutikoa argi zantzu bat bezala igarri daiteke, prebentzio edo tratamendu bezala, droga honen mende bizi diren edo bizi izan diren pertsonen bizi-kalitatea hobetzeko.

6. Erreferentziak

- Bennett, E.L., Rosenzweig, M.R. eta Diamond, M.C. (1969), Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights, *Science*, 163, 825-826.
- Birch, A.M., McGarry, N.B. eta Kelly, A.M. (2013), Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner, *Hippocampus*, 23, 437-450.
- Chen, X., Zhang, X., Xue, L., Hao, C., Liao, W. eta Wan, Q. (2017), Treatment with Enriched Environment Reduces Neuronal Apoptosis in the Periinfarct Cortex after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*, 41, 1445-1456.
- Colombo, G., Serra, S., Brunetti, G., Atzori, G., Pani, M., Vacca, G., Addolorato, G., Froestl, W., Carai, M.A. eta Gessa, G.L. (2002), The GABAB receptor agonists baclofen and CGP 44532 prevent acquisition of alcohol drinking behaviour in alcohol-preferring rats, *Alcohol*, 37:499-503.
- Crews, F.T., Vetreno, R.P., Broadwater, M.A. eta Robinson, D.L. (2016), Adolescent alcohol exposure persistently impacts adult neurobiology and behavior, *Pharmacol Rev*, 68:1074-1109.

- Diamond, M.C., Ingham, C.A., Johnson, R.E., Bennett, E.L. eta Rosenzweig, M.R. (1976), Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus, *J Neurobiol*, 7,75-85.
- Economidou, D., Mattioli, L., Cifani, C., Perfumi, M., Massi, M., Cuomo, V., Trabace, L. eta Ciccocioppo, R. (2006), Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-141716A on ethanol self-administration and ethanol-seeking behaviour in rats, *Psychopharmacology (Berl)*, 183:394–403.
- Green, T.A., Gehrke, B.J. eta Bardo, M.T. (2002), Environmental enrichment decreases intravenous amphetamine self-administration in rats: dose-response functions for fixed- and progressive-ratio schedules, *Psychopharmacology*, 162, 373-378.
- He, C., Tsipis, C.P., LaManna, J.C. eta Xu, K. (2017), Environmental Enrichment Induces Increased Cerebral Capillary Density and Improved Cognitive Function in Mice, *Adv Exp Med Biol*, 977, 175-181.
- Iannotti, F.A., Di Marzo, V. eta Petrosino, S. (2016), Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: targets, metabolism and role in neurological disorders, *Progress in lipid research*, 62, 107-128.
- Ickes, B.R., Pham, T.M., Sanders, L.A., Albeck, D.S., Mohammed, A.H. eta Granholm, A.C. (2000), Long term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain, *Exp Neurol*, 164, 45-52.
- Keshavan, M.S., Giedd, J., Lau, J.Y., Lewis, D.A. eta Paus, T. (2014), Changes in the adolescent brain and the pathophysiology of psychotic disorders, *Lancet Psychiatry*, 1, 549-558.
- Kyzar, E.J., Zhang, H., Sakharkar, A.J. eta Pandey, S.C. (2016), Adolescent alcohol exposure alters lysine demethylase I (LSD I) expression and histone methylation in the amygdala during adulthood, *Addiction Biology*, 1-14.
- Pava, M.J. eta Woodward, J.J. (2012), A review of the interactions between alcohol and the endocannabinoid system: implications for alcohol dependence and future directions for research. *Alcohol*, 46:185–204.
- Peñasco, S., Puente, N., Ramos, A., Royo, R., Gutiérrez, A., Bonilla, I., Reguero, L., Canduela, M.J., Mendizabal-Zubiaga, J., Rodríguez De Fonseca, F., Suárez, J., Elezgarai, I. eta Grandes, P. (2015), Alteration of the Endocannabinoid-Dependent Synaptic Plasticity in Adult Brain After Ethanol Exposure of Mice During Adolescence, *25th Annual Symposium on the Cannabinoids*, p. 17. International Cannabinoid Research Society: Research Triangle Park, NC, USA.
- Puente, N., Cui, Y., Lassalle, O., Lafourcade, M., Georges, F., Venance, L., Grandes, P. eta Manzoni, O.J. (2011), Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala, *Nature Neuroscience*, 14, 1542,1547.
- Rhodes, J.S., Ford, M.M., Yu, C.H., Brown, L.L., Finn, D.A., Garland, T. Jr, eta Crabbe, J.C. (2007), Mouse inbred strain differences in ethanol drinking to intoxication, *Genes Brain Behav*, 6, 1–18.
- Rico-Barrio, I., Peñasco, S., Puente, N., Ramos, A., Reguero, L., Giordano, M.E., Buceta, I., Terradillos, I., Mendizabal-Zubiaga, J., Gerrikagoitia, I., Elezgarai, I. eta Grandes, P. (2018), Cognitive and neurobehavioral benefits of an enriched environment on young adult mice after chronic ethanol consumption during adolescence, *Addiction biology*, 1-12.
- Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., Hebert, M. eta Morimoto, H. (1978), Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments, *Brain research*, 153, 563-576.
- Yau, S.Y., Gil-Mohapel, J., Christie, B.R. eta So, K.F. (2014), Physical exercise-induced adult neurogenesis: a good strategy to prevent cognitive decline in neurodegenerative diseases?, *Biomed Res Int*, 2014:403120.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerlan honek Eusko Jaurlaritzako (IT764-13) eta SAF2015-65034-R (MINECO/FEDER) diru laguntzen babesa jaso du.

Eritasun zeliakoarekin asoziatutako rs6822844 polimorfismoaren ikerketa funtzionala heste-zeluletan

Sebastian-delaCruz, Maialen¹; Olazagoitia-Garmendia, Ane¹; Romero-Garmendia, Irati¹;
Irastorza, Iñaki²; Castellanos-Rubio, Ainara^{1,3*}; Bilbao, Jose Ramon^{1*}

¹*Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, BioCruces-Bizkaia Osasun
Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria*

²*Haur Gastroenterologia, Gurutzetako Unibertsitate Ospitalea, BioCruces-Bizkaia Osasun
Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria*

³*IKERBASQUE, Zientziarako Euskal Fundazioa, Bilbo, Euskal Herria
maialensebastian@gmail.com*

Laburpena

Eritasun zeliakoa (EZ), predisposizio genetikoak baldintzatutako pertsonetan glutenaren aurkako erantzun desorekatuak eragiten duen gaixotasun immunitarioa da. HLA eremutik kanpo, rs6822844 polimorfismoak aurkeztu zuen EZ garatzeko arriskurako asoziazio maila altuena lehen genoma osoko asoziazio ikerketan (ingelesez GWAS). Polimorfismoa *IL2* eta *IL21* geneen artean dago, eta horregatik horiek izan ziren eremu horretan proposatutako gene erantzuleak. Lan honen helburua, eremu hori aztertzea da. Horretarako, heste-zelula eta monozitoen proliferazioa eta *IL2* eta *IL21* geneen adierazpena aztertzeaz gain, *FGF2* gene erantzule berriaren adierazpena ere ikertu da. Lortutako emaitzek, eremu hau EZren garapenean garrantzitsua dela baieztatzen dute, gaixotasunaren zenbait ezaugarri desagertzen baita eremuan aldaketak eragitean.

Hitz gakoak: Eritasun zeliakoa, rs6822844, *IL2*, *IL21*, *FGF2*

Abstract

Celiac disease (CeD) is an immune disorder derived from the dysregulated reaction to gluten in genetically susceptible individuals. The polymorphism rs6822844 showed the strongest association with risk to CeD in the first GWAS outside the HLA region. It is located between the IL2 and IL21 genes, so they were considered candidate genes in that region. The aim of this work is to analyze this region in intestinal cells and monocytes, through proliferation and expression studies of IL2 and IL21 genes, and a new candidate gene proposed in this work, FGF2. The results obtained confirm that this region is important for the development of CeD, as certain characteristics of the disease disappear, when the region is altered.

Keywords: Celiac disease, rs6822844, IL2, IL21, FGF2

1. Sarrera eta motibazioa

Eritasun zeliakoa (EZ) predisposizio genetikoa duten pertsonengan gertatzen den glutenaren aurkako erantzun desorekatuaren ondorioz garatzen den gaixotasun immunitario kronikoa da. Beraz, faktore genetikoek zein ingurumenekoez, batez ere glutenak, parte hartzen dute gaixotasunean. Ezaguna den arrisku genetiko nagusia HLA-DQ2 edota HLA-DQ8 aldaerek ekartzen dute, sistema immunitarioko zelulei gluten aurkezteko duten ahalmenagatik. Dena den, aldaera horiek ez dira nahiko eritasun zeliakoa garatzeko; izan ere, ohikoak dira populazioan, eta adibidez, pertsona ez-zeliakoen %30 inguruak HLA-DQ2 eramaten du (Megiorni eta Pizzuti, 2012).

Azken urteotan, beste arrisku faktoreak ezagutu nahian, genoma osoko (GWAS) eta Immunochip plataformako asoziazio azterketak burutu dira (van Heel et al., 2007; Dubois et al., 2010; Trynka et al., 2011; Garcia-Etxebarria et al., 2016) eta eritasun zeliakoarekin asoziatuta dauden HLA lokusetik kanpoko eremu berriak aurkitu dira. Eremuok ematen duten arriskua erantzun immunitarioan parte hartzen duten bertako geneei egotzi zaie, baina oraindik ez da ezaguna asoziatutako eremu gehien funtzioa.

HLA eremuaz aparte, rs6822844 polimorfismoak EZ garatzeko arrisku altuena aurkeztu zuen eritasun zeliakoan burutu zen lehen GWASean. SNP (ingelesezko *Single Nucleotide Polymorphism* inisialatik) hau *IL2* eta *IL21* geneen artean dago, laugarren kromosoman. Bi gene horiek IL-2 eta IL-21 zitokinak kodetzen dituzte, hurrenez hurren, eta biek funtzio immunitarioan parte hartzen dutela kontuan hartuta, gene erantzuletzat proposatu ziren (van Heel et al., 2007).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Eritasun zeliakoa gaixotasun genetiko konplexua da, non faktore genetiko ugariak parte hartzen duten. Azken urteetan, Genetika eta Biologia Molekularreko tekniken hobekuntzari esker, asko aurreratu da faktore genetiko horien ezagutzan, eta gaur egun, EZren erantzule izan daitezkeen eremu genetiko berriak proposatu dira. Dena dela, eremu horietako askoren funtzioa ez da ikertu, eta hauen inplikazioa EZan ez dago frogatuta.

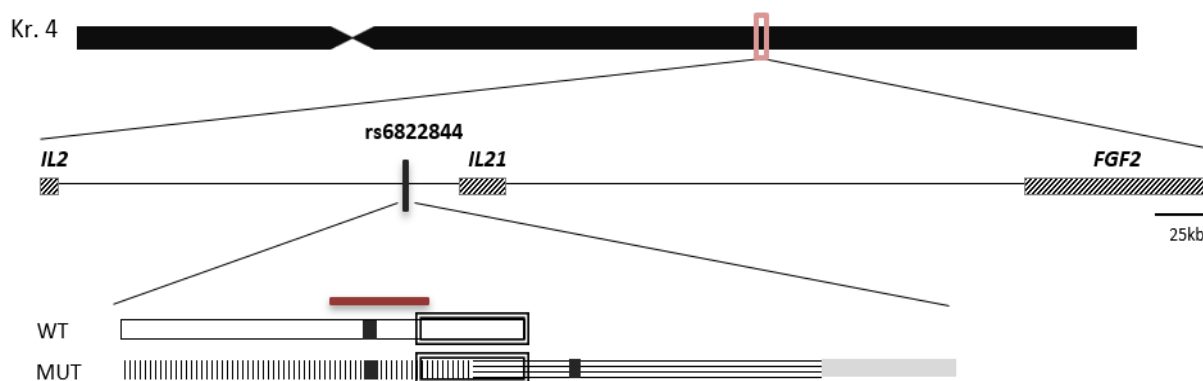
Hori kontuan izanik, rs6822844 polimorfismoaren eremuaren funtzioa aztertu nahi izan dugu. Horretarako hiru azpi helburu planteatu ditugu:

- 1) Polimorfismoaren efektua aztertzea heste-zelula epitelialetan, lehen GWASean proposatutako *IL2* eta *IL21* gene erantzuleen adierazpena neurtuta.
- 2) Gene bi horietaz aparte gene erantzule gehiago bilatzea, SNParen eremuarekin elkarrekintzak aztertuz eta haien efektuak ebaluatuz.
- 3) SNParen eremu genomikoa editatuta duten heste-zelulek baldintzatutako medioan hazteak sistema immunitarioko zeluletan duen eragina aztertzea.

3. Ikerketaren muina

rs6822844 polimorfismoaren eta bere eremu genomikoaren azterketa egiteko, HCT116 heste-zelula epitelialen genoma editatu da CRISPR-Cas9 teknikaren bidez. Edizioak eragindako mutazioak SNPa bikoiztea eragin du editatutako zeluletan (1. Irudia).

1. irudia. HCT116 zeluletan editatutako rs6822844 polimorfismoaren inguruko eremu genomikoaren irudi eskematikoa. Sekuentzia mutata (MUT) hiru zatiz osatuta dago: batetik, zelula basatien (WT) sekuentziaren berdina den zatia (lerro bertikalak); bestetik, WT sekuentziaren alderantzizko bikoizketa (lerro horizontalak); eta azkenik, WT sekuentziaren antzik ez duen zatia (grisez). Ertz bikoitza duen laukiak sekuentzia palindromikoa irudikatzen du eta laukitxo beltzek rs6822844 polimorfismoa. Marra gorria CRISPR-Cas9 teknikan erabilitako RNA-gida da.



3.1. Adierazpen eta proliferazio azterketak HCT116 heste-zeluletan

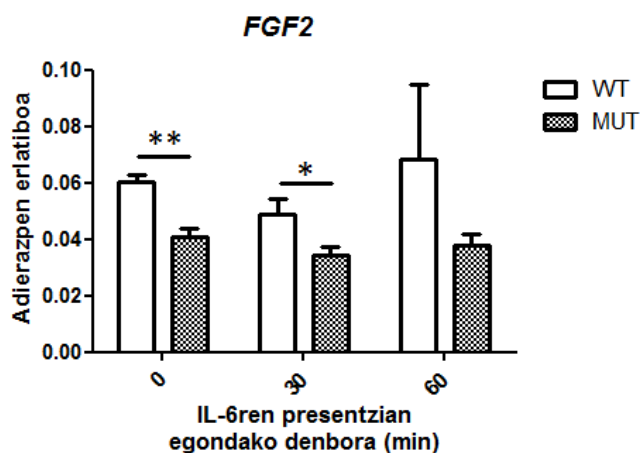
Lehen GWASean *IL2* eta *IL21* proposatu ziren gene erantzule gisa. Hori dela eta, CRISPR-Cas9 bidezko edizioak gene horien adierazpenean izan zezakeen eragina aztertu da HCT116 heste-zeluletan.

Gene horiek erantzun immunitarioan parte hartzen dutela jakinik, eta egoera normalean adierazten ez direla behatu eta gero, zelulak IL-6 zitokina proinflamatorioarekin kitzikatu dira, adierazpena emendatu asmoz. Emaitez erakutsi dutenez, *IL2* eta *IL21* geneak ez dira HCT116 heste-zeluletan adierazten, ez egoera normalean ezta IL-6 zitokina proinflamatorioaren presentzian ere.

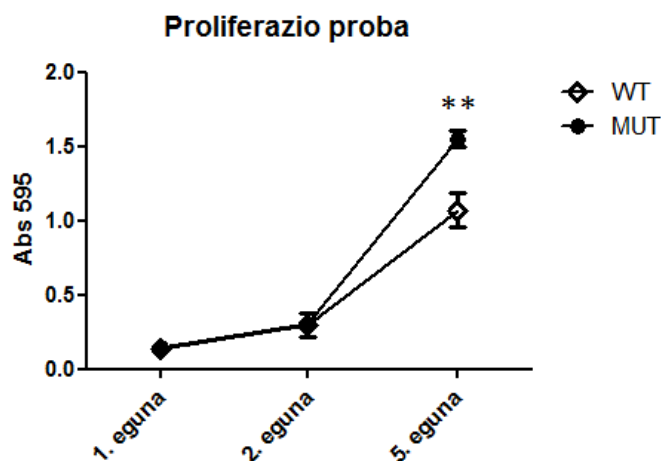
Proposatutako geneak adierazten ez direla ikusirik, gene erantzule posible berriak bilatu dira. Horretarako SNParen eremuarekin elkarrekintzak dituzten geneak bilatu dira HiC bilatzailearen *online virtual 4C* lanabesa erabiliz (Lieberman-Aiden et al., 2009). Lanabes honek, DNAREN hiru dimentsioko egitura kontuan hartzen du geneen edota genomaren eremu desberdinen arteko elkarrekintzak iradokitzeke. Kasu honetan, *FGF2*, *SPATA5* eta *KIA1109* geneek hiru dimentsioko elkarrekintza aurkezten dute SNParen eremuarekin. Horien artean lehenak erantzun immunitarioarekin erlazioa du, fibroblastoen hazkuntza sustatzen baitu. *FGF2*ren adierazpena aztertu da eta zelula editatuetan azpiadierazita dagoela behatu da (2. Irudia). Gainera, adierazpena berdina mantentzen da IL-6ren presentzian ere. *FGF2* geneak FGF-2 hazkuntza faktorea kodetzen du, eta horrek zelulen hazkuntza eta proliferazioa sustatzen duenez, heste-zelulen proliferazio analisia burutu da. Zelula editatuek (MUT) proliferazio abiadura handiagoa dute (3. Irudia).

2. irudia. *FGF2* genearen adierazpen erlatiboa *HPRT* etxezaintza-genearekiko (ingelesez *housekeeping genea*). Emaitez egoera normalean (0), eta IL-6 zitokina proinflamatorioarekin kitzikatu eta 30 eta 60 minutura.

WT: editatu gabeko HCT116 zelulak, MUT: eremu genomikoa CRISPR-Cas9 bidez editatuta duten HCT116 zelulak.



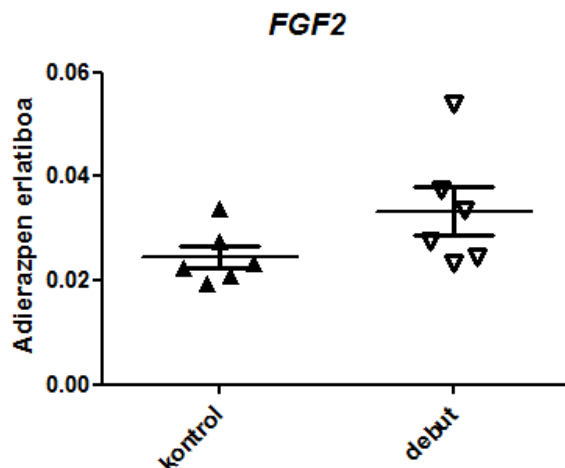
3. irudia. HCT116 zelulen proliferazio azterketa. 200.000 zeluletik abiatuta eta bat, bi eta bost egunetara egin dira neurketak. WT: editatu gabeko HCT116 zelulak, MUT: eremu genomikoa CRISPR-Cas9 bidez editatuta duten HCT116 zelulak.



3.2. Adierazpen azterketak biopsietan

FGF2 genearen adierazpen aldaketak ikusita, pertsona zeliakoengan ere aldaketarik dagoen aztertu da. Horretarako sei paziente zeliako (debut) eta beste sei pertsona ez-zeliakoren (kontrol) duodenoko biopsietatik erauzitako RNA erabili da, eta *FGF2*ren adierazpena zeliakoetan emendatuta dagoela behatu da (4. Irudia).

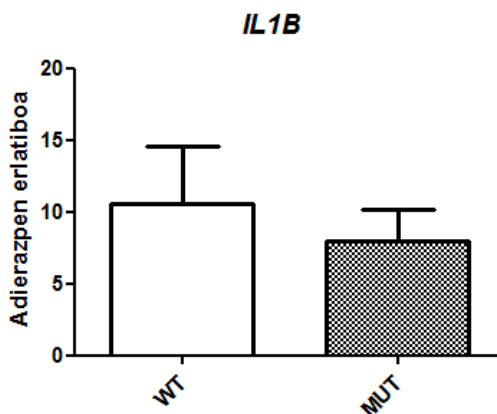
4. irudia. *FGF2*ren adierazpena biopsietan, *RPLPO* etxezaintza-genearekiko.



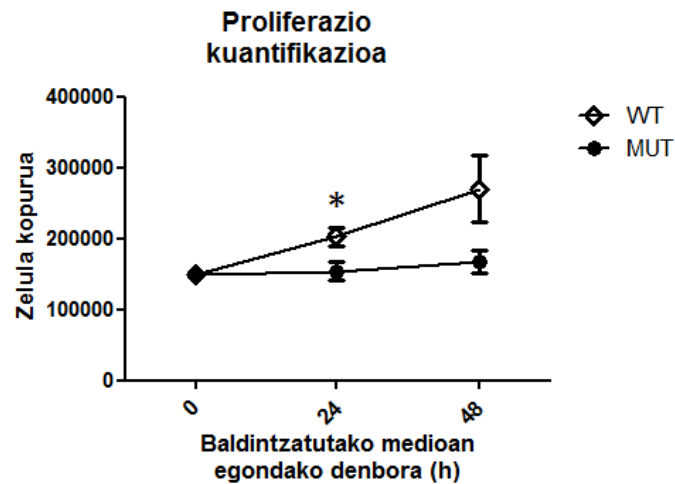
3.3. Aktibazio eta proliferazio azterketak U937 zelula immunitarioetan

HCT116 zeluletan sortutako mutazioak inguruko zelula immunitarioan izan dezakeen efektua aztertzeko U937 zelula monozitikoak heste-zelulek baldintzatutako kultura-medioan hazi dira, eta haien aktibazio eta proliferazioa aztertu dira. Baldintzatutako medioa, medio freskoarekin nahastu da 1:1 proportzioan, elikagai faltarik ez izateko. Aktibazioa *IL1B* genearen adierazpenaren bitartez neurtu da, interleukina horren adierazpena emendatu egiten baita monozitoak aktibatzean (Petes C et al, 2017). *IL1B* zertxobait azpiadierazita dago zelula editatuek (MUT) baldintzatutako medioan hazitako monozitoetan (5. Irudia). Proliferazioari dagokionez, zelula editatuek (MUT) baldintzatutako medioan hazitako monozitoek, hazkunde abiadura baxuagoa aurkeztu dute (6. Irudia).

5. irudia. *IL1B*ren adierazpen erlatiboa *RPLPO* etxezaintza-genearekiko. *IL1B* aktibazioaren adierazle modura erabili da. WT: editatu gabeko HCT116 zelulek baldintzatutako kultura-medioan hazitako monozitoak, MUT: eremu genomikoa CRISPR-Cas9 bidez editatuta duten HCT116 zelulek baldintzatutako kultura-medioan hazitako monozitoak.



6. irudia. U937 zelulen proliferazio azterketa. 0 puntua medio baldintzatua gehitu aurreko puntua da, 150.000 zeluletatik abiatuta. Beste bi puntuak, baldintzatutako medioan 24 eta 48h eta gero egindako neurketak dira. WT: editatu gabeko HCT116 zelulek baldintzatutako kultura-medioan hazitako monozitoak, MUT: eremu genomikoa CRISPR-Cas9 bidez editatuta duten HCT116 zelulek baldintzatutako kultura-medioan hazitako monozitoak.



Emaitzen arabera, editatu gabeko zelulek baldintzatutako medioan haztean, monozitoak aktibatu eta azkarrago proliferatzen dira. Dirudienez, sortutako mutazioak U937 zelula monozitikoaren aktibazio eta proliferazioan ondorioak dituen aldaketaren bat ekarri du, rs6822844 SNParen eremuaren edizioak, inguruko zeluletan ere eragina duela erakutsiz.

4. Ondorioak

Laburbilduta, EZren arriskuarekin asoziatutako rs6822844 polimorfismoaren eremua editatzeak heste-zeluletan eta inguruko zelula immunitarioetan eragina duela behatu da lan honetan.

Batetik, HCT116 zeluletan, proposatutako gene erantzuleen adierazpen aldaketarik ikusi ez dugun arren, *FGF2* gene erantzule berria proposatu dugu, eta gene hori azpiadierazita dago rs6822844 SNParen eremu genomikoa editatuta duten zeluletan. Aldiz, *FGF2* gainadierazita dago paziente zeliakoetan.

Bestetik, editatutako zelulek baldintzatutako kultura-medioan inkubatutako monozitoek aktibazio eta proliferazio apalagoa izateak, eremu genomikoaren edizioak hantura egoeran eragina izan dezakeela iradoki du. Izan ere, hantura egoeretan monozito eta makrofagoak aktibatuta egon ohi dira eta proliferazio maila altuagoa dute (Abella V et al., 2017).

Beraz, eremu genomiko horrek EZren garapenean parte hartu dezakeen zantzuak ikusi ditugu, hori eraldatzean gaixotasunaren hainbat berezko ezaugarri desagerrarazten direlarik.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan HCT116 zeluletan burutu da rs6822844 polimorfismoaren eremuaren edizioa. Baina hasieran proposatutako *IL2* eta *IL21* geneak zelula mota horretan adierazten ez direla kontuan hartuta, etorkizunean SNParen eremua gene horiek adierazten diren sistema immunitarioko zeluletan editatzeko asmoa dugu, T linfzitoetatik eratorritako Jurkat zelulak kasu.

Horrez gain, SNParen ondoan DNAsarekiko hipersentikorra (DH) den eremu bat dago, eta eremu horiek erregulazio puntuak izan daitezkeela ezaguna da (Degner JF et al., 2012). Beraz, polimorfismoak DH eremu horretan eragina duen ikertu nahi dugu.

6. Erreferentziak

- Abella V, Scotece M, Conde J, Pino J, Gonzalez-Gay MA, Gomez-Reino JJ, Mera A, Lago F, Gomez R eta Gualillo O. (2017), Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol*, 13(2), 100-109.
- Degner JF, Pai AA, Pique-Regi R, Veyrieras JB, Gaffney DJ, Pickrell JK, De Leon S, Michelini K, Lewellen N, Stephens M, Gilad Y eta Pritchard JK. (2012), DNase I sensitivity QTLs are a major determinant of human expression variation. *Nature*, 482(7385), 390-394.
- Lieberman-Aiden E, Van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES eta Dekker J. (2009), Comprehensive mapping of longrange interactions reveals folding principles of the human genome, *Science*, 326(5950), 289-293.
- Megiorni F eta Pizzuti A. (2012), HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing, *J. Biomed Sci*, 19, 88-92.
- Petes C, Wynick C, Guzzo C, Mehta D, Logan S, Banfield BW, Basta S, Cooper A eta Gee, K. (2017), IL- 27 enhances LPS- induced IL- 1 β in human monocytes and murine macrophages, *J Leukoc Biol*, 102(1), 83-94.
- Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, Bakker SF, Bardella MT, Bhaw-Rosun L, Castillejo G, de la Concha, E. G, Coutinho de Almeida R, Dias KRM, van Diemen CC, Dubois PCA, Duerr RH, Edkins S, Franke L, Fransen K, Gutierrez J, Heap GAR, Hrdlickova B, Hunt S, Plaza-Izturieta L, Izzo V, Joosten LAB, Langford C, Mazzilli MC, Mein CA, Midah V, Mitrovic M, Mora B, Morelli M, Nutland S, Núñez C, Onengut-Gumuscu S, Pearce K, Platteel M, Polanco I, Potter S, Ribes-Koninckx C, Ricaño-Ponce I, Rich SS, Rybak A, Santiago JL, Senapati S, Sood A, Szajewska H, Troncone R, Varadé J, Wallace C, Wolters VM, Zhernakova A, CEGEC (Spanish Consortium on the Genetic of Coeliac Disease), Prevent CD Study Group, Wellcome Trust Case Control Consortium, Thelma BK, Cukrowska B, Urcelay E, Bilbao JR, Mearin ML, Barisani D, Barrett JC, Plagnol V, Deloukas P, Wijmenha C eta van Heel DA. (2011), Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease, *Nat. Genet.*, 43, 1193-201.
- van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, Wapenaar MC, Bernardo MCNM Bethel G, Holmes GKT, Feighery C, Jewell D, Kelleher D, Kumar P, Travis S, Walters JRF, Sanders DS, Howdle P, Swift J Playford RJ, McLaren WM, Mearin ML, Mulder CJ, McManus R, McGinnis R, Cardon LR, Deloukas P eta Wijmenga C. (2007): A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21, *Nat. Genet*, 39, 827-9.
- Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI eta Yang J. (2012), Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet*, 90(1), 7-24.

7. Eskerrak eta oharrak

Hemen aurkeztutakoak Ikerketa Immunologian masterreko amaierako lanaren emaitzak dira. Eskerrak eman nahi dizkiet Ainara Castellanos eta Jose Ramon Bilbaori, lana laborategian egitea onartzeagatik.

Ikerketa hau ACM-2017 ikerketa proiektuaren bidez finantzatu da.

USP9X: Angelman sindromearen tratamendurako itu berria ote?

Elu, Nagore¹; Ramirez, Juanma¹; Lectez, Benoit¹; Osinalde, Nerea² eta Mayor, Ugo^{1,3}

¹*Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea,
Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV-EHU*

²*Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Farmazia Fakultatea,
Euskal Herriko Unibetsitatea, UPV-EHU*

³*Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbo, Bizkaia
nagore.elu@ehu.eus*

Laburpena

UBE3A proteinaren gabeziak Angelman sindromea sortarazten du. Proteina honek zelulako beste proteina batzuk ubikuitinatzen ditu, beraien funtzioa erregulatuz. Hortaz, UBE3A falta denean, bere substratuak –DDI1 kasu– gutxiago ubikuitinatuko dira, ondorio larriak ekarriz. Horrez gain, deubikuitinasa deritzen proteinek substratuen ubikuitina kentzean, egoera larritzen da. Lan honetan DDI1 substratua deubikuitinatzen duen proteinetako bat –USP9X– identifikatu dugu eta diana terapeutiko gisa aurkeztu dugu, berau inhibitzeak DDI1 proteinaren ubikuitinazioa emendatu eta gaixotasunaren eredu diren eulien sintomatologia hobetzen baitu.

Hitz gakoak: Angelman sindromea, UBE3A proteina, ubikuitina, deubikuitinasa, farmakoa.

Abstract

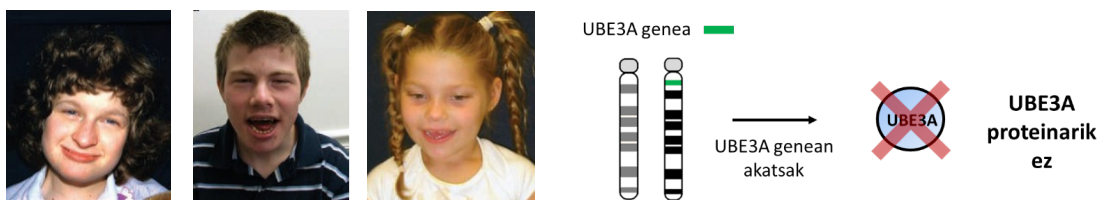
Lack of UBE3A protein causes Angelman syndrome. This protein is in charge of ubiquitinating other proteins in the cell. Therefore, when there is lack of UBE3A, its substrates – such as DDI1 – will be less ubiquitinated, negatively affecting cell equilibrium. Moreover, proteins named deubiquitinases remove ubiquitin from the substrates, making the scenario even worse. In this work we have identified one of the proteins – USP9X – that deubiquitinates DDI1 and presented it as a therapeutic target, since its inhibition enhances DDI1 ubiquitination and improves the climbing ability of Angelman syndrome model flies.

Keywords: Angelman syndrome, UBE3A protein, ubiquitin, deubiquitinase, drug.

1. Sarrera eta motibazioa

Gure genoma errezeta liburu bat bezalakoa da, eta zelula, berriz, sukaldaria, izan ere, genoman dagoen informazioa erabiltzen du bere langileak izango diren proteinak sortzeko. Genoman milaka gene edo errezeta ditugu, eta gene horietako bakoitzak proteina bat ekoizteko informazioa dauka. Proteina guztiek funtzio konkretu bat dute zelularen barruan. Hortaz, errezeta liburuko orriak falta badira –delezioak– edo testuan akatsak badaude –mutazioak–, litekeena da proteinarik ez sortzea edo sortuz gero, akastuna izatea. Edozein kasutan, proteinak ez du zelulan dagokion funtzioa burutuko, eta horrek maiz ondorio larriak eragiten ditu. Hain zuzen ere, hori da Angelman sindromea (AS) gertatzen dena. Burmuinean UBE3A deritzon genearen galeraren edo mutazioaren ondorioz, gene horrek kodetzen duen UBE3A proteina ez da sortzen edo akastuna da, eta horrek burmuineko funtzioetan asaldurak sortzen ditu (Kishino et al., 1997) (**1. irudia**). AS pairatzen duten banakoen ezaugarri bereizgarrienak adimen urritasuna, orekaren asaldura, hitz egiteko zailtasunak eta etengabeko irribarrea dira (Buiting et al., 2016).

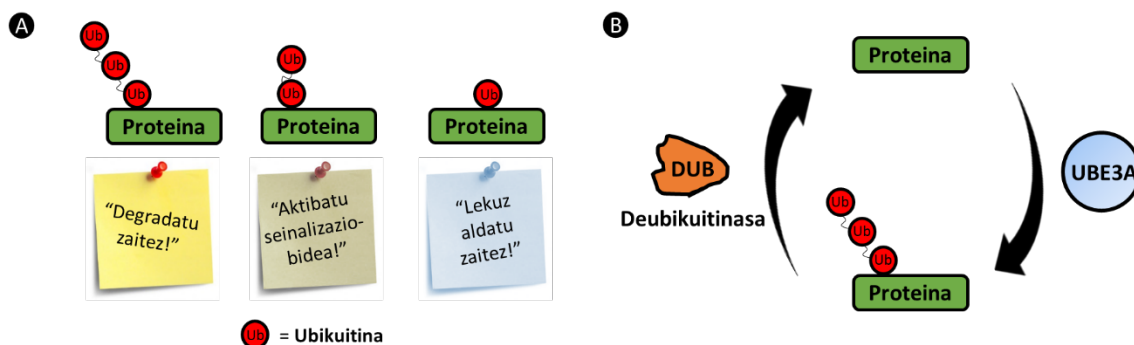
1.irudia. Angelman sindromea duten hiru pertsona, hain esanguratsua duten irribarrearekin. UBE3A genean mutazioak edo akatsak daudenean ez da UBE3A proteinarik sortzen, sindromea garatuz.



Baina, nola da posible proteina bakar baten faltak burmuinean horrelako eragin latza izatea? Galdera horri erantzuteko lehendabizi UBE3A proteinak zer egiten duen argitu behar da. Aurrez aipatu bezala, proteinak zelulako langileak dira, eta bakoitzak funtzio konkretu bat burutzen du. UBE3A proteina zelulako agintarietako bat da, izan ere beste proteina batzuei zein funtzio bete behar duten adierazteaz arduratzen da. Eta nola egiten du hori? Bada, proteinei *post-it* gisa funtzionatzen duen molekula bat gehituz, hots, ubikuitina gehituz. Proteina bati itsatsitako ubikuitina kantitatearen, eta horiek proteinara lotzeko moduaren arabera, proteinak jasoko duen agindua desberdina izango da (Swatek and Komander, 2016) (**2a. irudia**). Alabaina, ubikuitina bidez eman daitezkeen aginduak asko dira. Orintsu frogatu da ubikuitinazioak proteina bat degradatu egin behar dela adierazteaz gain (Glickman and Ciechanover, 2002), zelulan lekuz aldatu behar dela (Wang et al., 2018), edo zelulako beste prozesu batzuk aktibatu behar direla (Dynek et al., 2010) esateko ere balio duela (**2b. irudia**). Hortaz, UBE3A proteina zelulako proteina ezberdinak ubikuitinatzeaz arduratzen dela jakinik, logikoa da pentsatzea bere gabeziaren ondorioz, proteina horiek agintaririk gabe gelditzen direnez zelularen oreka hautsi egiten dela.

Ildo beretik, zelulan badira UBE3A proteinaren aurkako funtzioa burutzen duten proteinak, hots, proteinei ubikuitina *post-it*-a kentzeaz arduratzen direnak. Deubikuitinasa (DUB) izenez ezagutzen dira proteina horiek (Amerik and Hochstrasser, 2004). Hortaz, baldintza osasuntsuetan, UBE3Ak eta DUBek gidatutako proteinen ubikuitinazioa eta deubikuitinazioa, hurrenez hurren, oso estuki erregulatutako prozesuak dira (**2b. irudia**).

2. irudia. (A) Ubikuitina bidezko mezua desberdina izan daiteke ubikuitinak lotzeko moduaren arabera. (B) Proteinaren ubikuitinazioaz arduratzen da UBE3A proteina, aldiz, alderantziz jarduten dute deubikuitinasek, ubikuitina hori gehiago behar ez denean proteinetatik kenduz.



Arestian aipatu bezala, Angelman sindromea UBE3A proteinaren faltagatik sortzen da, hortaz gaixotasuna sakon ulertzeko ezinbestekoa da ezagutzea zeintzuk diren gabezia horren ondorioz neuronetan agintaririk gabe, hots, ubikuitinatu gabe, gelditzen diren proteinak. Orintsu ezagutu ditugu proteina horietako batzuk, eta horien artean dago DDI1 deituriko proteina (Ramirez et al., 2018).

DDI1 zelulako garbitzailea da, izan ere degradatu behar diren proteinak birziklapen-fabrikara, hau da, proteasomara, eramaten ditu (Glickman and Ciechanover, 2002). Hortaz, bistakoa da UBE3Aren gabeziaren ondorioz DDI1 proteinaren jardura ez bada egokia, zelularen birziklapen-prozesua kaltetu daitekeela. Alabaina, oraindik ez da ezagutzen UBE3A proteinak DDI1 proteina ubikuitina bidez markatzean ematen dion agindua zein den, ezta markaketa hori kentzeaz arduratzen den deubikuitinasa zein den ere.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

UBE3A proteina akastuna denean edo ekoizten ez denean, hots, AS pairatzen dutenen kasuan gertatzen den bezala, DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila behar baino baxuagoa izatea

aurreikusten da. Horrez gain, deubikuitinasek DDII proteinak duen ubikuitinazio gutxi hori kentzen badute, egoera are larriagoa izango da. Beraz, DUB horiek inaktibatuz DDII proteinaren ubikuitinazio-maila egokia berreskuratzea lortuko balitz, gaixotasunaren sintomatologia hobetuko litzatekeelakoan gaude. Hori kontuan izanda, gure ikerkuntzan hiru helburu ditugu:

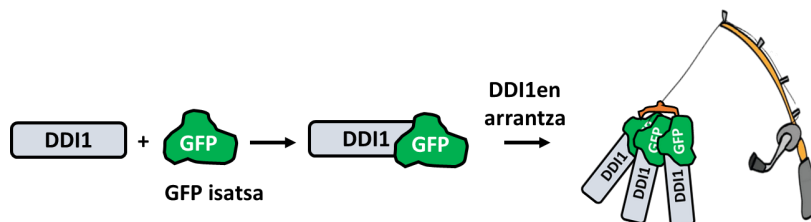
- 1) UBE3A proteinak DDI1 proteinan jarritako ubikuitina kentzeaz arduratzen den deubikuitinasa **identifikatzea**.
- 2) Deubikuitinasa hori **inhibitzen** duen farmako bat erabiliz, DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila berreskuratzen denentz aztertzea.
- 3) DUBa inhibitzen duen farmakoa erabiliz, Angelman sindromearen eredu diren eulien **sintomatologia aztertzea**.

3. Ikerketaren muina

1) DDI1 proteinari ubikuitina kentzeaz arduratzen den DUBaren identifikazioa

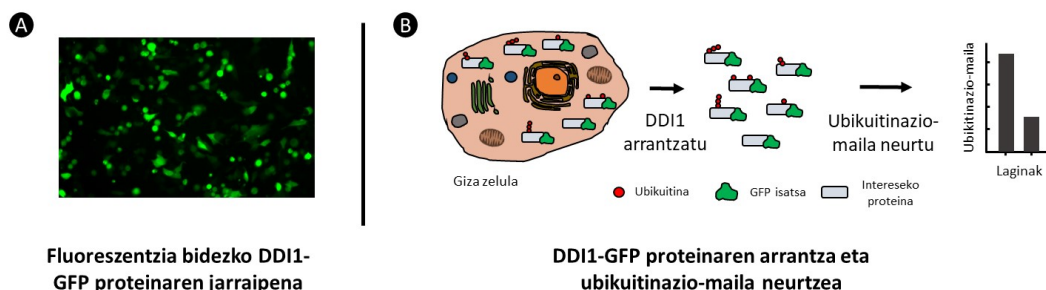
Proteinen ubikuitinazioa laborategian aztertzeko prozesu nahiko konplexua da, izan ere, ubikuitinatzen diren proteinak populazioaren gutxiengoa (%1-5) dira. Beraz, proteina konkretu baten ubikuitinazio-maila aztertu nahi bada, nahitaez proteina konkretu hori arrantzatu beharra dago ondoren sakon aztertu ahal izateko. Kasu honetan DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila neurtu nahi dugu, berau deubikitinatzeaz arduratzen den DUBa identifikatzeko. Hortaz, DDI1 arrantzatu behar dugu. Baina nola? Bada, DDI1 proteinari GFP (*Green Fluorescent Protein*) isatsa gehituaz, eta ondoren GFParekin lotzen den amua daukan kanabera erabiliz (**3. irudia**).

3. irudia. DDI1 proteinari fluoreszentzia den proteina bat (GFP) itsasten zaio, horren aurkako “amuarekin” zelulako proteina guztien artean arrantzatu ahal izateko eta ubikuitinazio-maila neurtzeko.



Batetik, DDI1-GFP proteina fluoreszentea denez, fluoreszentziazko mikroskopioarekin beha daiteke bere kokapena eta adierazpen-maila ezagutzeko (**4.1 irudia**). Bestetik, eta guretzako interesgarriagoa dena, isats hori harrapatzen duen “amua” daukagunez, DDI1 proteina arrantzatu dezakegu, eta ubikuitina ezagutzen duten antigorputzak erabiliz, bere ubikuitinazio-maila neurtu dezakegu (**4.2 irudia**).

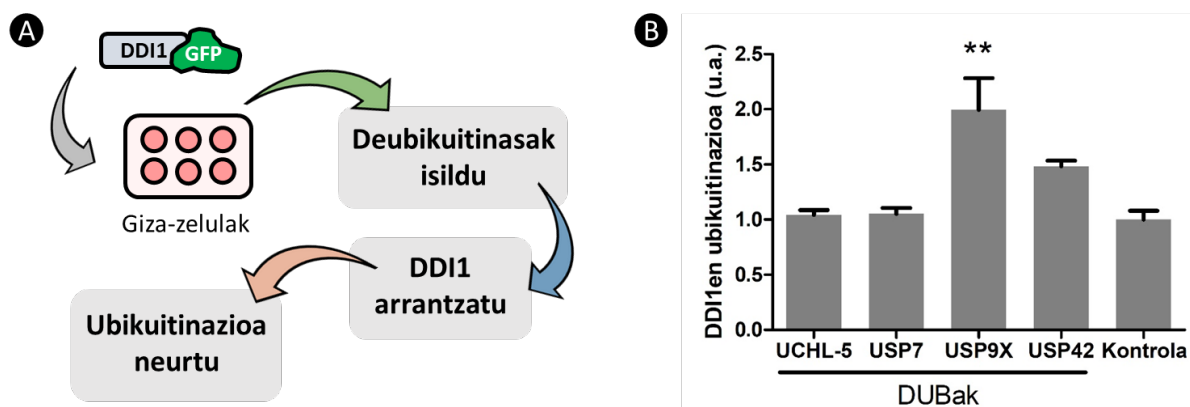
4. irudia. GFP isatsaren erabilera DDI1 proteinan. (A) GFP isatsari esker fluoreszentziazko mikroskopioan beha daiteke DDI1-GFP proteinaren adierazpena HEK293T zeluletan. (B) GFP isatsarekin batzen den kanabera erabiliz, DDI1 proteina arrantzatu dezakegu. Jarraian, antigorputzen bidez proteina honen ubikuitinazio-maila ere neurtu dezakegu.



Giza zeluletan 100 DUB ezberdin inguru daude. Horietatik DDI1 proteina deubikuitinatzen duena zein den jakiteko, zelula populazio ezberdinetan DUB bana desagertuarazi edo isildu dugu. Deubikuitinasaren absentsian, bere itu proteinetan ez da ubikuitina ezabatuko, eta beraz, azken hauen ubikuitinazio-maila igo egingo da. Hortaz, DUBen bat isildu eta DDI1en ubikuitinazio-maila emendatzen dela detektatuz gero, DUB hori DDI1 deubikuitinatzeaz arduratzen dela ondorioztatuko dugu.

Esperimentu horretarako HEK293T zelulez betetako 6 putzutzoko plakak erabili ditugu, eta putzutxo bakoitzean DDI1-GFP gehitzeaz gain, deubikuitinasa bat isildu dugu dagokion siRNA erabiliz (**4a irudia**). Ondoren putzutxo bakoitzean DDI1-GFP arrantzatu, eta antigorputzen bidez bere ubikuitinazio-maila neurtu dugu. Testatutako deubikuitinasen artetik lauk dute eragina DDI1 proteinaren ubikuitinazio-mailan: UCHL5, USP7, USP9X eta USP42. Alabaina, erreplikekin egindako bigarren esperimentu batean lau horietatik bakar baten isilpenak – USP9X– eman du DDI1 proteinaren ubikuitinazio-mailaren emendapen esanguratsua (**4b irudia**). Hortaz, USP9X deubikuitinasa da DDI1 proteinari ubikuitina kentzeaz arduratzen dena.

4. irudia. DDI1 deubikuitinatzeaz arduratzen den DUB proteinaren identifikazioa. (A) DDI1-GFP gehitu dugu lagin guztietan, baina putzutxo bakoitzean deubikuitinasa ezberdin bat isildu dugu. Lagin guztietatik DDI1-GFP proteina arrantzatu, eta bere ubikuitinazio-maila neurtu dugu. (B) Aztertutako DUB guztietatik lauk izan duten arren eragina DDI1 proteinaren ubikuitinazioan, soilik USP9X proteinaren kasuan izan da eragina estatistikoki esanguratsua esperimentua hiru aldiz egitean [ANOVA, **, $P < 0.05$ ($n=3$), u.a.= unitate arbitrarioak].



2) USP9X proteinaren aurkako farmakoak DDI1 proteinaren ubikuitinazio-mailan duen eragina aztertzea.

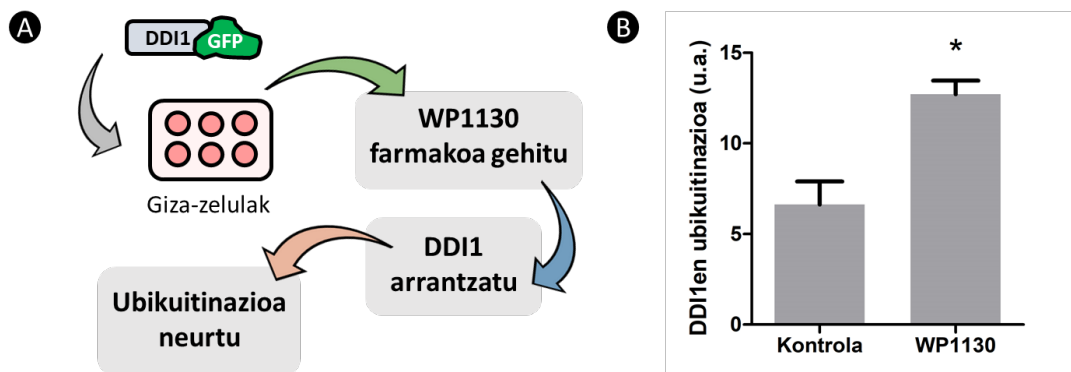
Aurreko atalean ikusi bezala, USP9X isiltzean DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila igo egiten da (**4B irudia**). Efektu hori Angelman sindromea duten pazienteentzako onuragarria suertatu daiteke, gaixoei duten DDI1 ubikuitinatu-maila baxua igotzen lagundu baitezake, beraien sintomatologia hobetuz.

Alabaina, zelulekin erabilitako isilpen teknika ezin da teknikoki pazienteetara hedatu, eta ondorioz, proteina batek jarduteari uzteko modurik erabiliena bere aurkako farmako bat erabiltzea da. Bada USP9X inaktibatzen duen merkaturatutako farmako bat, WP1130 edo degirasina deiturikoa. USP9Xren isilpenarekin lortutako emaitzak, farmako horrekin berresten zirenentz frogatzea izan da gure hurrengo helburua. Izan ere, horrek farmakoa AS tratamendu gisa erabiltzeko ateak irekiko lituzke.

Horretarako, aurreko esperimentuan bezala, 6 putzutzoko plakak erabili ditugu. HEK293T zelulei WP1130 farmakoa gehitu diegu, eta beste batzuk farmakorik gabe kontrol gisa erabili ditugu. Zelulak 48 orduz farmakoarekin inkubatu ostean, DDI1-GFP proteina arrantzatu, eta bere ubikuitinazio-maila neurtu dugu (**5a irudia**). USP9Xren isilpenarekin lortutako datuekin bat eginez, farmakoarekin ere DDI1en ubikuitinazio-maila modu esanguratsuan emendatzen

dela frogatu dugu (**5b irudia**). Beraz, WP1130 farmakoak USP9X inaktibatu, eta ondorioz DDI1en ubikuitinazio-maila emendatzeko gaitasuna duela ondorioztatu dezakegu.

5. irudia. WP1130 farmakoaren eragina giza-zeluletan. (A) DDI1-GFP proteina giza-zeluletan sartu da. Hiru putzutxoko zelulei 0.7 mM WP1130 farmako gehitu zaie, beste hiru putzutxokoei berriz ez, beraz kontrol gisa erabili dira. Ondoren DDI1-GFP arrantzatu, eta bere ubikuitinazio-maila neurtu da. (B) Farmakorik gabeko kontrolarekin alderatuz, WP1130ak DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila modu esanguratsuan emendatzen du [T-testa, *, $P < 0.05$, $n = 3$, u.a. = unitate arbitrarioak].



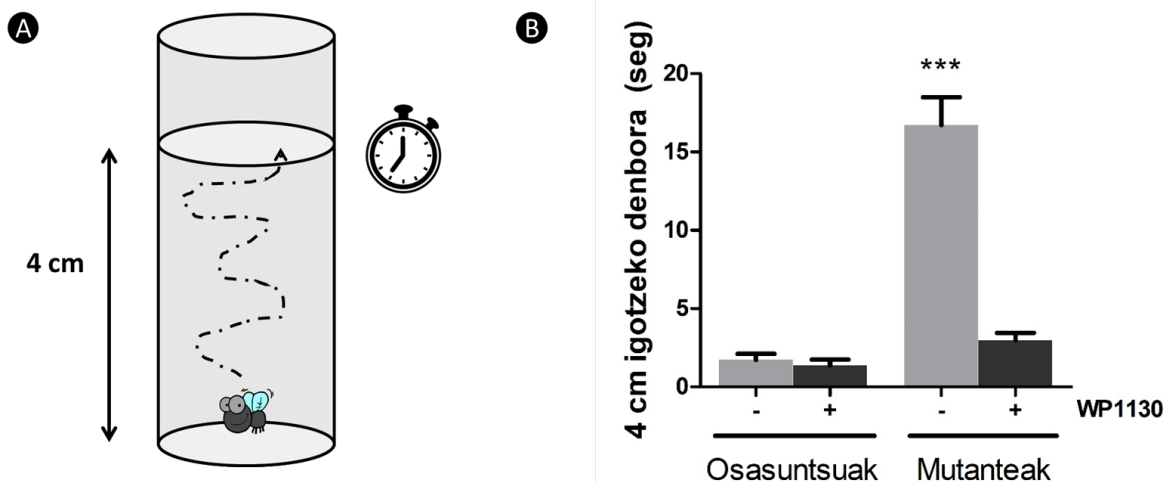
3) WP1130 farmakoaren erabilpena Angelman syndromearen eredu diren eulietan.

Orain arte, Angelman syndromea sendatzeko egin diren ikerketa gehienak burmuinean UBE3A funtzionala berrezartzen saiatu dira (Meng et al., 2015). Aurrez aipatu bezala, guk uste dugu DDI1 proteinaren gutxieneko ubikuitinazio-maila mantentzeak gaixoen sintomatologia, eta ondorioz bizi-kalitatea, hobetu dezakeela. Ildo horretatik, WP1130 farmakoa DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila igotzeko erabilgarria dela frogatu dugu. Beraz, hurrengo pausua, farmako horrek gaixotasunaren sintomatologia hobetu dezakeen aztertzea izan da.

Atal honetan, UBE3A generik ez duen *Drosophila melanogaster* eulia erabili dugu, fruta-eulia ere deitua. Euli horiek ez dute UBE3A proteinarik, Angelman syndromea duten pazienteen antzera. Sintomatologiari dagokionez, gizakiek orekaren eta mugimenduen asaldura erakusten duten bezala, UBE3A gabeko euliek ere ohikoa duten hodian gora egiteko ahalmena gutxituta daukate, hots, euli osasuntsuek baino denbora gehiago behar dute hodiaren goiko aldera hegaz egiteko. Ikerketa honetan, UBE3Arik gabeko fruta-euliei WP1130 farmakoa gehituz gero, hodian gora egiteko duten ahalmena berreskuratzen ote duten aztertu nahi izan dugu.

Horretarako, UBE3A proteinarik ez duten euliak (mutanteak) eta euli osasuntsuak erabili ditugu. Bai euli mutanteekin, bai osasuntsuekin, talde bi egin dira. Talde bati 0.7 mM WP1130 farmako gehitu diegu dietan 24 orduz, bigarren taldeari berriz, ez (kontrol taldea). Hodian gora egiteko ahalmena testatzeko, euliak 4 cm-tako altuerara lerro bat marraztuta duten hodi garbietan sartu ditugu. Jarraian, hodi bakoitzari kolpe bat eman diogu euliak beheko aldera erori daitezen. Momentu horretatik zenbatzen hasita, lehenengo euliak lerroa gurutzatzeko behar duen denbora neurtu dugu (**6a irudia**). Espero bezala, farmakoa jaso duten eta ez duten euli osasuntsuen artean ez dugu hodian gora egiteko ahalmenean aldaketarik nabaritu (**6b irudia**). Aldiz, UBE3A proteinarik ez duten eulietan, kontrol taldeak 15-20 segundu behar izan ditu hodian gora irteteko. Aldiz, WP1130 farmakoarekin tratatutako euli mutanteek 3-4 segundu behar izan dituzte, ia euli osasuntsuen antzeko denbora (**6b irudia**). Horrek erakusten du, WP1130 farmakoari esker, Angelman syndromearen eredu diren euliek hodian gora igotzeko ahalmena berreskuratzen dutela. Horrek pentsarazten digu, USP9X itu terapeutiko egokia izan daitekeela etorkizunean Angelman syndromea pairatzen duten gaixoen sintomak tratatzeko.

6. irudia. WP1130 farmakoak Angelman sindromearen eredu diren eulien sintomatologian duen eragina. **A)** Hodian gora hegaz-egiteko ahalmena neurtzeko esperimentua. Hodia beheko aldetik 4 cm-tara markatzen da, bertan euliak sartu eta lehenengo euliak marra hori gurutzatzeko behar duen denbora neurtzen da. **B)** WP1130 farmakoaren bidez UBE3A proteinarik ez duten euli mutanteek hodian gora egiteko ahalmena berreskuratzen dute, ia euli osasuntsuen maila arte [ANOVA, ***, $P < 0.0001$, $n=3$].



4. Ondorioak

Ikerketa honetan UBE3A proteinaren substratu den DDI1 proteina deubikuitinatzeaz arduratzen den DUB proteina identifikatu dugu: USP9X. Proteina honen inaktibazioa pazienteen tratamendurako bidea izan daitekeen frogatzeko asmoz, batetik, isildu egin dugu giza zeluletan, eta bestetik, farmako baten bidez inaktibatu dugu. Kasu bietan DDI1 proteinaren ubikuitinazioa igo denez, hau benetan gaixotasunaren sintomak arintzeko onuragarria izan daitekeen testatu nahi izan dugu. Angelman sindromearen eredu diren euliek farmakoarekin gutxituta duten hodian gora egiteko ahalmena berreskuratu dutela ikusi dugu, eta beraz, USP9X proteina etorkizunean testatzeko diana terapeutiko egokia izan daitekeela ondorioztatu dugu.

Egia da giza genomak ehun deubikuitinasa inguru kodetzen dituela, eta beraz, DUB baten inhibizioak substratu bat baino gehiagoren ubikuitinazio-maila aldatu dezakeela, albo-kalteak eraginez. Hori ekiditeko, badira gaixotasunaren tratamendu bat lortzeko beste bide batzuk ere. Aurrez aipatu bezala, horietako batzuk UBE3A proteina garunean berrezartzea dute helburu (Meng et al., 2015). Alabaina, urteetan zehar hainbat gaixotasun neurologikoren tratamenduetarako DUBak ituratu izan dira (Osinalde et al., 2018). Horrez gain, gaur egun oraindik ez dira USP9X proteinaren substratu asko ezagutzen, eta berau inaktibatzeak ez du albo-kalte larriarik eragin gure ikerketan. Hortaz, hori guztiori kontuan izanda, estrategia hau ASren sintomatologia hobetzeko bide egokia izan daitekeela deritzogu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan UBE3A proteinaren substratu den DDI1 proteina deubikuitinatzeaz arduratzen den DUBa inaktibatzeak, eulietan ASren antzeko sintomatologia arintzen duela frogatu dugu. Alabaina, UBE3Ak zelulako beste hainbat proteina ubikuitinatzen ditu. Modu beretsuan, DDI1 proteina deubikuitinatzeaz arduratzen diren DUB gehiago ere egon daitezke. Hortaz, beharrezkoa da proteina horiek guztiak ikertu, eta zelulan duten funtzioa argitzea benetan gaixotasunaren mekanismo molekularra ulertu ahal izateko.

Bestalde, UBE3Ak DDI1 proteina ubikuitinatzen duela dakigun arren, oraindik ez dago argi ubikuitinazio horren mezua zein den. Burutzen ari garen ikerketek erakutsi digute UBE3A bidezko DDI1 proteinaren ubikuitinazioak, DDI1 inaktibatzeak balio lezakeela. DDI1ek proteinen birziklapenean duen garrantzia aintzakotzat hartuta, pentsatzekoa da markaketa horren faltak proteinen gehiegizko birziklapena, eta ondorioz, neuronen funtzioetan asaldurak eragin

ditzakeela. Edonola ere, hori momentuz hipotesi bat besterik ez da eta beraz, frogatu beharra dago.

Azkenik, WP1130 farmakoak eulietan ASren pareko sintomen gain eragin positiboa duela frogatu dugu. Hortaz, hurrengo erronka, ikerketa honetan ikusitako efektu onuragarri hori Angelman sindromearen hurbilagoko eredu diren saguetan ere ematen dela frogatzea da, kasu honetan ager daitezkeen albo-kalteak ere aztertuz. Izan ere, horrek guztiak erakutsiko digu ea etorkizunean USP9X inhibitzen duen farmakoa ASren tratamendurako erabilgarria izan daitekeen edo ez.

6. Erreferentziak

- Amerik, A. Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1695, 189–207. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.10.003.
- Buiting, K., Williams, C., and Horsthemke, B. (2016). Angelman syndrome — insights into a rare neurogenetic disorder. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 584–593. doi:10.1038/nrneurol.2016.133.
- D’Arcy, P., Wang, X., and Linder, S. (2015). Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacol. Ther.* 147, 32–54. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.002.
- Dynek, J. N., Goncharov, T., Dueber, E. C., Fedorova, A. V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., et al. (2010). c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J.* 29, 4198–4209. doi:10.1038/emboj.2010.300.
- Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428. doi:10.1152/physrev.00027.2001.
- Kishino, T., Lalande, M., and Wagstaff, J. (1997). UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat. Genet.* 15, 70–73. doi:10.1038/ng0197-70.
- Meng, L., Ward, A. J., Chun, S., Bennett, C. F., Beaudet, A. L., and Rigo, F. (2015). Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. *Nature* 518, 409–412. doi:10.1038/nature13975.
- Osinalde, N., Duarri, A., Ramirez, J., Barrio, R., Perez de Nanclares, G., and Mayor, U. (2018). Impaired proteostasis in rare neurological diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2018.10.007.
- Ramirez, J., Lectez, B., Osinalde, N., Sivá, M., Elu, N., Aloria, K., et al. (2018). Quantitative proteomics reveals neuronal ubiquitination of Rng/Ddi1 and several proteasomal subunits by Ube3a, accounting for the complexity of Angelman syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1955–1971. doi:10.1093/hmg/ddy103.
- Swatek, K. N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res.* 26, 399–422. doi:10.1038/cr.2016.39.
- Wang, P.-Y., Chang, K.-T., Lin, Y.-M., Kuo, T.-Y., and Wang, G.-S. (2018). Ubiquitination of MBNL1 Is Required for Its Cytoplasmic Localization and Function in Promoting Neurite Outgrowth. *Cell Rep.* 22, 2294–2306. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.025.

7. Eskerrak eta oharra

Eskerrak nire taldekide guztiei lan honetan emandako laguntza guztiagatik. Mila esker Josean Rodriguez eta Ane Olazabal DUB-en isilarazpenerako materiala uzteagatik eta zuen aholku guztiengatik. Azkenik, eskertu baita Euskal Herriko Unibertsitateari eta Eusko Jaurlaritzari, doktoretza programa batean parte hartzeko eta lan hau burutzeko aukera emateagatik.

Depresioaren teoria noradrenergikoa

Muneta-Arrate, Itziar; Horrillo, Igor; Ortega, Jorge Emilio eta Meana, Javier
Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU), Medikuntza eta erizaintza fakultatea
itziar.muneta@ehu.eus

Laburpena

Depresioaren sintomatologia konplexua eta heterogeneoa da, diagnostikoa zailago bihurtuz. Depresioaren teoria eta faktore eragile desberdinak proposatu dira azken urteetan zehar. Hauen artean frogatu da tratamendu antidepresibo kroniko baten ostean neurona noradrenergikoetan kokatzen diren α_2 desentsibilizazio prozesua jasaten dutela, monoaminen mailak modulatu. Egun, ikertzeke dago neurona serotoninergetikoetan espresatzen diren α_2 -adrenohartzaileen, hau da, heterohartzaileen, desentsibilizazioa gertatzen den ala ez. Lan honetan tratamendu antidepresibo kronikoaren ostean α_2 -heterohartzaileen desentsibilizazioa gertatzen den ala ez aztertu da, arratoi garunean egindako *in vivo* mikrodialisi teknikaren bitartez.

Hitz gakoak: Depresioa, monoaminak, α_2 -adrenohartzailea, mikrodialisia

Abstract

*The symptomatology of depression is complex and heterogeneous, making diagnosis more difficult. Different theories and factors of depression have been proposed over the last few years. Among these, it has been shown that after a chronic treatment of antidepressants the α_2 -adrenoreceptor that control the levels of noradrenaline undergo desensitization, modulating the levels of monoamines. It remains to be investigated whether the adrenoreceptors found in serotonergic neurons expressed as heteroreceptor suffer desensitization. The objective of this work was to study whether the heteroreceptor suffers desensitization or not after chronic depressant treatment using an *in vivo* microdialysis technique.*

Keywords: Depression, monoamines, α_2 -adrenoreceptor, microdialysis

1. Sarrera eta motibazioa

Depresioa emozioen erregulazioan eragiten duen nerbio sistema zentraleko gaixotasun kroniko eta errepikaria da. Egun asaldura mental ohikoena da, 300 miloi pertsona eragiten diena Munduko Osasun erakundearen arabera. Etorkizunean, depresioa ezgaitasun eta morbiditatearen kausarik nagusia izango omen da erakunde honen arabera. Aipatzekoa da emakumezkoetan maiztasun bikoitza duela eta suizidioa ekar dezakela kasu larrienetan (OMS | depresión.).

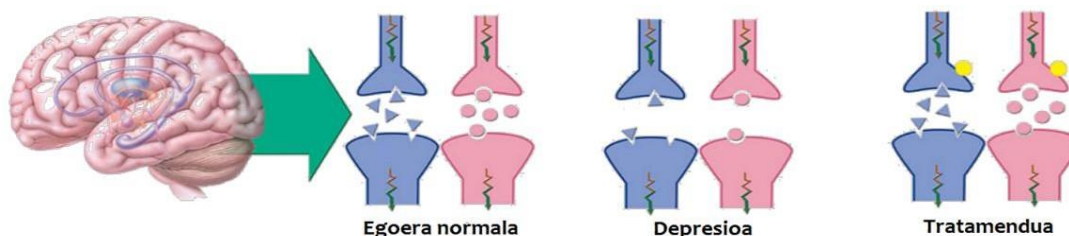
Asaldura mentalaren sintomatologia konplexua eta heterogeneoa da, diagnostikoa zailago bihurtuz. Sintoma nabarmenen artean aipatzekoak dira; anhedonia (plazerra sentitzeko ezgaitasuna), energia galeraren sentazioa edo nekea, gogo aldarre narritakorra edo depresiboa, apatia, ezkortasuna, etsipena, suminkortasuna, gogoratzeko edo erabakiak hartzeko arazoak, harreman sozialen gutxipena, errua edo ez-gai izatearen sentimendua, emozioak adierazteko gaitasunaren murrizketa, lo egiteko arazoak (loezina edo gehiegi lo egitea), gosearen aldaketa (pisu galera edo pisu hartze nabarmenak), aurretik gozamina sortzen zuten jardueretan interesa galtzea, nahigabea, etab.

Ez da aurkitu diagnostikorako metodo zehatzik, baina, gaur egun Gaixotasun Mentalen Diagnostikorako eta Estatistikarako Eskuliburuaren irizpideei esker depresioaren sailkapena egitea posiblea da. Etorkizunean gaixotasuna diagnostikatzeko adierazle biologikoak aurkitzea interesgarria izango litzateke bere diagnostiko egokia izateko. Askotan sintomen espezifikotasun faltak sailkapen egokia egitea oztopatzen du (Horrillo, 2006).

Gaur egun ez dira depresioaren oinarri neurobiologikoak ezagutzen, sistema biologiko desberdinen parte hartzea ematen dela onartuz. Teoria desberdinak proposatu dira gaixotasun mental honen etiologia azaltzeko. Egungo teoria onartuena teoria monoaminergikoa da.

Depresioaren teoria monoaminergikoa izan zen lehenengo proposatu zena. Teoria honen arabera depresioaren etiologia nerbio sistema zentralean (NSZ) noradrenalina (NA) eta serotonina (5-HT) mailen gutxipenarekin erlazionatzen da, aurkikuntza desberdinetan oinarrituta (López- Muñoz, eta Alamo, 2009). Tarte sinaptikoan eskuragarri dagoen NA eta 5-HT mailak murriztuta daude bi sistemen funtzioa kaltetuz. Depresioaren kontrako farmako gehienek monoaminen bioerabilgarritasuna areagotzen dute tarte sinaptikoan MAO edo neurotransmisoreen garraiatzaile espezifikoak blokeatuz (López-Muñoz, Bhatara, Alamo, eta Cuenca, 2004).

1. irudia. Depresioaren teoria monoaminergikoaren eskema



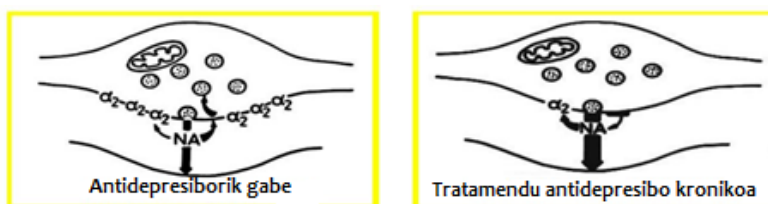
Hala ere, hipotesi monoaminergikoarekin ezin da depresioaren etiopatogenia guztia azaldu. Alde batetik, farmako antidepressiboak pazienteen %60an bakarrik dira eraginkorrak, gainerako pazienteek erresistentzia aurkeztuz. Beste aldetik, farmako gehienek 3-4 aste behar dituzte eragin klinikoa lortzeko, monoaminen handipena berehala ematen den arren. Bestalde, ekintza mekanismoari dagokionez, monoaminen mailak igotzea soilik ez da nahikoa. Esaterako, anfetamina eta kokainak monoaminen mailen areagotzea eragiten dute tarte sinaptikoan, baina ez dute eragin antidepressiborik. Gainera badira ekintza mekanismo ezberdina duten antidepressiboak, mirtazapinak adibidez α_2 -adrenohartzailea (ADRA2) blokeatuz eragin antidepressiboa lortzen du, monoaminen mailak zuzenean handitu gabe. Honek arazo larria ekar dezake berehalako eragin klinikoa beharrezkoa denean, suizidiorako arriskua dagoenean, adibidez.

Eragin berantiarra, terapia farmakologiko kroniko baten ostean ematen diren aldaketen ondorioa izan daitekeela proposatu da. Epe luzera gertatzen diren moldaera fisiologikoak aztertzeak hartzaileen azpi-teoriari buruzko ikerketak egitea ekarri du. Zientzialari desberdinek terapia antidepressibo kronikoaren ostean eragin klinikokoaren agerpenarekin batera hainbat hartzaileen desentsibilizazioa gertatzen dela deskribatu dute. Desentsibilizazioa, hartzaileen funtzionalitate falta da (Syvälahti, 1987). Honek adibidea ADRA2 izango litzateke. ADRA2 NA-ren askapena *feedback* negatibo bitartez erregulatzen duen hartzailea da. Adrenohartzaile hau neurona noradrenergikoetan autohartzaile moduan espresatzen denean izaera inhibitzailea dauka neuronaren aktibitate elektrikoa zein NA askapena gutxituz.

Hortaz gain, depresioa pairatzen duten pazienteetan *post mortem* garun zatietan zein plaketetan ADRA2-ren espresioaren handipena gertatzen dela neurtu da (Cottingham eta Wang, 2012). ADRA2-ren gain-espresioak neurotransmisoreen mailak murriztuko lituzke sinaptikoan efektu inhibitzailearen handipenagatik, teoria monoaminergikoaren arabera.

Hala ere, ADRA2 neurona noradrenergikoetan espresatzen bada ere, bestelako neuronetan heterohartzaile moduan agertu ohi da, bestelako neurotransmisoreen mailak erregulatuz.

2. irudia. ADRA2-ren espresioa egoera patologikoan eta tratamendu kroniko baten ostean

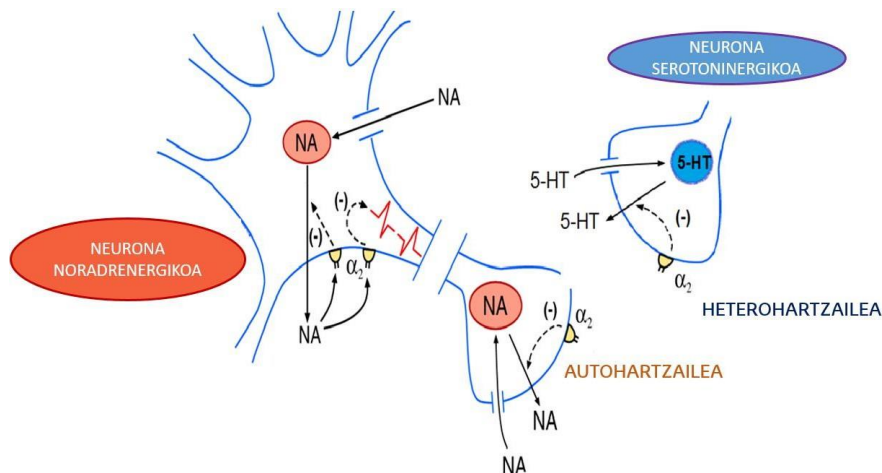


Neurona serotonergikoetan espresatzen den ADRA2 5-HT-ren sintesia eta askapena erregulatzeko gaitasuna dauka. Izan ere, bekoki aurreko garun-azalean (PFC) eta hipokanpoan ADRA2-ren aktibazioaren ondorioz neurona serotonergikoen aktibitatearen eta 5-HT askapenaren gutxipena gertatzen dela deskribatu da (Esteban, Lladó, Sastre-Coll, eta García-Sevilla, 1999). Orain arte, tratamendu antidepresibo kronikoaren ostean bukaera sinaptikoan dagoen α_2 -adrenohartzaileen desentsibilizazioa deskribatu denean autohartzaileetan gertatzen dela deskribatu da (Fernández-Pastor et al., 2017). Hala ere, oraindik jakitzear dago tratamendu antidepresibo kronikoak serotonina erregulatzeko duten heterohartzaileetan ere eragina duen ala ez.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Egungo farmako antidepresiboen eraginkortasuna depresioa duten pazienteen tratamenduan %60 ingurukoa da. Horrez gain, eragin kliniko eta farmakologikoaren artean ez dago erlazio linealik eta horrek farmako antidepresiboen eragin berantiarra dakar. Etorkizunean berehalako eragina duten farmako antidepresiboak garatzea garrantzitsua izan daiteke egoera larrietan eragin klinikoa aurreratzeko. Horretarako ezinbestekoa da gaixotasunaren oinarri neurobiologikoak ulertzea itu terapeutiko berriak edo egungo terapeutika hobetzen duten farmakoak lortzeko. Lan honen helburu nagusia sistema noradrenergiko eta serotonergikoaren arteko erlazio anatomiko-funtzionala aztertzea izango da. Horretarako bukaera serotonergikoetan kokatzen den α_2 -heterohartzailearen funtzionalitatea aztertuko da tratamendu antidepresibo kronikoaren ostean. Arratoiak desipramina farmako antidepresiboarekin tratatuko dira 14 egunetan zehar. Tratamenduaren ostean α_2 -heterohartzailearen aktibitate funtzionala neurtzeko klonidina farmakoa erabiliko da. Horretarako aztergai erabiliko den parametro fisiologikoa 5-HT maila extrazelularraren neurketa izango da. Klonidina α_2 -adrenohartzaileen agonista partziala da eta egoera basalean NA eta 5-HT kontzentrazioen gutxitzea eragiten du. Proiektu honetan klonidina administratzeak 5-HT mailetan eragindako inhibizioa erabili zen α_2 -heterohartzailearen funtzioa neurtzeko.

3. irudia. Sistema noradrenergikoa kontrolatzen duten hartzaileen kokapena eta funtzioa isladatzen duen irudia.



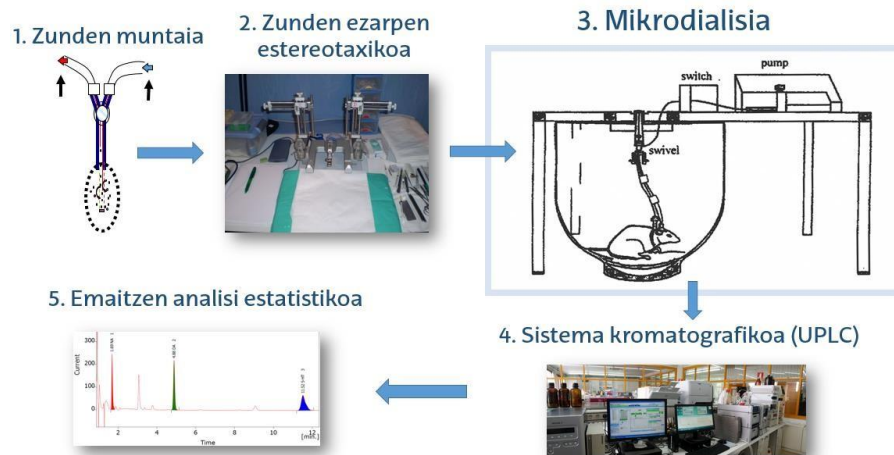
Lan hau aurrera eramateko metodologia gisa *in vivo* mikrodialisi teknika erabili zen: esna eta aske dauden arratoien garunean egindako *in vivo* teknika, hain zuzen ere. Teknika honen bitartez zundak ezartzen diren garuneko eremuan neurotransmisoreen kontzentrazio extrazelularren modulazioa eta kuantifikazioa posible da.

3. Ikerketaren muina

3.1. Materialak eta metodoak

Ikerlana Spargue-Dawley arratoi arrekin burutu zen. Animaliak bi taldetan banatu ziren, tratatuak eta kontrolak. Trataturako arratoi taldeak desipramina 10 mg/ Kg antidepresibo triziklikoa jaso zuten 14 egunetan zehar, farmakoaren administrazioa bide intraperitonealaren bidez burutu zelarik. Kontrol taldeari gatzura (NaCl %0,9) eman zitzaion bide intraperitonealaren bidez. 15.egunean kirurgia estereotaxikoaren bitartez zunda inplantatu zen PFC-an (Igor Horrillo, 2009).

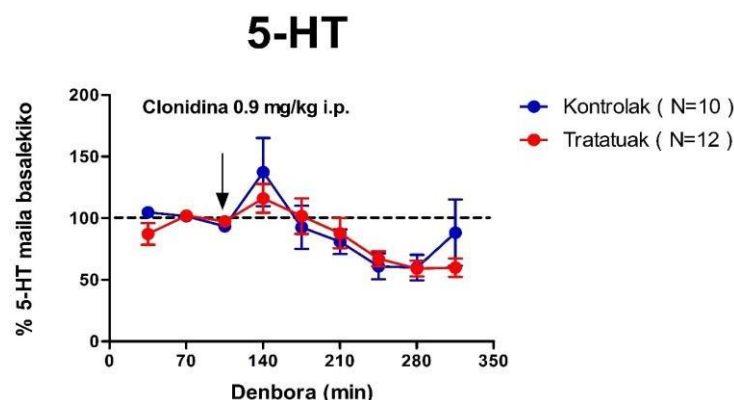
4. irudia. *In vivo* mikrodialisi teknikan jarraitutako metodologiaren eskema.



3.2. Emaitzak

Klonidina bide intraperitonealaren bidez administratu ondoren monoamina mailak neurtu ziren PFC-an. Kontrol taldean zein tratatuen taldean klonidinak eragindako 5-HT kontzentrazioaren gutxipena estatistikoki esanguratsua izan zen. Klonidinaren administrazioak eragindako efektua aztertzerakoan ez zen desberdintasun estatistikoki esanguratsurik aurkitu desipraminarekin kronikoki trataturako taldearen eta kontrol taldearen artean.

5. irudia. Klonidinaren administrazio intraperitonealaren eragina (0,9 mg/kg) PFC-ko 5-HT mailetan. Irudian klonidinaren eragin inhibitzailea irudikatu da 5-HT mailen bitartez. Puntu bakoitzak 35 minututako denbora tarte bakoitzean jasotako laginen kontzentrazioen batezbestekoari $\pm$ E.M.M dagokio. Monoaminen mailak lagin basalen kontzentrazioarekiko portzentaian kalkulatu dira.



4. Ondorioak

Ikerkuntza lan honetan, tratamendu antidepresibo kroniko baten ostean, PFC-ko neurona serotoninergikoen terminaletan kokatutako α_2 -heterohartzaileen aktibitate funtzionala neurtu zen. *In vivo* mikrodialisiko teknika aukeratu zen esperimentua burutzeko. Horretarako arratoiak 14 egunetan zehar desipramina farmakoarekin tratatu ziren. Aurretik, 2001-ean Y. Mateok argitaratutako artikuluan (Mateo, Fernández-Pastor, eta Meana, 2001), neurona noradrenergikoen bukaera sinaptikoan kokatutako ADRA2-ren desentsibilizazioa gertatzen zela frogatu zuten. Ulergarria dirudi tratamendu antidepresiboaren ostean ere α_2 -heterohartzaileen desentsibilizazioa ematea. Izan ere, bi hartzaileen arteko desberdintasun bakarra kokapena da, biak hartzaile inhibitzaileak baitira. Hala ere, ez da horrelakorik gertatu. Tratamendu kronikoaren ostean ez delako α_2 -heterohartzaileen desentsibilizaziorik gertatzen.

α_2 -heterohartzaileen aktibitate funtzionala frogatzeko *in vivo* mikrodialisi teknika erabili zen esna eta aske zeuden arratoinen garunetan. Ebakuntza estereotaxikoaren bitartez zunda bat ezarri zen arratoinen garuneko PFC-an. Deskribatuta dago PFC-a emozio, portaera eta oroimenarekin erlazionatuta dagoela. PCF-a desorekatua aurkitzen da asaldura mentalak jasaten dituzten pazienteetan, hori dela eta, oso interesgarria suertatzen da zunda hor jartzea. Garuneko eremu horretan kokatutako neurona serotoninergikoen α_2 -heterohartzaile post-sinaptikoaren aktibitate funtzionala frogatzeko klonidina farmakoa erabili zen. Farmakoaren administrazioaren ondorioz bereziki NA mailaren gutxipena gertatzen da hartzaileen izaera inhibitzaileagatik. Gure esperimentuan, tratatu zein kontrol taldean klonidinak eragindako 5-HT kontzentrazio gutxipenak antzeman ziren. Horrela, klonidinak monoaminen mailen jaitsiera eragiteko ahalmena zuela frogatu zen, aurretik bestelako ikerketetan lortutako emaitzekin bat datorrelarik. Izan ere, 1985. urtean argitaratutako artikulua batean klonidinaren presentzia 5-HT mailen jaitsiera gertatzen zela deskribatu zen untzien PFC-an (Syvälahti, 1987). Beraz, garai hartan susmatu zitekeen ADRA2-ren erlazioa sistema serotonergikoarekin. Ordutik, ez da askorik ikertu α_2 -heterohartzaileen inguruan. Gure kasuan desipraminarekin tratatutako taldean zein kontrol taldean klonidinak eragindako inhibizioa antzekoa izan zen, hartzaileen aldaketa funtzionala aztertu zenean. Honen arabera ez litzateke hartzaileen desentsibilizaziorik emango neurona serotonergikoen erregulazioaren funtzioan. Ez desentsibilizatu izana hartzaileen izaerarekin erlazionatua egon daiteke, izan ere α_2 -heterohartzaileak klonidinarekiko afinitate ezberdina duela aurkitu da klonidinaren afinitatea aztertzen zen lan batean Lan hartan azaltzen denaren arabera klonidinaren afinitatea hamar aldiz handiagoa da autohartzailearentzat heterohartzailearentzat baino (Maura, Gemignani, eta Raiteri, 1985). Laburbilduz, lan honetan lortutako emaitzen arabera desipraminarekin burututako 14 egunetako tratamendu kronikoak ez du α_2 -heterohartzaileen desentsibilizaziorik eragiten.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Farmako antidepresiboen arazo larrietariko bat, eraginkortasun eskasa agertzen dutela izan daiteke. Gainera, tratamendu hauek onura klinikoa eragiteko 3-4 aste igaro behar dira. Hau arazo bat izan daiteke berehalako eragina behar denean. Hau horrela izanik, oso garrantzitsua suertatzen da farmako berriak ikertzea, eta horretarako ezinbestekoa da gaixotasunaren neurobiologia aztertu eta itu farmakologiko berriak bilatzea. Guk proposatutako eredua jarraituz, tratamendu farmakologikoak epe luzera eragin ditzakeen aldaketak aztertzea izango litzateke helburu, eta bereziki hartzaileen funtzionalitatean. Sistema noradrenergiko eta serotonergikoen arteko hartu emana ezaguturik, hurrengo pausua neurona noradrenergikoetan espresatzen diren heterohartzaile serotonergikoak aztertzea izango litzateke.

6. Erreferentziak

- Cottingham, C., & Wang, Q. (2012). A2 adrenergic receptor dysregulation in depressive disorders: Implications for the neurobiology of depression and antidepressant therapy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(10), 2214-2225. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.07.011
- Esteban, S., Lladó, J., Sastre-Coll, A., & García-Sevilla, J. A. (1999). Activation and desensitization by cyclic antidepressant drugs of alpha2-autoreceptors, alpha2-heteroreceptors and 5-HT1A- autoreceptors regulating monoamine synthesis in the rat brain in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 360(2), 135 -143.
- Fernández-Pastor, B., Ortega, J. E., Grandoso, L., Castro, E., Ugedo, L., Pazos, Á., & Meana, J. J. (2017). Chronic citalopram administration desensitizes prefrontal cortex but not somatodendritic α 2-adrenoceptors in rat brain. *Neuropharmacology*, 114, 114 -122. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.11.025
- Igor Horrillo. (2009). Mikrodialisia. In Itsaso Buesa, Aitziber Mendiguren, Angel Bidauzarraga (Ed.), *Neurozientzien laborategiko eskuliburua* (pp. 229-236) Elkar.
- López-Muñoz, F., Bhatara, V. S., Alamo, C., & Cuenca, E. (2004). [Historical approach to reserpine discovery and its introduction in psychiatry]. *Actas Espanolas De Psiquiatria*, 32(6), 387 - 395.
- López-Muñoz, F., & Alamo, C. (2009). Monoaminergic neurotransmission: The history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Current Pharmaceutical Design*, 15(14), 1563 - 1586.
- Mateo, Y., Fernández-Pastor, B., & Meana, J. J. (2001). Acute and chronic effects of desipramine and clorgyline on alpha(2)-adrenoceptors regulating noradrenergic transmission in the rat brain: A dual-probe microdialysis study. *British Journal of Pharmacology*, 133(8), 1362-1370. doi:10.1038/sj.bjp.0704196
- Maura, G., Gemignani, A., & Raiteri, M. (1985). Alpha 2 -adrenoceptors in rat hypothalamus and cerebral cortex: Functional evidence for pharmacologically distinct subpopulations. *European Journal of Pharmacology*, 116(3), 335-339.
- OMS | depresión. Retrieved from <http://www.who.int/topics/depression/es/>
- Raiteri, M., Maura, G., Gemignani, A., & Pittaluga, A. (1983). Differential blockade by (-)-mianserin of the alpha 2-adrenoceptors mediating inhibition of noradrenaline and serotonin release from rat brain synaptosomes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 322(2), 180 - 182.
- Syvälähti, E. (1987). Monoaminergic mechanisms in affective disorders. *Medical Biology*, 65(2-3), 89-96.

Hiperkolesterolemia Familiarra: PCSK9 aldaeren karakterizazioa tratamendu pertsonalizaturako

Larrea, Asier¹; Jebari, Shifa¹; Galicia, Unai¹; Alonso, Rocio¹; Benito-Vicente,
Asier¹; Uribe B. Kepa¹; Martin, Cesar¹

¹Biofisika unitatea (CSIC, UPV/EHU) eta Biokimika eta Biologia Molekularra Saila,
UPV/EHU

asierlarrea@yahoo.es

Laburpena

Gaixotasun kardiobaskularrak mundu mailan heriotza gehien sortzen dituzten arrazoiak dira, gehienbat bizimodu ez osasuntsuagatik. Hala ere, badaude banako batzuk zeintzuek arrazoi genetikoaren erruz pairatzen dituzten, Hiperkolesterolemia Familiarra (HF) izeneko gaixotasun autosomiko gainartzaile bat izanik. 3 geneetan gertatzen dira aldaerak batez ere: *LDLR*, *ApoB* eta *PCSK9*. Aldaeren identifikazioa, mekanismoa ezartzea eta tratamendua sortzea oso zaila da, baina beharrezkoa gaixotasunaren aurka egiteko. Ikerketa honen helburua funtzio-irabaztea duten 7 *PCSK9* aldaeren karakterizazio funtzionala era ziur eta erraz batean egitea ahalbidetzen duen metodologia bat sortzea izan da, tratamendu pertsonalizatua emateko. Horretarako, *PCSK9*-ren polimorfismo ohikoenak karakterizatu dira sakonki.

Hitz gakoak: Hiperkolesterolemia Familiarra, *PCSK9*, *LDLR*, *ApoB*

Abstract

Cardiovascular diseases are the main worldwide reason of death, especially due to non-healthy lifestyle. However, there are some individuals that suffer from it due to genetic reasons, having an autosomic dominant disease called Familial Hypercholesterolemia (FH). Mutations occur mostly in 3 genes: LDLR, ApoB and PCSK9. The identification, the stablishing of the mechanism and developing of treatment are very difficult processes, but they are necessary to face up the disease. The goal of this research is to set up an easy and reliable methodology to functionally characterize the activity of PCSK9 gain of function variants in order to provide a personalized treatment. Therefore, we have extensively characterized the seven more common gain-of-function PCSK9 variants.

Key words: Familial Hypercholesterolemia, PCSK9, LDLR, ApoB

1. Sarrera eta motibazioa

Gaixotasun kardiobaskularrak mundu mailan heriotza arrazoi nagusiak dira, 2016 urtean ia 16 milioi hildako utzita, Munduko Osasun Erakundearen (MOE) arabera. Bihotz eta odol hodietan kolesterola pilatzean, odolaren fluxua eten daiteke, bihotzekoak izateko aukerak handituz. Afekzio hauek bizimoduarekin erlazioa izan dezakete, eta kirola eginez edo janari osasuntsuagoa janez kolesterol mailak jaitsi daitezke (Ness eta Powles, 1997). Hala ere,

batzuetan kolesterol maila altuaren arrazoa ez dagokio bizimoduari, geneei baizik. Banako batzuek gene zehatz batzuetan aldaketak dituzte, aldaera deiturikoak, eta odolean kolesterol gehiago izatea ekarri dezake, Hiperkolesterolemia Familiarra (HF) izeneko gaixotasuna pairatuz. HF duten pertsonen tendoietako xantoma, zahartzaroko arkua edo arteriosklerosia izaten dute (Lopez, 2008).

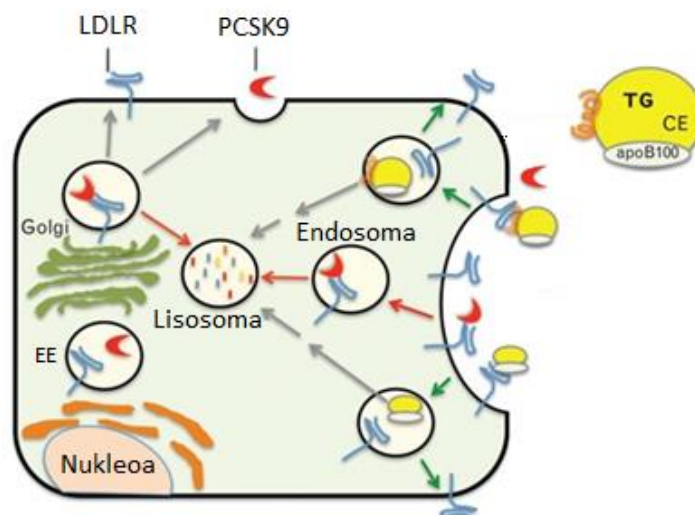
Gaitz hau izatea oso ohikoa da, 250 pertsonako 1-ek izanik (MOE), eta nahiz eta ondo jan edota kirola egin, banako hauek kolesterol maila altuak dituzte. HF izatearen errua aldatutako geneek sorturiko proteinena da, batez ere hirurena: *LDLR*, *ApoB* eta *PCSK9*.

LDLR (ingelesez, *Low-Density Lipoprotein Receptor*) odoleko kolesterola hartzeko erabiltzen den proteina da, energia behar duten zelulek elikagai bezala erabiltzeko. Kolesterola LDL (ingelesez, *Low-Density Lipoprotein*) molekuletan agertzen da, proteina eta beste lipido batzuekin batera. LDLR zelulen mintzean dago, LDL ezagutu, batu eta zelula barnean sartzen dira. Bertan, endosomataro doaz, non hartzaileak konformazio aldaketa bat jasan eta LDL askatzen duen, hau desagiteko, LDLR-a mintzera doan bitartean (*LDLR*-an aldaera daukatenen maiztasuna 1:500 da). Aldaera patogenoa izatekotan, zelulak ez dira gai kolesterola hartzeko eta odolean pilatzen da.

ApoB (ingelesez, *Apolipoprotein B*) LDL-etan kolesterolarekin batera dagoen molekula bat da, eta LDLR-rekin batzen da barneratua izateko. Kasu honetan ere, proteina honen genean aldaerarik egotekotan, ezingo da barneratu zelulan (*ApoB*-an aldaera daukatenen maiztasuna 1:1000 da).

Azkenik PCSK9 (ingelesez, *Pro-protein Convertase Subtilisin-Kexin type 9*) dago (PCSK9-an aldaera daukatenean maiztasuna 1:2500 da). Proteina hau LDLR-ri batzen zaio eta behin endosoman, ez dio uzten konformazio aldaketa jasaten, honen degradazioa eraginez. Beraz, proteina hau funtzio irabaztea izatea eragiten duen aldaerarik badauka, HF izateko arriskua dago (Soutar eta Naoumova, 2007) **(1. Irudia)**.

1. irudia. LDLR, LDL eta PCSK9-ren zikloa zelulan.



Duela gutxi hasi zen PCSK9-en funtzioa eta aktibitatea aztertzen, eta arrazoi horregatik gutxien ezagutzen den HF eragilea da. Gehien bat giblean sortzen da, eta kolesterolaren zikloarekin duen loturagatik ezagutzen da. Oso proteina berezia da dituen hainbat ezaugarriengatik:

4 domeinuz osatua dago, seinale sekuentzia (nora joan behar ezartzen duena), prodomeinua, domeinu katalitikoa eta C-terminaleko domeinua. Proteina sortzean erretikulu endoplasmatikora doa, non prodomeinua mozten zaion, auto-mozketa izeneko prozesuan. Honek ez luke eraginik izan beharko, bere aktibitatea domeinu katalitikoan aurkitzen delako, baina prodomeinua berriz ere lotzen da proteinara, gune hori estaliz eta proteasa aktibitatea inaktibatuz. Azkenik, furina izeneko beste proteina batek bigarren mozketa bat eragin dezake zelulatik kanpo, proteina guztiz inaktibatuz (Cunningham *et al*, 2007).

PCSK9 LDLR-ri batzeko ezinbestekoa da prodomeinua askatzea eta domeinu katalitikoa estaltzea. Hala ere, nahiz eta LDLR-ren degradazioan parte hartzen duen, PCSK9-k bere sorreran ere laguntzen du (Strøm *et al*, 2014). Ezaugarri hauengatik, PCSK9-k era ezberdinetan eragin dezake kolesterolaren pilaketa: LDLR gutxiago sortzea eraginez, afinitate handiagoz batzea LDLR-ri edota PCSK9 gehiago jariatzea (Horton *et al*, 2008).

Gaixotasuna aldaera bati dagokion jakitea oso zaila da, aurretik hainbat froga egin behar direlako, eta aldaera bakoitzak zer eragin duen ezartzea zailagoa oraindik, hauek banan-banan aztertu beharra sortuz. Nahiz eta PCSK9 maiztasun txikiena duen mutatuko proteina izan, oso ikerketa gutxi egin dira honen inguruan, eta tratamendua zailagoa da arrazoi horregatik. Gainera, aldaera bakoitzak mekanismo ezberdin bidez eragiten du gaixotasunean, konponbide ezberdinak erabili beharra sortuz kasu bakoitzerako.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburua

Gaur egun HF detektatzeko odoleko analisiak egiten dira batez ere, kolesterol maila neurtzeko. Teknika hau ez da oso zehatza, hainbat faktorek eragiten dutelako kolesterolan. Gainera, behin HF duela esan ondoren, zer proteinatan dagoen aldaera jakin behar da, eta azkenik aldaerak zer eragin daukan. PCSK9-ren kasuan erabiltzen den tratamendua anti-PCSK9 antigorputzak dira, odolean zehar dagoen proteina inaktibatzeko. Hala ere, PCSK9 aldaera batzuek zelula barnean daukate eragina, odolera irten aurretik, eta tratamendu hori ez zen erabilgarria izango (Zhang *et al*, 2015).

Lan honen helburua PCSK9 aldaeren karakterizazioa errazten duen metodologia bat ezartzea da, gaixotasun hau duten banakoen identifikazioa erraztuz eta bakoitzari tratamendu eraginkorrago eta pertsonalizatuago bat sortzea ahalbidetuz. Horretarako PCSK9-ren mekanismoa ezarri behar da, 3 ezaugarri ezberdin aztertuz

1. PCSK9-ren prozesamendua eta jariaketa maila
2. LDLR-ren adierazpena
3. LDL barneraketa

3. Ikerketa muina

3.1. PCSK9-ren adierazpena eta purifikazioa

PCSK9 aldaeren DNA sekuentzia HF pairatzen zuten pazienteen sekuentziaziotik lortu zen, ondoren plasmidoetan sartzeko. HEK293 zelulak transfektatu ziren plasmidoekin, proteina sortu zezaten. Zelula lerro hau giza giltzurrunetik dator, eta ez du PCSK9 propiorik sortzen, beraz, lortutako proteina guztiak aldaera izango du. Transfektatu gabeko eta PCSK9 aldaera ezberdinak zituzten 8 plasmidoekin transfektatuko zelulak erabili ziren.

Ondoren PCSK9-ren adierazpena handitzea eragin zen, medio xehe bat erabilita. Egoera horrek zelulek LDLR-a sortzea eragin zuen, baina horrekin batera PCSK9 jariatzea eragin zen. PCSK9-ren jariatetak medioa proteina horretan aberatsa izatea eragin zuen eta bertatik purifikatu zen PCSK9 afinitate kromatografia bidez, beranduago zitometria frogatan erabiltzeko.

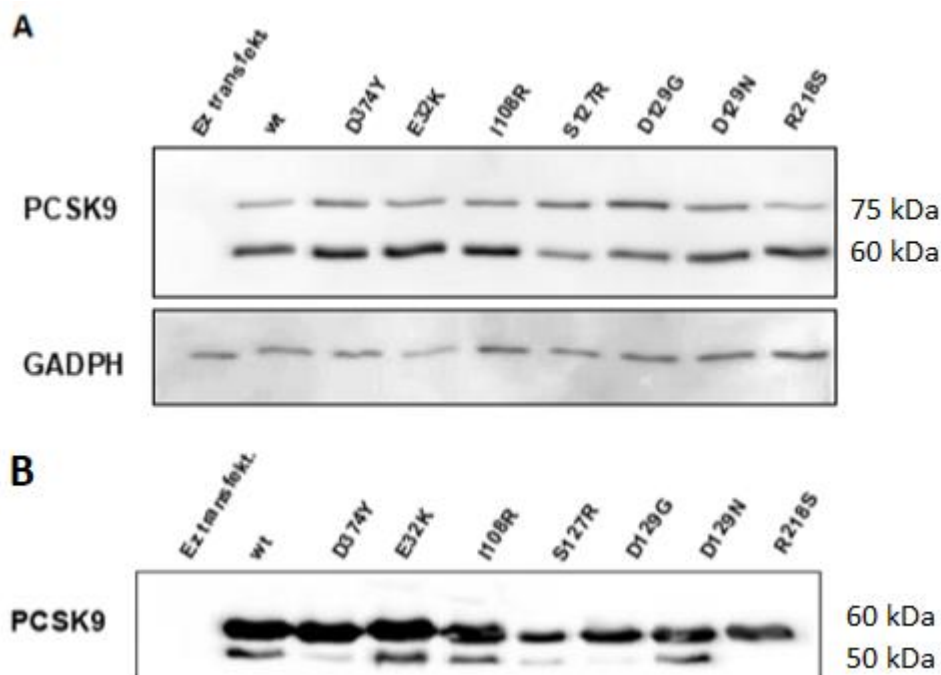
3.2. PCSK9-ren prozesamendua eta jariateta

Behin PCSK9 lortzeko gai ginela ikusita, aldaera bakoitzaren eragina aztertu zen. Proteina era berean sortu zen, zelulak transfektatuz eta medio xehea jarritz, baina gero ez zen purifikatu. PCSK9 aldaeren eragina ikusteko, lehenengo proteinaren prozesamendua eta jariateta mailak neurtu ziren, prozesamendua prodomeinuaren mozketak izanik. Prozesatu gabeko proteina ez denez zelulatik irtetzen, zelulak zeuden medioaz gain, zelulen barnea ere aztertu zen.

Hasteko, medioa hartu zen, aurreko pausuan bezala, baina ez zen purifikatu, PCSK9 aldaerek proteina gehiago edo gutxiago sortzen zuten ikusteko. Zuzenean Western blot bat egin zen 9 laginekin, transfektatu ez zen lagina eta GAPDH proteina konstitutiboa erabiliz kontrol bezala (**2. Irudia, A**). Ondoren, zelulak hartu eta sonikazio bidez lisatu ziren, gero zentrifugatu eta zelula hondakinak baztertzeke. Berriz ere, Western blot bidez analizatu ziren laginak (**2. Irudia, B**).

2. Irudiko A atalean PCSK9 aldaerek prozesamendu eta jariatetan daukaten eragina ikusten da. S127R eta D129G kasuetan izan ezik, 60 kDa-tako banda 75 kDa-takoa baina handiago da, bi aldaera horietan proteina ez dela ondo prozesatzen erakutsiz. Gainera, prozesatzen ez den PCSK9 ezin da jariatua izan, eta **2. Irudiko B atalean** bi aldaera horien medioan proteina gutxiago dagoela ikusten da. Bestalde, D374Y eta R218S aldaerek 50 kDa-tako banda txikiagoa daukate, furinarekiko erresistentzia erakutsiz. Azkenik, E32K aldaerak jariateta maila handiagoa dutela nabari da.

2. irudia. HEK293 zelulen lisatuaren (A) eta medioaren (B) PCSK9 detekzioa Western blot bidez.



3.3. PCSK9-ren eraginaren azterketa zitometria bidez

Prozesamendua eta jariaketa datuak lortu ondoren, LDL barneraketa eta LDLR adierazpena aztertu ziren. Horretarako PCSK9-ren eragina zelulatan ikusi behar zen, zitometria bidez. Teknika hau fluoreszentsia neurtzeko gai denez, esperimentu honetarako fluoreszentea zen FITC-rekin markatu ziren LDL molekulak eta LDLR-ren aurkako antigorputzak.

Bi zelula lerro erabili ziren: Aurretik azaldutako HEK293, zeinak PCSK9 aldaerak plasmidoan zituen, eta HepG2, giza gibelako minbizi zelula. Zelula hauek PCSK9 sortzeko gaitasuna dute, plasmidorik gabe, baina denek andui basatia sortzen dute. Beraz, HepG2 zelulei kanpotik gehitu zitzaizkien PCSK9 aldaerak, aurretik purifikatutakoak, eta kontrolarekin konparatuz hauen eragina bakarrik aztertu zen.

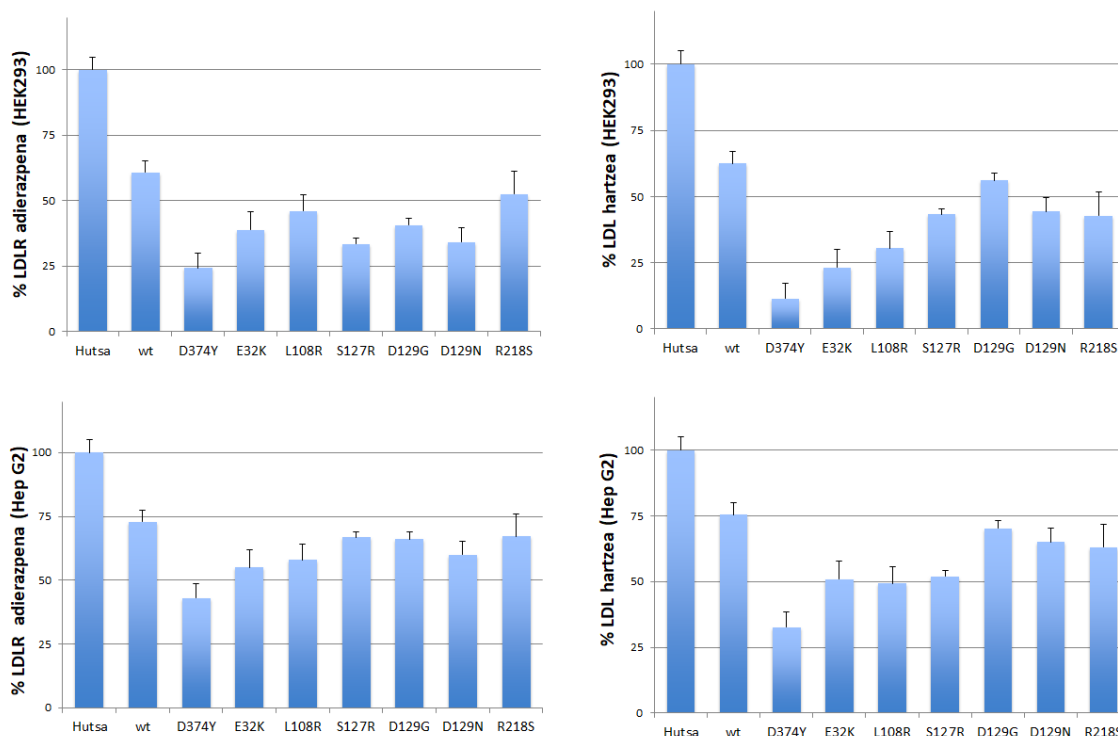
3.3.1. LDL barneraketa

HepG2 zelulei purifikatutako PCSK9 gehitu ondoren ordu erdiz inkubatu ziren, eragina izan zezan, eta gero bi zelula motei FITC zeukan LDL gehitu zitzaien mediora. Bi orduz inkubatu ziren, LDL-a barneratua izan zedin, eta gero Tripan urdina gehitu zitzaien zelulei. Molekula honek FITC-aren eragina deuseztatzen du, baina ez dauka eraginik zelula barnean, kanporatua izaten delako. Beraz, kanpoan geratu zen LDL-a ez zen kontutan hartu, bakarrik barneratua izan zena (**3 Irudia, A eta B**).

3.3.2. LDLR adierazpena

Froga hau aurrekoa bezala hasi zen, HepG2 zelulei PCSK9 aldaerak gehituz kanpotik. Hala ere, gero zelulak paraformaldehidoarekin fixatu ziren, momentu horretatik aurrera LDLR gehiago ez sortzeko. Ondoren LDLR-ren aurkako antigorputz primarioak gehitu zitzaizkien, LDLR-ri batu zirenak espezifikoak, azkenik FITC-rekin markatuko antigorputz sekundarioak gehitzeko, primarioak ezagutzen zituztenak. (**3 Irudia, C eta D**).

3. irudia. HEK293 eta HepG2 zelulatan PCSK9-ren eragina ikusteko eginiko zitometria frogak. (A) HEK293 zelulatan LDLR adierazpena. (B) HEK293 zelulatan LDL barneraketa. (C) HepG2 zelulatan LDLR adierazpena. (D) HepG2 zelulatan LDL barneraketa.



3. irudia. Aztertuz aldaerak talde ezberdinetan banatu daitezke. Lehendabizi, D374Y, E32K eta L108R, zeintzuek seinale gutxiago daukaten LDL hartzean LDLR sorreran baino, bai HepG2 zein HEK293 zelulatan. Bigarren taldean S127R eta D129G daude, kasu honetan alderantzizko eragina izanik HEK293 zeluletan eta andui basatiaren eragina izanik HepG2 zeluletan. Azkenik, D129N eta R218S aldaerak daude, bitarteko erantzun bat izanik.

3.4. Eztabaida

Lortutako emaitza guzti hauekin PCSK9 aldaera bakoitzaren mekanismoa aztertu dugu eta bat datoz orain arte bibliografian argitaturako datuekin. Gure metodologiak erakusten duen moduan, **D374Y**, (Pandit *et al*, 2015), **E32K** (Noguchi *et al*, 2010) eta **L108R** (Abifadel *et al*, 2012) aldaerek LDLR-kiko afinitatea handitzen zuten. Gainera, aldaeren adierazpena aztertzeak, E32K aldaerak gehiago jariatzen duela erakutsi du, azpimarratuz bere GOF aktibitatea.

Western blot eta zitometria bidez, baieztatu dugu **S127R** (Cameron *et al*, 2005) eta **D129G** (Homer *et al*, 2008) aldaerek sorkuntza prozesuan arazoak dituztela, beraz, ez dira ondo prozesatzen ezta jariatzen. Akats honek LDLR-ren sorreran laguntzea ekiditen du, sorrera maila txikituz baina afinitatea aldatu gabe. Mekanismo honen bidez, aldaera hauek HF sorrarazten dute.

R218S-ren kasuan, polimorfismo honek furinarekiko erresistentzia ematen diola ikusi dugu. Honek PCSK9 funtzional gehiago egotea eragiten du, nahiz eta gehiago ez jariatatu edota afinitatea handiagoa izan (Glerup *et al*, 2017).

Azkenik, **D129N**-ren inguruan lorturiko emaitzak ez datoz bat mekanismo ohikoenekin. Barne zein kanpo eragina duela dirudi polimorfismo honek (Fasano *et al*, 2009), baina orain arte ez da era egokian karakterizatu. Beraz, guk sortutako metodologiak lan horretan laguntzea espero dugu.

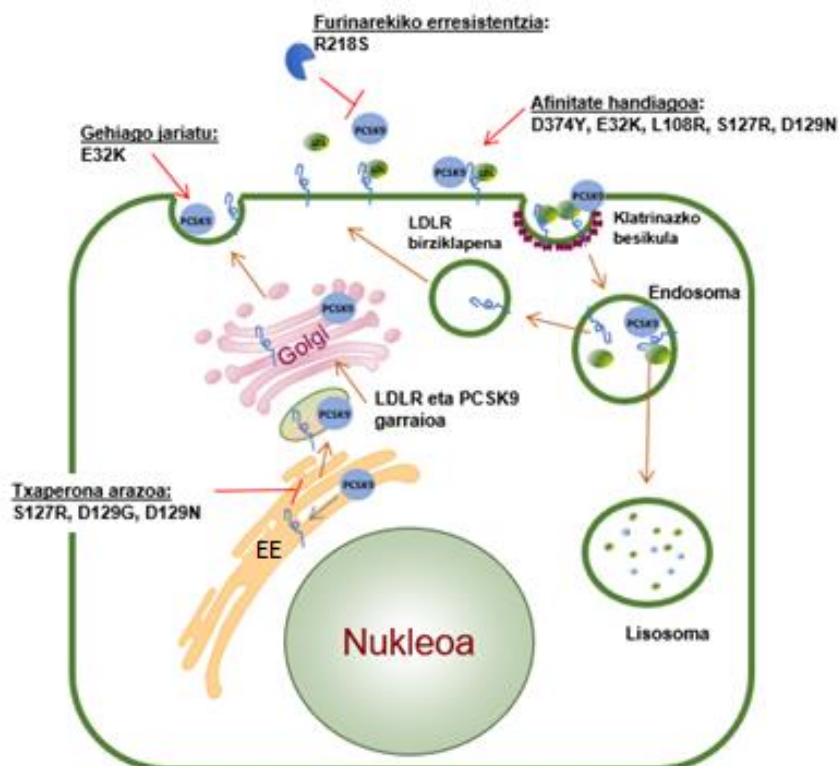
PCSK9 aldaera bakoitzaren mekanismoa **4. Irudian** laburbiltzen da.

Gaur egungo tratamendua anti-PCSK9 antigorputzak erabiltzean oinarritzen da, odolean dauden proteinak inaktibatuz. Hala ere, tratamendu horrek ez du eraginik barne eragina duten PCSK9 aldaeretan, S127R eta D129G esaterako, eta beste konponbide bat aurkitu beharko litzakete. Nahiz eta esparru hori lanaren helburu ez izan, behar bada txaperona edo LDLR-ren prozesamenduan laguntzen duen konposaturen bat eman beharko zen kasu hauetan. Era berean, ez da berdina PCSK9 gehiago jariatzea edo afinitate handiagoz lotzea LDLR-ri: Gehiago jariatzen bada, odoleko PCSK9 kontzentrazioaren arabera tratamenduaren dosia handitu beharko zen. Aldiz, afinitate handiagoz lotzen bada LDLR-ra, beste polimorfismoak baina eragin handiagoa izango du molekula bakoitzak, beraz, dosia handitu beharko zen ere, nahiz eta odoleko PCSK9 kontzentrazioa txikiagoa izan.

Gainera, nahiz eta lan honetan ikertutako PCSK9 aldaera gehienak deskribatuak egon, ez dute metodologia berdina eta zehatza jarraitu kasu denetan. Metodo zientifikoak dio emaitzak alderagarriak izateko era berean lortu behar izan direla, eta lan honetan proposatutako teknikek hori balioztatzen dute.

Guzti honekin, lan honetan PCSK9-ren aldaera garrantzitsuenen karakterizazioa ahalbidetzen duen teknika estandarizatu bat sortu eta proposatzen da. Jada deskribatuak zein aldaera berriak aztertu dira, hiperkolesterolemia sortzeko mekanismoaren arabera sailkatuz eta tratamendu espezifikoak erabiltzeko aukera emanez.

4. irudia. Aztertutako PCSK9 aldaeren mekanismoen eskema. 5 mekanismo nagusi aurkitu dira: Txaperona arazoa, LDLR sortzea zailduz; PCSK9 gehiago jariatzea; Furinarekiko erresistentzia, aktiboa den PCSK9 kopurua handituz; Afinitate handiagoa, LDLR-ri modu errazago batean barneratuz.



4. Ondorioak

Lorturiko emaitzek PCSK9 aldaeren akzio mekanismoen aniztasuna erakusten dute, modu erraz eta esanguratsu batean. Bakoitzak era ezberdinean eragiten du HF-ren hedapenean, eta bakoitza modu zehatzean tratatu beharko zen. Gaur egungo medikamentuek ez dute aldaera guztien aurka balio, eta tratamendu bereziak erabili beharko ziren beraien aurka. Hala ere, horretarako aurreko analisi bat behar da, eta teknika hauek jarraituz egin daitekeela uste eta proposatzen dugu.

5. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Bi norabide edo helburu ezberdin ditugu: PCSK9 aldaera gehiago karakterizatzea, datu base handiago bat izateko eta akzio mekanismoak errazago ulertzeko; Bestalde, mekanismo ezberdinak dituzten aldaeren aurkako medikamentu edo tratamenduak sortzea. Orain arte kanpo eragina duten aldaeren aurkako medikamentuak daude, baina argi geratu da barne eragina dutenen kaltea ez zela horrela konponduko. Behar bada LDLR-ren prozesamenduan lagunduko lukeen proteina bat (txaperona) izan daiteke konponbidea, baina ikerketa asko egin behar da arlo honetan.

6. Erreferentziak

- Abifadel, M. *et al* (2012). Identification and characterization of new gain-of-function mutations in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 223(2), 394–400.
- Cameron, J., Holla, Ø. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E., & Leren, T. P. (2006). Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum. Mol. Genet.*, 15(9), 1551–1558.
- Cunningham, D. *et al* (2007). Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14(5), 413–419.
- Fasano, T., Sun, X. M., Patel, D. D., & Soutar, A. K. (2009). Degradation of LDLR protein mediated by “gain of function” PCSK9 mutants in normal and ARH cells. *Atherosclerosis*, 203(1), 166–171.
- Glerup, S., Schulz, R., Laufs, U., & Schlüter, K. D. (2017). Physiological and therapeutic regulation of PCSK9 activity in cardiovascular disease. *Basic Res. Cardiol.*, 112(3).
- Ness, A. R., & Powles, J. W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of Epidemiology*, 26(1), 1–13.
- Lopez, D. (2008). PCSK9: An enigmatic protease. *BBA-Mol. Cell Biol. L.*, 1781(4), 184–191
- Soutar, A. K., & Naoumova, R. P. (2007). Mechanisms of disease: Genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, 4(4), 214–225.
- Homer, V. M. *et al* (2008). Identification and characterization of two non-secreted PCSK9 mutants associated with familial hypercholesterolemia in cohorts from New Zealand and South Africa. *Atherosclerosis*, 196(2), 659–666.
- Horton, J. D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2007). Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem. Sci.*, 32(2), 71–77.
- Noguchi, T., *et al* (2010). The E32K variant of PCSK9 exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolaemia by increasing PCSK9 function and concentration in the circulation. *Atherosclerosis*, 210(1), 166–172.
- Pandit, S. *et al* (2008). Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.*, 49(6), 1333–1343
- Strøm, T. B., Tveten, K., & Leren, T. P. (2014). PCSK9 acts as a chaperone for the LDL receptor in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, 457(1), 99–105.
- Zhang, X.-L. *et al* (2015). Safety and efficacy of anti-PCSK9 antibodies: a meta-analysis of 25 randomized, controlled trials. *BMC Medicine*, 13(1).

1 motako diabetesari asoziatutako lncRNAen azterketa funtzionala β -zelulen hanturan eta apoptosian

Gonzalez-Moro, Itziar¹; Olazagoitia-Garmendia, Ane²; Fernandez-Jimenez Nora³;
Castellanos-Rubio, Ainara^{2*} eta Santin, Izortze^{1*}

¹Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa; Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketako Institutua, Barakaldo; CIBERDEM

²Genetika, Antropologia eta Animalia Fisiologia saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa; Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketako Institutua, Barakaldo

³Pediatría Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa; Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketako Institutua, Barakaldo

*Egile hauen parte-hartzea berdina izan da.

igonzalez207@ikasle.ehu.eus

Laburpena

1 motako diabetesarekin (DM1) asoziatutako polimorfismo ugari RNA luze ez kodetzaileetan (lncRNA) kokatuta daude. Lan honen helburua DM1-rekin asoziatutako lnc13 eta lncBACH2 deritzen lncRNAen karakterizazio funtzionala gauzatzea izan da. Gure emaitzek lnc13-k β -zelulen hantura prozesuan parte hartzen duela baieztatzen dute. Izan ere, lnc13-ak STAT1 eta PCBP2 molekulen arteko elkarrekintza baimentzen du, hantura sustatzen duen STAT1 mRNAren egonkortasuna emendatzen duelarik. Bestalde, lncBACH2-k BACH2 genearen adierazpena erregulatzen duela eta aldi berean hanturak eragindako β -zelulen apoptosian eragina duela ikusi dugu. Gure lanak gaixotasunarekin lotura duten lncRNAk β -zelulen funtzionamenduan eragina dutela erakusten du, eta hortaz, lncRNAk DM1ren patogenesisian berebiziko garrantzia eduki dezaketela iradokitzen du.

Hitz gakoak: 1 motako diabetesa, lncRNA, β -zelula, hantura.

Abstract

Several polymorphisms associated with type 1 diabetes (T1D) are located in long non-coding RNAs (lncRNAs). The aim of the present work is to characterize the functional impact of two lncRNAs; lnc13 and lncBACH2. lnc13 is implicated in β -cell inflammation process. Indeed, lnc13 allows the interaction between STAT1 and PCBP2 molecules, inducing the stability of the pro-inflammatory STAT1 mRNA. On the other hand, lncBACH2 controls BACH2 gene expression which is directly related to β -cell apoptosis. Our work shows that T1D-associated lncRNAs are implicated in pancreatic β -cell function, and thus, they may play a crucial role in the pathogenesis of the disease.

Key words: type 1 diabetes, lncRNA, β -cell, inflammation.

1. Sarrera eta motibazioa

1 motako diabetes mellitusa (DM1) gaixotasun autoimmune konplexua da. Honetan, zelula immuneak pankreako irlatan murgildu egiten dira (intsulitis deritzon prozesua) eta pankreako β -zelulen suntsipena ematen da (Eizirik et al., 2009). β -zelulak intsulina ekoizteaz arduratzen diren zelulak izanda, zelula hauen desagertzea intsulinararen gabezia ekartzen du gaixoetan, odoleko glukosa-mailak gora egiten duelarik. Odoleko glukosa-maila kontrolatzeko gaixoei bizitza osoan zehar intsulina-tratamendua jaso behar dute. DM1 pairatzen duten gaixoen prebalentzia urte urte emendatuz doa eta 2005-2020 urte bitartean gaixo berrien kopurua Europan bikoiztuko dela aurreikusten da (EURODIAB ACE Study Group, 2000). Emendatze larri horrek eta oraindik inolako tratamendurik ez egoteak, 1 motako diabetesa XXI. mendeko osasun erronka nagusietariko bat bilakatu du.

Eragile genetikoek zein ingurune faktoreek gaixotasunaren garapenean parte hartzen dute. Genetikari dagokionez, gene kodetzaile ugari asoziatu egin dira gaixotasun honekin, hala nola giza antigeno leukozitarioaren (HLA) eskualdea edota intsulinararen (INS) genea. Halere, jakina da gaur egun gaixotasun autoimmuneekin loturik dauden nukleotido bakarreko polimorfismoen

(SNP) %10 inguru RNA luze ez-kodetzaileetan (lncRNA) kokatzen direla. lncRNAk proteina kodetzen ez dituzten 200 nukleotido baino gehiagoz osaturiko RNA molekulak dira. Beraien funtzioaren inguruan informazio gutxi dagoen arren, badirudi geneen transkripzioa erregulatzen dutela mekanismo ezberdinen bitartez (geneen promotoreetara lotuz, transkripzio-faktoreen translokazioa eraginez, etabar). Honek aditzera ematen digu lncRNAtan aurkitzen diren aldaera genetikoek euren funtzioa alda dezaketela, gene eta bidezidor desberdinen adierazpena azalduz. Gure interesa lnc13 eta lncBACH2 deritzen bi lncRNAtan jarri dugu.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburu nagusia 1 motako diabetesarekin lotura duten lncRNAen karakterizazio funtzionala egitea da, pankreako β -zeluletan duten funtzioa deskribatuz eta gaixotasunaren patogenesian eduki dezaketen eragina aztertuz. Helburu hau gauzatzeko EndoC- β H1 deritzon pankreako giza β -zelulen lerroa erabili da, gaur egun diabetesaren ikerketarako dagoen *in vitro* eredurik egokiena delako.

3. Ikerketaren muina

1 Motako diabetesarekin asoziatutako lncRNAen identifikazioa

Gaixotasunarekin lotura duten lncRNAk identifikatzeko, DM1-rekin asoziatutako dauden polimorfismoen lokalizazio genomikoaren eta gaur egunera arte publikoki anotatu diren lncRNAen koordinatu genomikoen arteko gainjarpena gauzatu genuen software bioinformatikoez baliaturik. Lehenik eta behin, DM1-rekin lotutako polimorfismoen zerrenda deskargatu genuen Europako Bioinformatika Institutuak (EBI) duen datu base batetik (https://www.ebi.ac.uk/gwas/efotraits/EFO_0001359), bertan gaixotasunarekin asoziatuta dauden 288 SNP identifikatu genituelarik. Bestalde, *Noncode* datu basetik (http://www.noncode.org/datadownload/NONCODEv5_human.fa.gz) gaur egunera arte anotatu diren giza lncRNA guztien zerrenda atera genuen. Zerrenda biak izanda, gure helburua lncRNAtan kokatuta zeuden DM1-rekin asoziatutako SNPak identifikatzea izanik, RStudio software informatikoa erabili genuen SNPen kokapen genomikoa eta lncRNAen kokapen genomikoa gainjartzeko. Horrela, 69 gainjarpen identifikatu genituen, hau da, DM1-rekin asoziatutako 69 SNP lncRNAtan kokatuak zeudela ikusi genuen.

Ikerketa funtzionala egiteko lncRNAen lehenespena

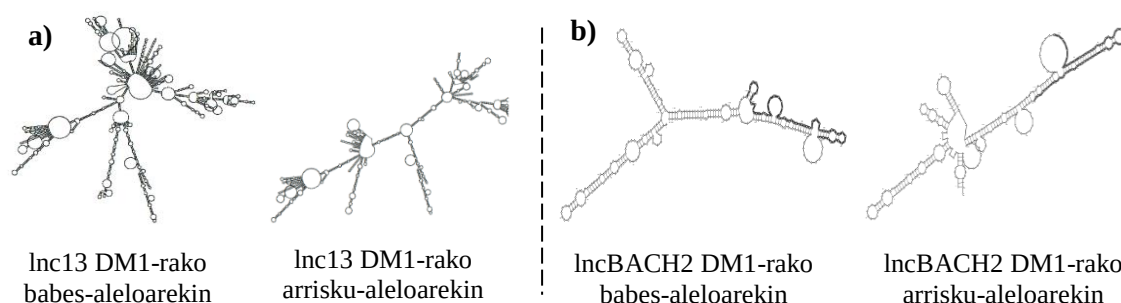
Kontuan izanda DM1-rekin asoziatutako 69 SNP lncRNAtan kokatuak zeudela, ikerketa funtzionala egiteko zenbait lncRNAen aukeraketa egitea erabaki genuen. Horretarako SNP guztien azterketa sistematikoa egin genuen eta honako irizpidea jarraituta sailkatu genituen:

1) SNPen kokapena lncRNAen baitan: exonikoak eta intronikoak banandu genituen. Hau gauzatzeko NONCODE eta Ensembl datu baseetan dagoen informazioa erabili genuen. Horrela, 19 SNP exonikoak eta 50 SNP intronikoak zirela ikusi genuen. Gure kasuan, lehenetsi ditugu exoietan kokatuta dauden SNPak, lncRNAen bigarren mailako egiturak izan dezaketen eraginagatik. Bigarren mailako egiturak berebiziko garrantzitsua du lncRNAen funtziorako. Izan ere, itu molekulekiko interakzioa baimenduko baitu.

2) SNPek lncRNAen bigarren mailako egitura duten eragina: *Center for non-coding RNA in Technology and Health* zentruak eskaintzen duen *RNAsnp Web Server*-aren bidez (<https://rth.dk/resources/rnasnp/>), aurreko pausuan aukeratutako 19 SNP exonikoek lncRNAen bigarren mailako egitura eduki dezaketen eragina *in silico* analizatu genuen. Gure hipotesiaren arabera, lncRNAen bigarren mailako egitura duten SNPek lncRNA beraren funtzioan eragin dezakete. Aztertutako 19 SNPen artean, 9k ez zuten lncRNA iturearen bigarren mailako egitura aldaketarik eragiten. Gainerako 10 SNPek berriz, bigarren mailako aldaketak eragiten zituzten lncRNA ituetan. 1.irudian ikus daitekeen bezala, lnc13 eta lncBACH2 geneetan dauden DM1-rekin asoziatutako SNPen alelo ezberdinek (babes-aleloa (maizago agertzen da DM1 ez duten pertsonetan) eta arrisku-aleloa (maizago agertzen da DM1 duten pertsonetan)) eragina dute lncRNA horiek hartzen duten bigarren mailako egiturak.

3) lncRNAen funtzioaren arabera lehenespena: Aurreko pausuan lehenestutako lncRNAen inguruko bibliografia aztertuz, pankreako β -zelulen funtzioarekin edota diabetesaren patogenesisarekin erlazio potentziala zuten lncRNAk aukeratu genituen. Bilaketa sistematiko baten ostean PUBMED datu base bibliografikoan, bi lncRNA aukeratu genituen; lnc13 eta lncBACH2 (1. irudia). Alde batetik, lnc13 aukeratu genuen autoimmunea den eritasun zeliakoarekin asoziatuta dagoelako eta zelula immuneetan diabetearen patogenesisian parte hartzen duten zenbait hanturazko geneen adierazpena kontrolatzen duelako (Castellanos-Rubio et al., 2016). Bestalde, lncBACH2 aukeratu genuen, bere kokapen genomikoa *BACH2* izeneko gene kodetzaile baten sekuentziarekin gainjartzen delako. Aurretiaz *BACH2* geneak β -zelulen apoptosia erregulatzen duela ikusi da eta ondorioz, lncBACH2 azterketa funtzionalentzako hautagai interesgarria izan zitekeela iruditu zitzaigun (Marroquí et al., 2014).

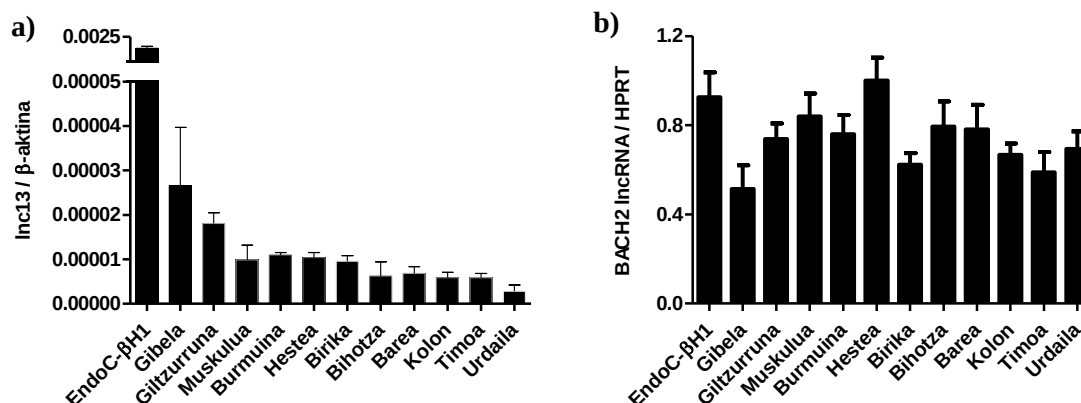
1. irudia. lnc13 eta lncBACH2 lncRNAen egitura sekundarioak. a) lnc13-ren bigarren mailako egitura rs917997 polimorfismoan DM1-rako babes- edo arrisku-aleloa duenean. b) lncBACH2-ren bigarren mailako egitura, rs3757247 polimorfismoan DM1-rako babes- edo arrisku-aleloa duenean.



lncBACH2 eta lnc13 lncRNAen adierazpen-profila

Azterketa funtzionalekin hasi aurretik, aukeratutako bi lncRNAk pankreako β -zeluletan adierazten ziren aztertu genuen eta bertako adierazpen-maila beste ehunekin konparatu genuen. Adierazpena neurtzeko lncRNAen RNA mailak neurtu genituen Taqman entsegua (lnc13) edo hasle espezifikoak (lncBACH2) erabilia Q-PCR teknikaren bitartez. Lortutako adierazpen-balioak, edozein baldintzatan eta ehunetan RNA-maila egonkorra duen gene baten (β -aktina edo HPRT geneak) adierazpen-mailagatik normalizatu genituen, laginean dagoen RNA totalaren kantitatearen arabera zuzentzeko. 2. irudian ikus daitekeen bezala, lnc13 eta lncBACH2, EndoC- β H1 giza β -zeluletan adierazten ziren. Pankreako β -zeluletan lnc13-ren adierazpen-maila absolutua beste ehunetan baino altuagoa zen bitartean (2a. irudia), lncBACH2-ren adierazpena konparagarria zen ehun guztietan, pankreako β -zeluletan barne (2b. irudia). Aipatzekoa da lncBACH2-ren adierazpen-maila absolutua aztertutako ehun guztietan, nabarmen altuagoa zela lnc13 adierazpen-mailarekin alderaturik.

2. irudia. lnc13 eta lncBACH2 lncRNAen adierazpena ehun desberdinetan. a) lnc13-ren adierazpena giza ehun ezberdinetan. b) lncBACH2-ren adierazpena giza ehun ezberdinetan



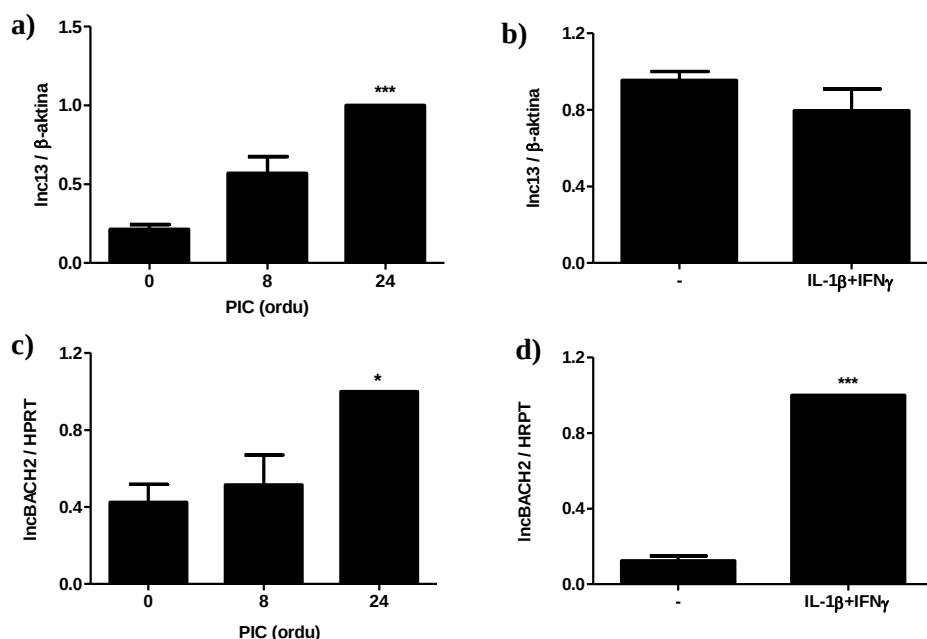
Behin gure intereseko lncRNAk pankreako giza β -zeluletan adierazten zirela ikusita, hurrengo pausua, haien adierazpenean estimulu diabetogeniko ezberdinen eragina aztertzea izan zen.

Zenbait ikerketen arabera, birusek eragindako infekzioek eta hauen ondorioz sistema immuneko zelulek ekoizten dituzten zitokinek eragin zuzena dute diabetesaren patogenesisian, batez ere hasierako etapetan (Eizirik et al., 2009). Horrela izanda, birusek eta zitokinek bi lncRNAen adierazpenean eragina zuten aztertu genuen, horretarako infekzioa birikoa simulatzen duen harizpi bikoitzeko RNA biriko sintetikoa (PIC deritzona) edo interleukina- 1β (IL- 1β) eta interferon- γ (IFN γ) zitokinen nahasketa tratamendu gisa erabili genuelarik.

3. irudian ikus daitekeen bezala, PIC tratamenduak 24 orduz izandako zelulek lnc13 (3a. irudia) zein lncBACH2-ren (3b. irudia) adierazpena emendatua zuten. Pankreako β -zelulak IL- 1β + IFN γ nahasketarekin 48 orduz tratatzen zirenean berriz, lnc13-ren adierazpenean ez zen aldaketarik ikusten (3c. irudia), baina lncBACH2-ren adierazpena 8 aldiz emendatzen zen tratatu gabeko zelulekin (-) konparatuta (3d. irudia). Estimulu diabetogeniko hauen efektua oso zabala izan daitekeen arren, lncRNA hauen adierazpenean duten eragina haien adierazpena kontrolatzen dituzten transkripzio-faktoreen aktibazioan eragiten dutelako izan daiteke. Etorkizunean egingo ditugun esperimentueta, lncRNA hauen adierazpena kontrolatzen dituzten faktoreen identifikazioa eta karakterizazioa egingo dugu.

3. irudia. lnc13 eta lncBACH2 lncRNAen adierazpena PIC eta IL- 1β +IFN γ tratamenduen ostean.

a) lnc13-ren adierazpena 8 edo 24 orduz PIC tratamenduarekin egon ostean. b) lnc13-ren adierazpena 48 orduz zitokina tratamenduarekin egon ostean. c) lncBACH2-ren adierazpena 8 edo 24 orduz PIC tratamenduarekin egon ostean. d) lncBACH2-ren adierazpena 48 orduz zitokina tratamenduarekin egon ostean (* $p < 0.05$ eta *** $p < 0.001$).



Aukeratutako lncRNAen azterketa funtzionala

Aukeratutako lncRNA bakoitzaren funtzioa karakterizatzeko eta potentzialki diabetesaren patogenesisian eragina eduki dezaketen bidezidorretan duten eragina aztertzeko, pankreako β -zeluletan intereseko lncRNAen inhibizioa ala gainadierazpena oinarritzat dituen zenbait esperimentu martxan jarri genituen. Kontuan izanda diabetesaren patogenesisiaren ezaugarriak, bi bidezidor-talde izan genituen aztergai, alde batetik hanturarekin erlazionaturikoak (lnc13-arekin lotua) eta bestaldetik, apoptosiarekin (lncBACH2-arekin lotura duena) erlazionaturikoak.

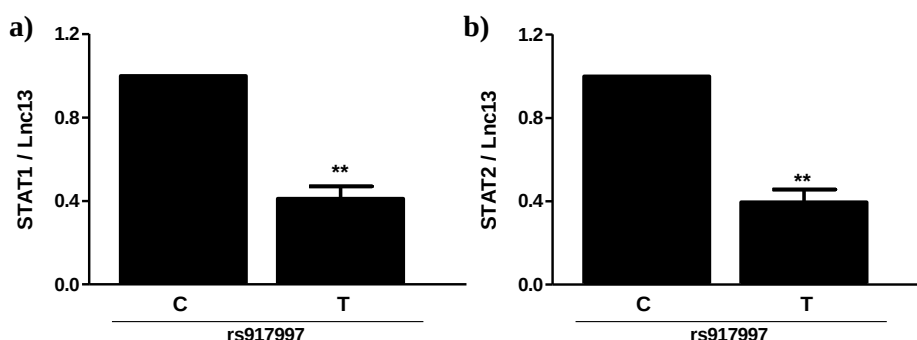
lnc13 eta birusek eragindako β -zelulen hantura

Aurretiaz aipatu dugun bezala, harizpi bikoitzeko RNA biriko sintetikoak (PIC) lnc13-ren adierazpena emendatzen du pankreako β -zeluletan. Zenbait ikerketen arabera, enterobirusek pankreako β -zelulak infektatzen dituztenean, β -zeluletan hanturarekin erlazionatutako bidezidorrak aktibatzen dira, intsulitisa (sistema immuneko zelulen infiltrazioa) eraginez (Rodriguez-Calvo, 2018; Dunne et al., 2019 eta Richardson eta Morgan 2018).

Gure taldeak lnc13-aren inguruan egindako azterketek aditzera eman dute lnc13-k STAT1 eta STAT2 transkripzio-faktoreen adierazpenean eragina duela, hauek pankreako β -zelulen hanturan berebiziko garrantzia duten transkripzio-faktoreak direlarik. Ikertzen ari garen gaixotasunarekin asoziatutako rs917997 polimorfismoaren eragina kontuan hartzeko, DM1-erako arrisku aleloa (rs917997*C) duen lnc13-a edo babeserako aleloa (rs917997*T) duen lnc13-a pankreako β -zeluletan gainadierazi eta gero, STAT1 eta STAT2 transkripzio-faktoreen adierazpena neurtu genuen.

4. irudian ikus daitekeen bezala, DM1-erako arrisku aleloa zeraman lnc13-a gainadierazten genuenean (rs917997*C), STAT1 (4a. irudia) eta STAT2 (4b. irudia) transkripzio-faktoreen adierazpena handiagoa zen, DM1rako babes-aleloa zeraman lnc13-a gainadierazten genuenean baino. Emaitza hauek lnc13-k STAT1/2-ren adierazpena alelo-espezifiko kontrolatzen duela konfirmatzen dute.

4. irudia. STAT1 eta STAT2 transkripzio-faktoreen adierazpen alelo-espezifikoa. a) STAT1 transkripzio-faktorearen adierazpena lnc13-rs917997*C edo lnc13-rs917997*T gainadierazten denean. b) STAT2 transkripzio-faktorearen adierazpen alelo-espezifikoa lnc13-rs917997*C edo lnc13-rs917997*T gainadierazten denean. (**p < 0.01).

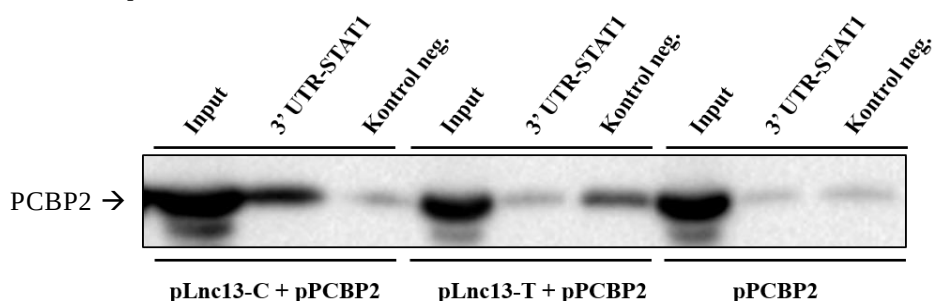


Argitaratutako lanen arabera (Xin et al., 2011), PCBP2 deritzon proteina batek STAT1 eta STAT2 mRNAk egonkortzen ditu, transkripzio-faktore hauen itzuli gabeko 3' muturreko eskualdera (3'UTR) lotuz. Egonkortze horrek mRNA molekulen endekapena zaildu egiten du, molekulak luzaroago mantenduz. Zenbait zelula-motetan PCBP2 proteinak eragindako STAT1/2 mRNA molekulen egonkortzeak hantura eragiten duela ikusi da (Murahashi et al., 2016 eta Xia et al., 2015).

Aurretiaz egindako zenbait RNA-immunoprezipitazio esperimentuei esker, lnc13 PCBP2 proteinara eta STAT1/2 mRNA molekuletara lotzen dela ikusi genuen, PIC-en presentzian molekula hauen arteko elkarrekintza handiagotzen delarik. Hori jakinda, lnc13 PCBP2 eta STAT1/2 molekulen arteko estekatzailea izan zitekeela pentsatu genuen eta hipotesi hori aintzat hartuz, STAT1 mRNAren 3'UTR eskualdearen *in vitro* transkripzioa egin genuen eta biotinarekin markatu. Ekoiztutako 3'UTR-STAT1 biotinizatua lnc13-C, lnc13-T edota PCBP2 gainadierazita zuten β -zelulen erauzkinarekin inkubatu genituen. Jakinda estreptabidina-biotina elkarrekintza oso sendoa dela, estreptabidinarekin biotinadun 3'UTR-STAT1-ari lotutako proteinak purifikatu genituen. Lorturiko laginekin *Western blot* teknika erabili genuen PCBP2 proteinaren adierazpena aztertzeko (5. irudia).

RNA pull-down esperimentu hauen aurretiazko emaitzek ($n=1$), PCBP2 eta 3'UTR-STAT1-aren arteko elkarrekintza egoteko lnc13-ren presentzia beharrezkoa dela aditzera eman zuten. Gainera lnc13 molekulak DM1-rako arrisku-aleloa (rs917997*C) duenean, PCBP2 eta 3'UTR-STAT1-aren arteko lotura indartsuagoa da lnc13 molekulak DM1-rako babes-aleloa (rs917997*T) duenean baino (5. irudia). pLnc13-C zein pLnc13-T plasmidoekin transfektatutako zeluletan, 3'UTR-STAT1-en presentzian PCBP2 dagoela ikus daiteke pPCBP2-rekin soilik transfektatutako zelulekin konparatuta (*Input*-ean pPCBP2-rekin transfektatutako zelulen kasuan pLnc13-T-rekin transfektatutako zeluletan baino proteina gehiago kargatu dela ikus daiteke; esperimentu gehiago edukitzean grafiko batean “*input-rekiko %*” gisa adieraziko bagenu diferentzia argi ikusiko litzateke). Hauek aurretiazko emaitzak dira eta teknikaren optimizazioa egitea beharrezkoa da emaitza eztaba daezinak lortzeko (ikus daitekeen bezala, pLnc13+pPCBP2 baldintzan kontrol negatiboa nahiko zikina baitago).

5. irudia. Biotinilizatutako 3'UTR-STAT1 RNAren pull-down esperimentua eta PCBP2 proteinaren Western blot-a. lnc13-C eta PCBP2 (plnc13-C+pPCBP2) edo lnc13-T eta PCBP2 (plnc13-T+pPCBP2) gainadierazitako zeluletan, PCBP2 proteina STAT1 molekularen 3'UTR eskualdera lotuta dagoela ikus daiteke. Gainera, DM1-rako arrisku-aleloa duen lnc13a (C aleloa) gainadierazten denean, PCBP2 eta 3'UTR-STAT1 molekularen arteko elkarrekintza handiagoa da. lnc13 gainadierazten ez denean berriz (pPCBP2), 3'UTR-STAT1 ez da PCBP2 proteinari lotzen.



lncBACH2-k β -zelulen apoptosiaren erregulazioan parte hartzen du

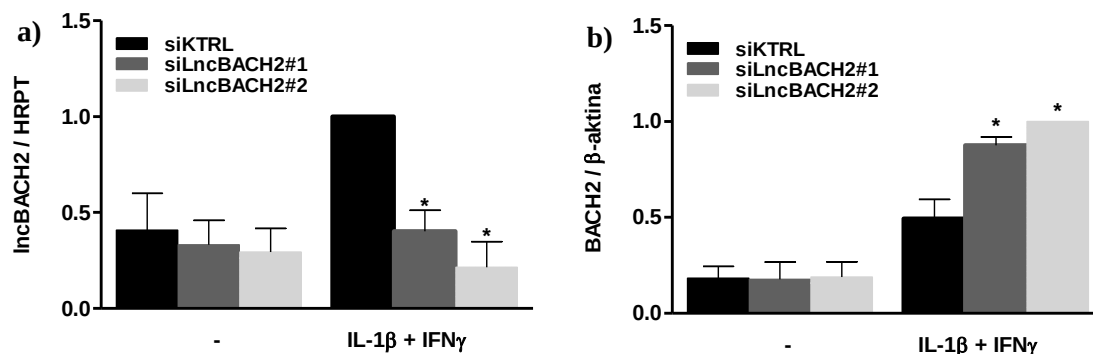
Kontuan izanda lncBACH2-ren kokapen genomikoa eta *BACH2* gene kodetzailearen kokapen genomikoa gainjartzen direla gure hasierako hipotesia lncBACH2-k *BACH2* genearen adierazpena erregulatzen zuela izan zen.

Hasteko, β -zeluletan lncBACH2 isilarazi genuen *BACH2* genearen adierazpenean eragina zuen aztertzeko. Isilarazpena gauzatzeko bi siRNA molekula desberdin erabili genituen. siRNAk RNA molekula txikiak dira zeintzuk RNA itura nukleotido osagarritasuna dela eta lotu egiten diren RNA horren adierazpena blokeatuz. siRNA kontrol bat erabili genuen (siCTRL) zeinak ez duen ezer isilaraziko baina esperimentua ondo joan denaren adierazle izango dena. lncBACH2 isilarazpenaz gainera, 48 ordutako IL-1 β +IFN γ tratamendua aplikatu zitzaion lagin erdiei. Honela, lncBACH2 gabeziaren eragina aztertu genuen bai egoera basalean bai zitokinen eraginaren ostean. 6. irudian ikus daitezkeen emaitzek, alde batetik, IL-1 β +IFN γ tratamenduak lncBACH2 eta *BACH2*-ren adierazpena emendatzen duela adierazten dute. Bestalde, IL-1 β +IFN γ -rekin tratatutako eta lncBACH2 isilarazitako β -zeluletan, *BACH2* gene kodetzailearen adierazpenak gora egiten du. Beraz, badirudi hanturazko testuinguru batean, non IL-1 β +IFN γ dagoen, lncBACH2-k *BACH2* gene kodetzailearen adierazpena kontrolatzen duela; lncBACH2 murrizteak *BACH2* genearen emendatzea dakarrela ikusten dugu.

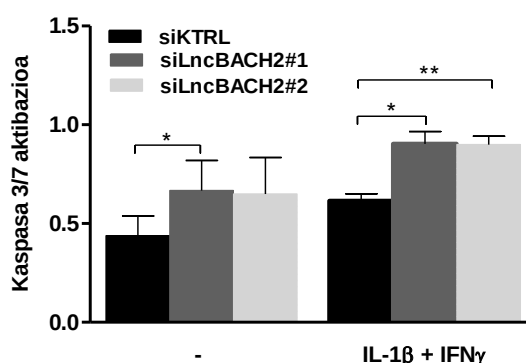
BACH2 geneak DM1-rekin lotura duela ikusi da (Marroquí et al., 2014). Izan ere, *BACH2* proteinak immunitate-sistemak abiarazitako pankreako β -zelulen apoptosia erregulatzen du. β -zelulen heriotza horrek diabetesaren sorrera ekar lezake. Hau horrela izanda, lncBACH2 eta apoptosiaren arteko lotura aztertzea jo genuen. Apoptosiaren neurketa egiteko kaspasa 3/7-ren aktibazioa aztertu genuen luziferasaren aktibitatean oinarritzen den kit komertzial bat erabiliz. Aurrekoan bezala, lncBACH2 isilarazpena eta 48 orduz IL-1 β +IFN γ tratamenduaren eraginak aztertu ziren. 7. irudian adierazten den moduan, IL-1 β +IFN γ tratamenduak apoptosia

emendatzen du, kaspasa 3/7-ren aktibazioaren igoerak adierazten duen bezala. Gainera, lncBACH2 isilarazitako β -zeluletan, kaspasa 3/7-ren aktibazioa handiagoa da siRNA kontrolarekin (siKTRL) transfektatutako zelulekin alderatuta bi baldintzetan (IL-1 β +IFN γ tratamenduarekin edo gabe). Ondoriozta daiteke IL-1 β +IFN γ 48 orduz trataturiko zeluletan apoptosis emendatzen dela eta gainera, lncBACH2 isilaraztean apoptosi-maila gorago doala.

6. irudia. lncBACH2 eta BACH2 genearen adierazpena lncBACH2 isilarazitako zeluletan. a) lncBACH2 lncRNAren adierazpena tratatu gabeko (-) edo IL-1 β +IFN γ -rekin tratatutako zeluletan. b) BACH2 genearen adierazpena tratatu gabeko (-) edo IL-1 β +IFN γ -rekin tratatutako zeluletan (* $p < 0.05$).



7. irudia. Kaspasa 3/7 aktibazioaren neurketa. Luziferasa bidezko kaspasa 3/7 aktibatuen neurketa espezifikoa, lncBACH2 isilarazitako β -zeluletan eta IL-1 β +IFN γ tratamenduarekin edo gabe (-).



4. Ondorioak

Oro har, datu hauek DM1-rekin asoziatutako lncRNAk β -zelulen bideragarritasunean eragina duten bi bidezidorretan (hantura eta apoptosis) eragina dutela baieztatzen dute eta 1 motako diabetesaren patogenezian berebiziko garrantzia eduki dezaketela iradokitzen dute.

Gure emaitzen arabera, lnc13-ak β -zelulen hantura prozesuan parte hartzen du STAT1 eta STAT2 transkripzio-faktoreen erregulazioaren bitartez. Gainera, efektu horren atzean dagoen mekanismo molekularra identifikatu dugu eta lnc13 STAT1/2 mRNA molekulen eta RNAren egonkortzailea den PCBP2 proteinaren arteko estekatzailea dela ikusi dugu. Bestalde, lnc13-an dagoen DM1-rekin asoziatutako polimorfismoaren aleloek prozesu honetan eragina dutela ikusi dugu, arrisku-aleloaren efektua babes-aleloarena baino indartsuagoa delarik. Laburbilduz, lan honek lnc13-a DM1-rako arrisku aleloa duenean infekzio birikoek eragiten duten hantura handiagotzen duela ikusi dugu, honek diabetesaren patogenezian berebiziko eragina duelarik. Izan ere, hantura DM1-ren garapenaren hasierako faseetan ematen den prozesua da. Hanturak sistema immuneko zelulak aktibatzen laguntzen du, pankreako β -zelulen suntsipena bideratuz (apoptosiaren aktibazioa eraginez). Pankreako β -zelulen suntsipenak, intsulinararen eskasia dakar eta ondorioz, gaixotasunaren garapena.

Bestalde, lncBACH2-ren azterketa funtzionalari dagokionez, lncBACH2-k *BACH2* genearen adierazpena kontrolatzen duela dirudi. Gainera, lncBACH2 molekulak, *BACH2* genearen erregulazioaren bitartez, hanturak eragindako β -zelulen apoptosian (suntsipenean) eragina duela ikusi dugu.

Laburbilduz, DM1-rekin asoziatuta dauden SNPak dituzten bi lncRNA hauek 1 motako diabetesaren patogenesisian eragina duten bi prozesuetan (hantura eta zelulen heriotza) parte hartzen dutela ikusi dugu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa lan honen bitartez bi lncRNAen karakterizazio funtzionala egin dugu, baina DM1-rekin asoziatutako lncRNA gehiago daudela jakinda, epe laburrera gure helburu nagusia beste lncRNA batzuen karakterizazioa egitea da. lncRNA horien eta ingurune faktoreen (batez ere, infekzio birikoen) arteko elkarrekintza aztertuz, β -zelulen suntsiketan DM1-rekin asoziatutako lncRNAen eragina zein den argitu nahi dugu.

6. Erreferentziak

- Castellanos-Rubio A. et al. (2016), A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease. *Science*, 352, 91-95.
- Dunne J. et al. (2019), Rationale for enteroviral vaccination and antiviral therapies in human type 1 diabetes, *Diabetologia*, 62, 1-10.
- Eizirik DL. et al. (2009), The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 5, 219-226.
- EURODIAB ACE Study Group (2000), *Lancet*, 355, 873-876.
- Marroqui L. et al. (2014), BACH2, a candidate risk gene for type 1 diabetes, regulates apoptosis in pancreatic β -cells via JNK1 modulation and crosstalk with the candidate gene PTPN2. *Diabetes*, 63(7), 2516-2527.
- Murahashi et al. (2016), Identification of poly(rC) binding protein 2 (PCBP2) as a target protein of immunosuppressive agent 15-deoxyspergualin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476 (4), 445-449.
- Richardson S., eta Morgan N. (2018). Enteroviral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes: new insights for therapeutic intervention. *Current opinion in pharmacology*, 43, 11-19.
- Rodriguez-Calvo T. (2018), Enteroviral Infections as a Trigger for Type 1 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 18, 106.
- Xia N. et al. (2015), PCBP2 regulates hepatic insulin sensitivity via HIF-1 α and STAT3 pathway in HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463 (1-2), 116-122.
- Xin, Z. et al. (2011), PCBP2 enhances the antiviral activity of IFN- α against HCV by stabilizing the mRNA of STAT1 and STAT2. *PloS one*, 6(10), e25419.

7. Eskerrak eta oharrak

- Ikerkuntza lan hau honako proiektuen bitartez finantzatu da: Eusko Jaurlaritzako Osasun Saila (2015111068) eta *Sociedad Española de Diabetes* emandako dirulaguntza.

Gaixotasun autoimmuneen asoziatutako *RGS1* eremuko lncRNA baten karakterizazio funtzionala

Olazagoitia-Garmendia, Ane¹; Fernandez-Jimenez, Nora¹; Sebastian-delaCruz, Maialen¹; Bilbao, Jose Ramon^{1,3} eta Castellanos-Rubio, Ainara^{1,2,3}

¹Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV-EHU)-BioCruces Bizkaia Osasun Ikerketarako Institutoa, Leioa, ²IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbo. ³CIBERDEM, Madril
ane.olazagoitia@ehu.eus

Laburpena

Genome-wide association studies (GWAS) eta *RNA sequencing* (RNAseq) teknologiei esker gaixotasun autoimmuneekin lotutako gene eta mekanismo ugari aurkitu badira ere, asoziatutako aldaera (Single Nucleotide Polymorphism edo SNP) gehienak eremu ez kodetzailatan kokatzen direla ikusi da. Azken aldian RNA ez kodetzaila luzeak (lncRNA) zenbait prozesu biologikoetan duten garrantzia azpimarratu da eta gaixotasun askoren garapenarekin erlazionatu dira, gaixotasun autoimmuneak kasu. Lan honen helburua *RGS1* eremuan dagoen gaixotasun autoimmuneen asoziatutako rs2816316 SNParen karakterizazio funtzionala egitea izan da. Gure emaitzen arabera, SNParen inguruan dagoen eremuak *RGS1* genearen erregulazioan eragina du bertan aurkitzen den lncRNA nuklear baten bitartez.

Hitz gakoak: lncRNA, SNP, gene adierazpena, eQTL

Abstract

Genome-wide association studies (GWAS) and *RNA sequencing technology* (RNAseq) have helped in the detection of genes and genetic mechanisms involved in autoimmune diseases. However, the majority of associated variants reside in non-coding regions, which are mainly functionally uncharacterized. New evidences indicate that long non-coding RNAs (lncRNAs) play crucial roles in various biological processes and they have emerged as key regulatory molecules involved in the development of a wide range of diseases, including autoimmune disorders. The aim of this study was to functionally characterize the autoimmune disease associated rs2816316 SNP located in *RGS1* region. Our results suggest that the region around rs2816316 is involved in *RGS1* regulation, probably through a nearby nuclear lncRNA.

Keywords: lncRNAs, SNP, gene expression, eQTL.

1. Sarrera eta motibazioa

Erantzun immune egokia bermatzeko ezinbestekoa da gorputzak patogenoak eta berezko zelulak ondo bereiztea. Prozesu horrek huts egitean erantzun immune okerra gertatzen da, hantura kronikoa eta ehun osasuntsuen suntsipena eraginik. Egoera horrek gaixotasun autoimmuneak eta inflamatorioak sortzen ditu eta populazioaren %5ari eragiten dio (Cotsapas et al, 2011; Gutierrez-Arcelus et al, 2016).

Ikerketa desberdinek erakutsi dute gaixotasun autoimmuneak pairatzeko arriskuak ekarpen genetiko garrantzitsua duela, eta gainera, gaixotasun autoimmune desberdinek hainbat arrisku lokus partekatzen dute (Cotsapas et al, 2011; Gutierrez-Arcelus et al, 2016; Jonkers eta Wijmenga, 2017). Azken urteotako tekniken aurrerapenari esker GWAS eta ImmunoChip bezalako asoziazio ikerketak egin dira gaixotasun autoimmune askotan, eta haiekin zerikusia duten genomaren eremu eta nukleotido bakarrek aldaera (Single Nucleotide Polymorphism edo SNP) berriak atzeman dituzte. Gainera, eQTL (*expression quantitative trait locus*) hurbilketak egin dira asoziatutako SNP hauen efektu fenotipikoak zehaztu asmoz. Hala, ikerketa desberdinek asoziatutako SNPen aleloek inguruko geneen adierazpenean izan dezaketen eragina aztertu dute. Eta horrela, erantzun immunean parte hartzen duten gene eta mekanismo desberdinak identifikatu dira (Castellanos-Rubio eta Bilbao, 2018; de Haas et al, 2014; Jonkers eta Wijmenga, 2017; Lee et al, 2018).

Gaixotasun hauei asoziatutako geneen ezagutzan asko aurreratu den arren, SNP gehienek gaixotasunaren

garapenean nola eragiten duten ulertzeke dago oraindik. Alde batetik, gizakiok erantzun immune konplexua dugu; parte hartzen duten zelula desberdinek, geneen adierazpen aldaketek eta kanpo eragileek eragiten dituzten jokabide desberdinak ez dira guztiz ezagunak oraindik (Gutierrez-Arcelus et al, 2016). Horrez gain, gaixotasun konplexuei asoziatutako SNP gehienak genomaren eremu ez kodetzaileetan daudela ikusi da, eta zaila izaten da beraiei eragina identifikatzea. Bestalde, ikerketa desberdinek erakutsitakoaren arabera, eremu ez kodetzaileetan dauden SNPek eragin dezakete bai inguruko geneen edota bai beste kromosoma bateko geneen adierazpenean (Ricaño-Ponce et al., 2016). Hori guztia kontuan izanik, eremu ez kodetzailetako SNP asoziatuen funtzioak argitzea zaila bezain beharrezkoa den lana dugu gaixotasun horien inguruko ezagutza sakontzeko.

Egun, giza genoma ez kodetzailearen %70 inguru transkribatzen dela dakigu. Azken urteotan garatu den RNAREN sekuentziazio teknikari esker transkribatzen diren eremu berriak identifikatu dira (mRNA zein RNA ez kodetzaileak) (Castellanos-Rubio eta Bilbao, 2018; Mowel et al, 2018). Azken horien artean RNA luze ez kodetzaileak (long non-coding RNA edo lncRNA) dira ugariak eta askotan beren funtzioa ezezaguna izan arren, molekula horiek gaixotasunen garapenean izan dezaketen eraginak interes handia piztu du azken aldian (Mowel et al, 2018).

lncRNAk proteinarik kodetzen ez duten 200 nt baino luzeagoko RNA molekulak dira. Zenbait ikerketek erakutsi dutenez, lncRNAk garapenarekin, homeostasiarekin, aldaketa patofisiologikoekin edota erantzun immunearekin erlazionatuak daude, ekintza-mekanismo desberdinen bidez (de Haas et al, 2014). Izan ere, molekula horiek azkar eta zelula espezifiktasunez erantzun diezaiekete kanpo seinale desberdinei (Mowel et al, 2018). Gainera, lncRNAk transkripzioan zein transkripzioaren ostean erregula dezakete geneen adierazpena; zuzenean beste RNA, DNA edo proteinei lotuta edo bitartekari moduan jokatzuz (Chen et al, 2017; Mowel et al, 2018). Guzti horretaz gain, RNAREN eraldaketa desberdinek, deaminazio edota m6A eraldaketek kasu, elkarrekintza horiek baldintza ditzakete eta lncRNAren funtzioan eragin (Chen et al, 2017; Patil et al, 2018). Azkenik, gaixotasunekin asoziatutako SNP asko lncRNAren funtzioa erregulatzen egon daitezkeela ikusi da (Castellanos-Rubio et al, 2016; 2018). Hortaz, lncRNAren aniztasuna kontuan izanda eta asoziatutako SNPak molekula horien sekuentzietan agertzen direla ikusirik, gaixotasunen garapenean duten papera argitzeko esfortzuak egiten ari dira (gaixotasun autoimmuneak barne).

Sistema immuneko zelulek oso funtzio bereziak dituztela, kanpo seinaleei erantzuteko gai direla eta transkripzio faktoreek erregulatzen dituztela jakina den bitartean, ez da oso ezaguna lncRNAek erantzun immunean duten funtzioa. Azken urteotan lncRNA batzuk gaixotasun inflamatorioen aurrean babesa handitzen dutela ikusi da (Chen et al, 2017; Mowel et al, 2018) bai eta beste batzuk hantura edo autoimmunitatea garatzeko arriskua areagotzen dutela ere (Castellanos-Rubio et al, 2016; 2017; Huang et al, 2015; Santin et al, 2018; Zhang et al, 2017). Hortaz, gaur egun interes berezia dago lncRNA desberdinek inflamazioan eta erantzun immunean jotzen duten papera deskribatzeko eta gaixotasun konplexuei asoziatutako SNPek lncRNA horiengan duten eragina argitzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aipatu bezala, geroz eta adibide gehiago deskribatu dira non gaixotasun autoimmuneek eta hanturari asoziatutako SNPek lncRNA molekulengan eragiten duten, eta beren funtzioa aldatu eta gaixotasuna pairatzeko arriskua handitu dezakete. Ikusi den moduan, zenbait gaixotasun autoimmuneek arrisku lokus desberdinak partekatzen dituzte, eta askotan erantzun immunearekin edota hanturarekin erlazionatutako eremuak dira. Beraz, eskualde horietan dauden eta eremu ez kodetzaileetan kokatzen diren SNPak interes handikoak dira. Bertan aurkitzen diren elementu erregulatzaileak identifikatu eta beraiei funtzioa deskribatzeko informazio oso interesgarria emango baitu gaixotasun autoimmuneetan parte hartzen duten mekanismoak identifikatzeko.

Horregatik, *RGS1* genearen ondoan dagoen rs2816316 SNPa aztertzea izan da lan honen helburu nagusia. SNP hori eritasun zeliakoarekin (EZ) asoziatua dago gehien bat, baina esklerosi anizkoitza (EA) eta 1 motako diabetesarekin (DM1) erlazionatuta ere badago (Esposito et al, 2010; Hunt et al, 2008; Parkkola et

al, 2017; Smyth et al, 2008). Gainera, *RGS1* geneak T zelulen funtzioaren erregulazioan parte hartzen duela ikusi da eta zelula horiek gaixotasun autoimmune horietan paper garrantzitsua dute (Caballero-Franco et al, 2016; Gibbons et al, 2011).

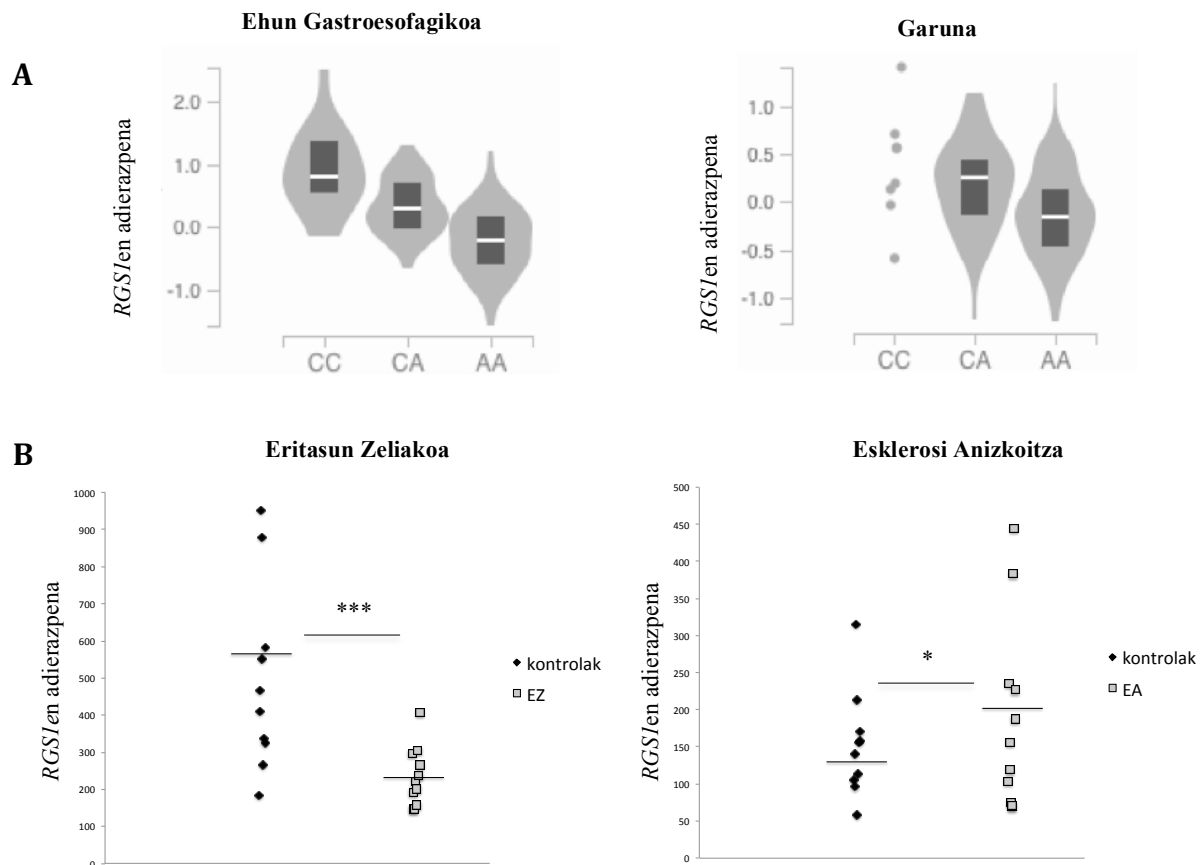
Beraz, lan honen helburua rs2816316 SNPa dagoen eremu genomikoaren karakterizazio funtzionala burutzea izan da, asoziaturiko gaixotasun autoimmunetan izan dezakeen eragina azaltzeko asmoz.

3. Ikerketaren muina

3.1. *RGS1* genearen adierazpena aldatua dago rs2816316 SNPari asoziaturiko gaixotasunetan

Goian aipatutako ikerketa desberdinek adierazi duten moduan *RGS1* eremua EZ, EA edota DM1 motako gaixotasun autoimmunekin asoziatua dago. Gainera EZak eta EAK rs2816316 SNPren arrisku aleloa (A aleloa) partekatzen dutela ere deskribatu da. Hortaz, lehenengo *GTEX* datu basean (<https://gtexportal.org/home/>) ikusi genuen SNP hau eQTL dela *RGS1* genearentzat bai ehun gastroesofagikoan (1.Irudia A, ezkerrean) eta baita garunean ere (1.Irudia A, eskubian). Hau da, genotipoak genearen adierazpenean eragiten duela ikusi daiteke. Ondoren, *GEO profile* datu basean (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=>) egindako bilaketari esker ikusi genuen *RGS1* genearen adierazpena gutxitua dagoela EZ gaixoen zelula immuneetan (Sanginetto et al, 2018) (1.Irudia B, ezkerrean). EA gaixoen kasuan aldiz, *GEO* on aurkitutako datuen arabera (Kempainen et al, 2011) *RGS1* genearen adierazpena emendatua dago kontrolekin alderatzean (1.Irudia B, eskubian).

1.irudia. *RGS1* genearen adierazpena. (A) *GTEX* datu basearen arabera *RGS1*en adierazpen maila rs2816316 SNPren genotipoaren arabera (CC, CA edota AA), ehun gastroesofagikoan (ezkerrean) eta garunean (eskuibian); **(B)** *GEO* datu basearen arabera *RGS1*en adierazpen maila EZ gaixo eta kontroletan (ezkerrean) eta EA gaixo eta kontroletan (eskuibian). *** $p < 0.001$ eta * $p < 0.05$ (t testa).

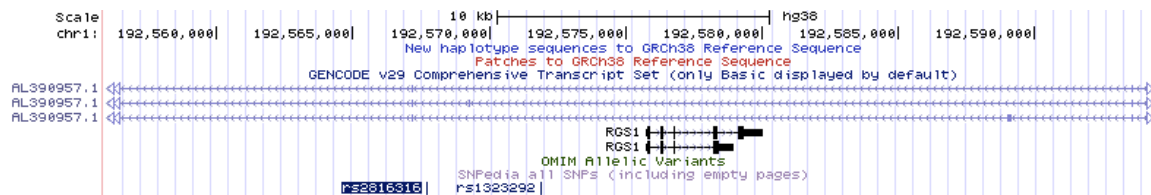


3.2. rs2816316 SNPa deskribatu gabeko lncRNA nuklear batean dago eta *RGS1* genearen erregulazioan eragin dezake

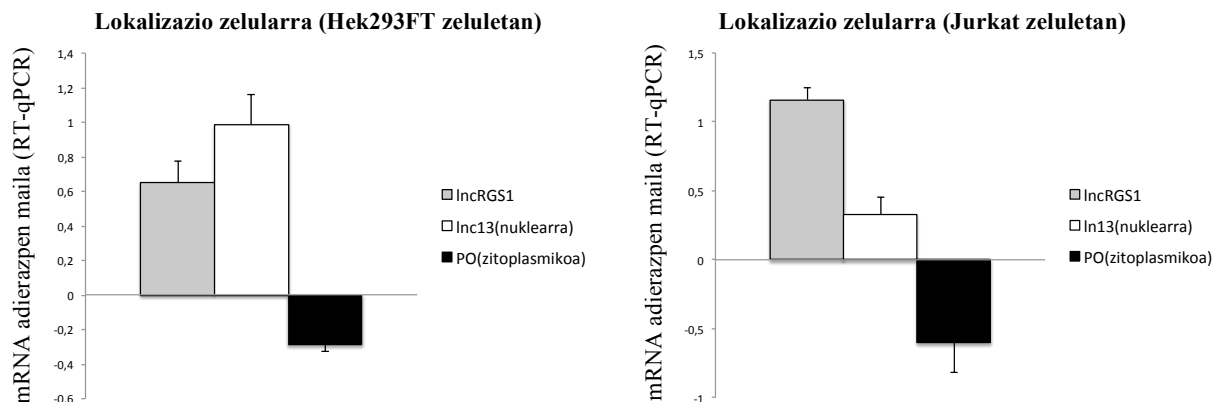
RGS1 genearen adierazpena asoziatutako gaixotasunetan aldatua dagoela ikusirik, rs2816316 SNPak izan dezaken efektua ikertzen saiatu ginen. Horretarako, UCSC genom bilatzailea erabiliz (<http://genome-euro.ucsc.edu>) SNP honen eremua aztertu genuen eta deskribatu gabeko lncRNA batentzat intronikoa dela ikusi genuen (2. Irudia A). LncRNA hau *RGS1* genearekiko alderantzizko transkritoa izanik, genearen adierazpena erregulatzen duen ikusi nahi izan genuen. Zelulen nukleoak banatu eta RT-qPCR teknikaz baliatuz lncRNA hau, hots, *lncRGS1*, gehien bat nukleoan adierazten dela ikusteko gai izan ginen lan honetan erabilitako lerro zelularretan (Hek293FT eta Jurkat T zelulak) (2. Irudia B). Emaita honek adierazten du lncRNA honen funtzioa adierazpen erregulatuak izan daitezkeela.

2. irudia. rs2816316 SNPa intronikoa da deskribatu gabeko lncRNA nuklear batentzat. (A) Erantzun immunearekin lotutako rs2816316 SNPa eta *RGS1* genea hartzen dituen eremuaren irudikapena UCSCn; **(B)** asoziatutako eremuan dagoen *lncRGS1*-en lokalizazio zelularren grafikoa Hek293FT eta Jurkat zeluletan, *lnc13* kontrol nuklearra eta *PO* kontrol zitoplasmikoa izanik.

A

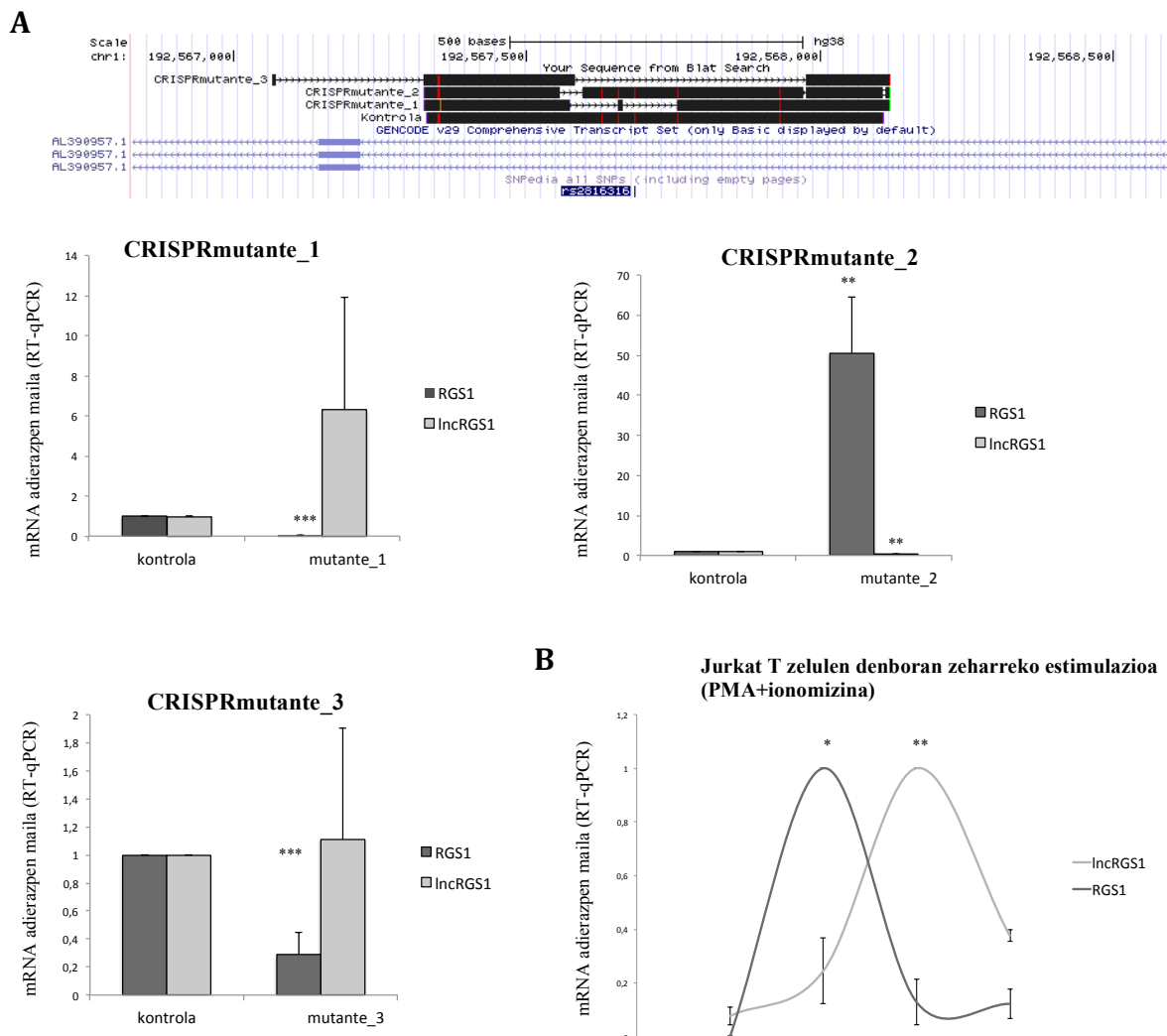


B



Hau ikusita, CRISPR-Cas9 bidez rs2816316 SNPa hartzen duen 400 nt inguruko eremuaren delezioa egin genuen eta Hek293FT zeluletan 3 mutante desberdin isolatzeko gai izan ginen (3. Irudia A, goian). Zelula mutante hauetan *lncRGS1* eta *RGS1* geneen adierazpenak aztertu genituen eta 3. irudian ikusi daitekeen moduan 3 mutanteen kasuan bi geneek aurkako joera azaltzen zuten (3. Irudia A, behean). Gainera, *RGS1* erantzun immunean T zelulen funtzioarekin erlazionatua izan denez, Jurkat T zelulak PMA eta ionomizinarekin tratatu genituen. Kasu honetan ere *lncRGS1* eta *RGS1* geneek aurkako joera adierazi zuten (3. Irudia B).

3.irudia. rs2816316 SNParen eremuaren karakterizazio funtzionala. (A) CRISPR-Cas9 teknika bidez lortutako mutanteen delezioen irudikapena (goian) eta *RGS1* eta *lncRGS1* geneen adierazpen mailak RT-qPCR bidez neurtuta (behean), kontrol bezala deleziorik gabeko Hek293FT zelulak erabili ziren, *** $p < 0.001$ eta ** $p < 0.01$ (t testa); (B) PMA eta ionomizinarekin estimulatutako 0h, 8h, 24h eta 48h-tan Jurkat T zeluletan *lncRGS1* eta *RGS1* geneen adierazpen aldaketak, irudikatutako puntuak gene bakoitzaren balio altuenarekiko normalizatu ziren ** $p < 0.01$ eta * $p < 0.05$ (t testa).



4. Ondorioak

Alde batetik gure emaitzek adierazten dute rs2816316 SNPa dagoen eremuak *RGS1*en adierazpenean eragina duela. Gainera, identifikatu dugun lncRNA nuklearra izateak eta *RGS1* genearen aurkako adierazpen joera aurkezteak (bai CRISPR-Cas9 bidezko delezioetan baita estimulazio esperimenduetan) pentsarazten digu lncRNA honek genearen adierazpenaren erregulazioan parte hartzen duela. Hortaz, asoziatutako SNPak lncRNA honen funtzioan eragin lezake eta *RGS1* genearen erregulazioa asaldatu. Gainera, ikusi dugu T zelulak kitzikatzean bi gene hauen adierazpenak aldatu egiten direla, erantzun immunean parte hartzen dutela iradokiz.

Horrez gain, T zelulen funtzioak garrantzia duen gaixotasun desberdinekin erlazionatu dira bai SNPa eta baita genea ere. Datu base desberdinak erabiliz ikusi dugun moduan, EZ eta EA gaixoen zelula immuneetan *RGS1* genearen adierazpena aldatua dago kontrolekin alderatzean. Gainera, gaixotasun hauetan kaltetzen diren ehunetan *RGS1*en adierazpenak genotipoarekin harremana duela dirudi GTExen

datuen arabera.

Guzti honekin ondorioztatu dezakegu rs2816316 SNPak bertan dagoen lncRNAREN funtzioan eragiten duela, hala *RGS1*en erregulazio okerra bultzatuz. *RGS1* adierazpen aldaketak T zelulen funtzioan eragin lezake erantzun immunea nahastuz, eta hala, EZ edota EA bezalako gaixotasun autoimmuneak garatzeko arriskua handitu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan lortutako emaitzek *RGS1* eta ondoan dagoen lncRNAk erantzun immunean paper garrantzitsua izan dezaketela adierazten dute. Seguruenik lncRNAk genearen adierazpenaren erregulazioan parte hartzen du eta erregulazio honen hausturak (rs2816316 SNParen edo gehiagoren genotipoak bultzatuta) T zelulen funtzioan eta gaixotasun autoimmuneen garapenean eragin lezake. Hala ere, mekanismo honen azterketa sakonagoa beharrezkoa dugu baieztapen hau egiteko. Alde batetik, lncRNAk *RGS1* genea zuzenki erregulatzen duen eta hala bada nola burutzen duen aztertu behar da (geneari zuzenean lotzen den, bitartekari moduan lan egiten duen, etab). Bestalde, orain arte ikusi ditugun azterketak, gaixoak eta kontrolak alderatzen dituzten lanak, odoleko zeluletan egin dira. Honek gene adierazpen mailan gertatzen denaren ideia bat eman diezaguke, baina gaixotasunean kaltetzen diren zeluletan bereziki zer gertatzen den ikustea izango litzateke hurrengo pausua. Gainera, *RGS1* genearen adierazpena neurtzeaz gain lncRNAREN adierazpena ere neurtzea oso garrantzitsua izango da.

6. Erreferentziak

- Caballero-Franco, C eta Kissler, S. (2016): The autoimmunity-associated gene *RGS1* affects the frequency of T follicular helper cells, *Genes and Immunity*, 17, 228-238.
- Castellanos-Rubio, A. et al (2016): A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease, *Science*, 352 (6281), 91-95.
- (2017): Cytoplasmic form of Carlr lncRNA facilitates inflammatory gene expression upon NF-kb activation, *J. Immunol.*, 199, 1-8.
- (2018): Profiling celiac disease-related transcriptional changes, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 336, 149-174.
- Chen, Y.G. et al (2017): Gene regulation in the immune system by long noncoding RNAs, *Nat. Immunol.*, 18 (9), 962-972.
- Cotsapas, C. et al (2011): Pervasive Sharing of Genetic Effects in Autoimmune Disease, *PLOS Genetics*, 7 (8), 1-8.
- de Haas, E. C. et al (2014): Immunogenetics of celiac disease, in S.D. Rampertab, G.E. Mullin (arg.), *Celiac Disease*, USA, 53-66.
- Esposito, F. et al (2010): IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and *RGS1* are novel multiple sclerosis loci. *Genes Immun.*, 11, 397-405.
- Gibbons, D.L. et al (2011): Regulator of G protein signalling-1 (*RGS1*) selectively regulates gut T cell trafficking and colitic potential, *J Immunol.*, 187 (5), 2067-2071.
- Gutierrez-Arcelus, M. et al (2016): Autoimmune diseases-connecting risk alleles with molecular traits of the immune system, *Nat. Rev. Genet.*, 17 (3), 160-174.
- Huang, W. et al (2015): DDX5 and its associated lncRNA Rmrp modulate TH17 cell effector functions, *Nature*, 28, 519-522.
- Hunt, K.A. et al (2008): Novel celiac disease genetic determinants related to the immune response, *Nat Genet.*, 40 (4), 395-402.
- Jonkers, I.H. eta Wijmenga, C. (2017): Context-specific effects of genetic variants associated with autoimmune disease, *Human Molecular Genetics*, 26 (2), 185-192.
- Kemppinen, A.K. et al (2011): Systematic review of genome-wide expression studies in multiple sclerosis, *BMJ Open*, 1 (1).
- Lee, P.H. et al (2018): Principles and methods of insilico prioritization of non-coding regulatory variants, *Hum. Genet.*, 137, 15-30.
- Mowel, W.K. et al (2018): Control of immune cell homeostasis and function by lncRNAs, *Trends Immunol.*, 39 (1).
- Parkkola, A. et al (2017): HLA and non-HLA genes and familial predisposition to autoimmune diseases in families with a child affected by type 1 diabetes, *PLoS ONE*, 12 (11).
- Patil, D.P. et al (2018): Reading m6A in the transcriptome: m6A-binding proteins, *Trends Cell Biol.*, 28 (2), 113-127.
- Ricaño-Ponce, I. et al. (2016): Refined mapping of autoimmune disease associated genetic variants with gene expression suggests an important role for non-coding RNAs, *J. Autoimmun.*, 68, 62-74.

Sangineto, M. et al (2018): Identification of peculiar gene expression profile in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of celiac patients on gluten free diet, *PLoS One*, 13 (5).

Santin, I. et al (2018): A celiac disease associated lncRNA named HCG14 regulates NOD1 expression in intestinal cells, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 67 (2), 225–231.

Smyth, D.J. et al (2008): Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease, *N Engl J Med*, 359, 2767-77.

Zhang, F. et al (2017): Linc-MAF-4 regulates Th1/Th2 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis by targeting MAF, *Faseb. J.*, 31 (2), 519–525.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau ISCIII(16/00258), ERDF-ek lagunduta “A way to make Europe”, EJSan-2018111086, EJ-2017111082 eta ACM ikerketa proiektuen bidez finantziatu da.

E2F7 proteinaren karakterizazioa DNAREN konponketa eta ezegonkortasun genomikoaren modulatzailerako gisa

Vallejo-Rodríguez, Jon¹; Mitxelena, Jone¹; Apraiz, Aintzane²; García-Santisteban, Iraia¹;
Fullaondo, Asier¹; Álvarez-Fernández, Monica³; Malumbres, Marcos³ eta Zubiaga Ana¹

¹Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia saila, UPV/EHU ²Biologia
zelularra eta Histologia saila, UPV/EHU ³Zatiketa zelularra eta Minbizi taldea,
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

jon.vallejo@ehu.eus

Laburpena

E2F7 proteinaren ekarpena tumoreen garapenean ez da oraindik guztiz zehaztua izan. Lan honetan E2F7k egonkortasun genomikoaren mantentzean parte hartzen duen gene multzo baten adierazpena erreprimitzen duela erakusten dugu erreplikazio urkilaren aurrerapena oztopatzen duten DNAREN kalteen aurrean. E2F7ren isilarazpenak 53BP1 fokoen eta aberrazio kromosomikoen murriztapena eragiten du *interstrand cross-link (ICL)* lesioen eragileak diren tratamenduen ostean. Azkenik, errekonbinazio-akastun zeluletan, E2F7ren azpiadierazpenak kimioterapiarekiko erresistentzia ematen duela iradokitzen duten frogak aurkezten ditugu. Hau guztia kontutan hartuz, gure datuek integritate genomikoaren mantenuan eta DNAREN konponketaren erregulazioan laguntzen duen E2F7ren menpeko programa transkripzional bat dagoela erakusten dute. Hitz gakoak: E2F7, DNAREN konponketa, egonkortasun genomikoa.

Abstract

The contribution of the atypical E2F7 to tumor development is still poorly defined. Here we show that E2F7 represses the expression of a set of genes involved in the maintenance of genomic stability, upon induction of DNA lesions that interfere with replication fork progression. Acute depletion of E2F7 leads to a reduction in 53BP1 and to fewer chromosomal aberrations following treatment with agents that cause interstrand cross-link (ICL) lesions but not upon ionizing radiation. Finally, we present evidence that downregulation of E2F7 confers an increased resistance to chemotherapy in recombination-deficient cells. Taken together, our results reveal an E2F7-dependent transcriptional program that contributes to the regulation of DNA repair and genomic integrity. Keywords: E2F7, DNA damage repair and genomic integrity.

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun herrialde garatuetan, minbizia da gaixotasunek sortutako heriotzen artean bigarren kausa. Minbizia oso erlazionatuta dago populazioak jasaten duen zahartze prozesuarekin eta urtero kasu gehiago diagnostikatzen dira. Minbizi ezberdinen ezaugarriak buruz gero eta gehiago dakigun arren, banakoen artean dauden ezberdintasunek zaila egiten dute gaixotasun honetarako tratamendu orokor bat garatzea. Horregatik, tratamendu egokiago bat lortzeko, funtsezkoa da tumorearen garapen eta mantentzean parte hartzen duten erregulatzailerako berrien identifikazioa.

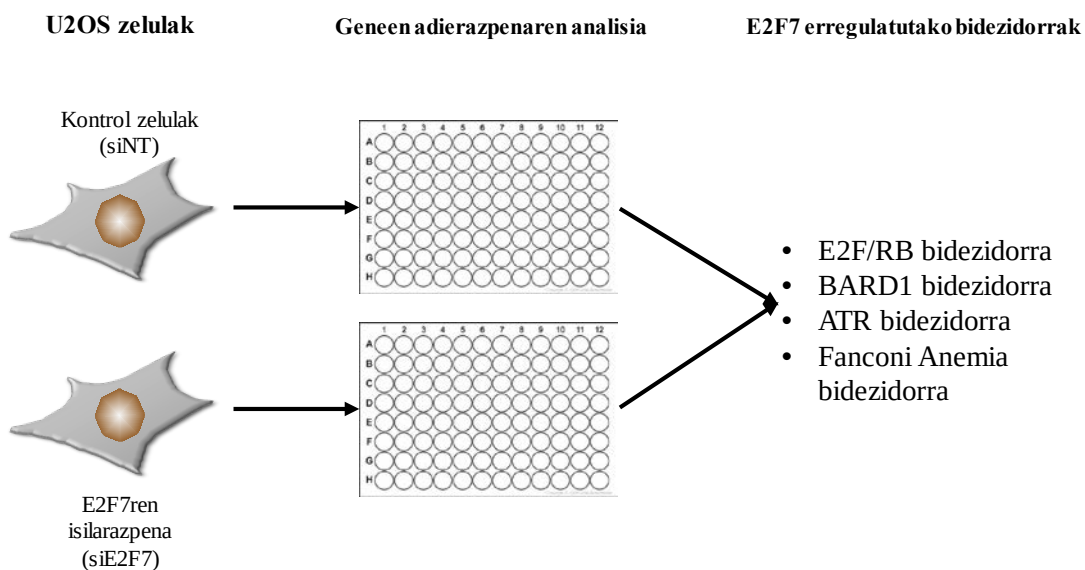
Ehun normal edo zelula talde normal batetik tumore kaltegarri bat garatzeko prozesu molekular ugari eman behar dira. Tumoreak oso heterogeneoak direla esan dugun arren, badira bere garapenean zehar lortzen dituzten ezaugarri komunak. Horiek Hanahan eta Weinberg-ek deskribatu zituzten 2000. urtean “Minbiziaren markak” bezala (“Hallmarks of Cancer”) definituz. 2011. urtean marka hauek berrikusiak izan ziren honako hauek definituz: mugagabeki erreplikatu, proliferazio seinaleak sustatu, inhibizio seinaleetatik ihes egin, heriotza zelularretik ihes egin, ehunen inbasioa eta metastasia, angiogenesisia indusitu, metabolismo energetikoa birprogramatu, immunitate sistemaren suntsipena ekidin, ezegonkortasun genomikoa eta mutazioak eta hantura sustatu. Marka hauen erregulazioaren ikerketa garrantzi handikoa izan da azken urteotan minbiziaren kontrako tratamenduak hobetzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Jakina da E2F transkripzio faktoreen familia minbiziaren zenbait ezaugarrien erregulatzailerak dela. E2F familiako proteinak bi taldetan banatzen dira: ohiko (E2F1, 2, 3a, 3b, 4, 5 eta 6) eta ezohiko E2Fak (E2F7 eta 8) (Morgunova et al., 2015) eta transkripzio faktore bezala, euren funtzio nagusia geneen erregulazio transkripzionala burutzean datza. Ohiko E2Fak sakonki aztertutak izan dira minbiziaren garapenarekin erlazionatuta. Adibidez, E2F1, 2 eta 3 proteinen gainadierazpenak ziklo zelularren azelerazioa dakar, tumorearen garapena bultzatuz (Johnson eta Schneider-Broussard, 1998). Gainera, E2F1ren gainadierazpena metastasi arrisku handiago batekin korrelazionatu da melanoma kasuetan (Alla et al., 2010). Bestalde E2F1en adierazpena heriotza zelularren erregulazioarekin erlazionatu da baita ere (Ginsberg, 2002). Bestalde, ezohiko E2F proteinen papera tumoreen garapenean ez da hain sakonki aztertua izan.

Minbiziaren garapenean ezohiko E2F proteinen funtzioa aztertzeko gure taldeak E2F7 proteina hautatu zuen osteosarkoma modelo batean. E2F7ren adierazpena isilarazita duten eta isilarazi gabeko U2OS zelula populazioetan estrategia transkriptomiko bat jarraitu zen bi baldintza hauen arteko geneen adierazpenean dauden desberdintasunak neurtzeko. Honela, E2F7k, transkripzio faktore bezala, erregulatutako geneen identifikazioa lortu zen bere funtzioa hobeto karakterizatuz.

1. irudia. E2F7 isilarazita eta E2F7 isilarazigabeko zelulen konparaketa transkriptomikoa. Gene ezberdinen taldekatze funtzionala DAVID tresna bioinformatikoarekin burutu zen.



Esperimentuaren datuak analizatuz, E2F7k erregulatutako zenbait bidezidor identifikatu ziren. Lehenik eta behin E2F/RB bidezidorra identifikatu zen. Deskribatutakoaren arabera, E2Fak beraie artean erregulatzen dira, eta beraz emaitza hau esperimentuaren balidazio gisa hartu genuen. E2F7k erregulatutako beste bidezidorren artean DNAREN konponketarekin zerikusia duten hiru identifikatu ziren: BARD1 bidezidorra, ATR bidezidorra eta Fanconi Anemiaren bidezidorra. Hauetatik Fanconi Anemiaren bidezidorra aukeratu genuen azterketa sakonago bat burutzeko tumoreen garapenean duen garrantzia dela eta. Bidezidor honek tratamendu kimioterapikoak sortzen dituzten aduktuen (ICL edo *Interstrand crosslink* deiturikoak) konponketa gauzatzen du errekonbinazio homologoen bitartez (Wang eta Gautier, 2010).

2.1. Helburua

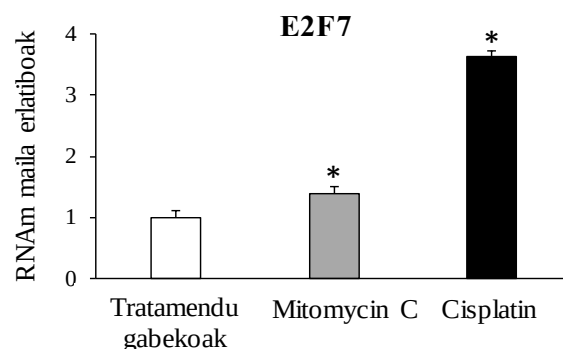
Lan honek E2F7k tumoreen garapenean duen funtzioan sakontzea dauka helburu nagusizat. Bereziki E2F7k DNAREN konponketan izan ahal duen funtzioan tratamendu kimioterapikoen ostean Fanconi Anemia bidezidorra erregulatuz.

3. Ikerketaren muina

3.1. E2F7ren erregulazioa tratamendu kimioterapikoen ostean

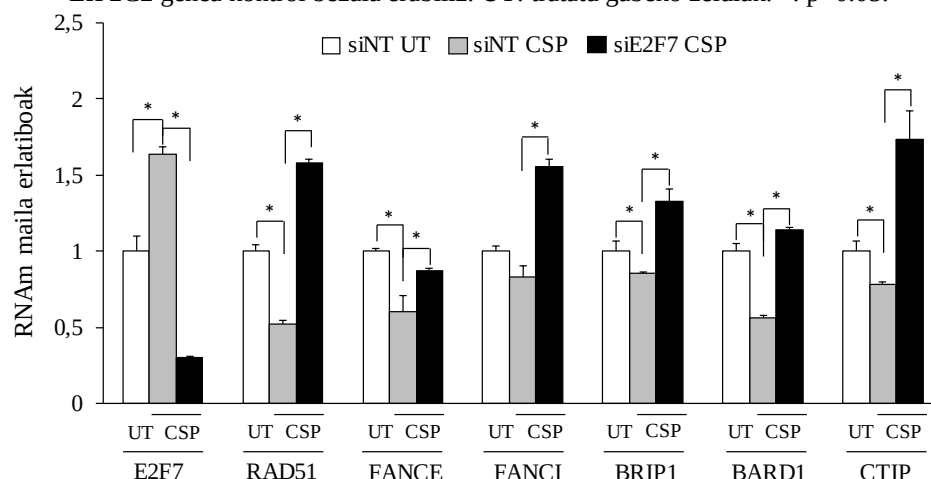
Tratamendu kimioterapikoen ostean E2F7ren funtzioa aztertzeko, lehenengo eta behin E2F7ren adierazpena aztertu genuen *Mitomycin C* (MMC) eta *Cisplatin* (CSP) konposatuekin trataturiko U2OS zeluletan. E2F7ren adierazpena areagotuta zegoen bai MMC, bai CSP tratamenduen ostean (2. irudia). Emaiza honek E2F7ren funtzio ezezagun bat iradoki zuen tratamendu hauek DNAn eragindako kaltearen aurrean.

2. irudia. E2F7ren gainadierazpena tratamendu kimioterapikoen aurrean. U2OS asinkronoak 250 Nm MMC eta 8 μ M CSPekin tratatuak izan ziren 24 orduz. Azkenik, E2F7ren adierazpena RT-qPCRren bidez neurtu zen EIF2C2 genea kontrol bezala erabiliz. *: $p < 0.05$.



E2F7ren funtzio hau hobeto deskribatzeko, analisi transkriptomikoan identifikatutako geneen adierazpena aztertu genuen CSP tratamenduarekin. Gene hauek DNAn konponketan parte hartzen duten proteinak kodetzen dituzte. Bereziki Fanconi anemiaren bidezidorraren geneak aztertu genituen (FANCE, FANCI eta BRIP1) baina baita beste konponketa geneak ere (RAD51, BARD1 eta CTIP). Gene multzo hauen adierazpena gutxিতuta zegoen tratamenduaren ostean siNT UT zelulak (tratatu eta isilarazi gabeak) eta siNT CSP zelulak (isilarazi gabeak baina tratatuak) konparatuz (3. irudia). Berriz, E2F7 isilaraztean tratatutako zeluletan (siE2F7 CSP), aztertutako gene guztien adierazpena areagotzen zen E2F7ren falta zela eta (3. irudia). Beraz, ondorioztatu genuen tratamendu kimioterapikoak E2F7ren igoera bat eragiten zuela eta igoera honek DNAn konponketan garrantzitsuak diren geneen adierazpena gutxitzen zuela, E2F7 gene hauen adierazpenaren errepresioegilea bezala identifikatuz.

3. irudia. E2F7k DNA konponketa geneen errepresioa burutzen du tratamendu kimioterapikoen aurrean. U2OS asinkronoak siNT eta siE2F7rekin transfektatuta izan ziren. Gero, 8 μ M CSPekin tratatuak izan ziren 24 orduz. Azkenik, aztertutako geneen adierazpena RT-qPCRren bidez neurtu zen EIF2C2 genea kontrol bezala erabiliz. UT: tratatu gabeko zelulak. *: $p < 0.05$.



3.2. E2F7ren funtzioa DNAREN konponketan tratamendu kimioterapikoen ostean

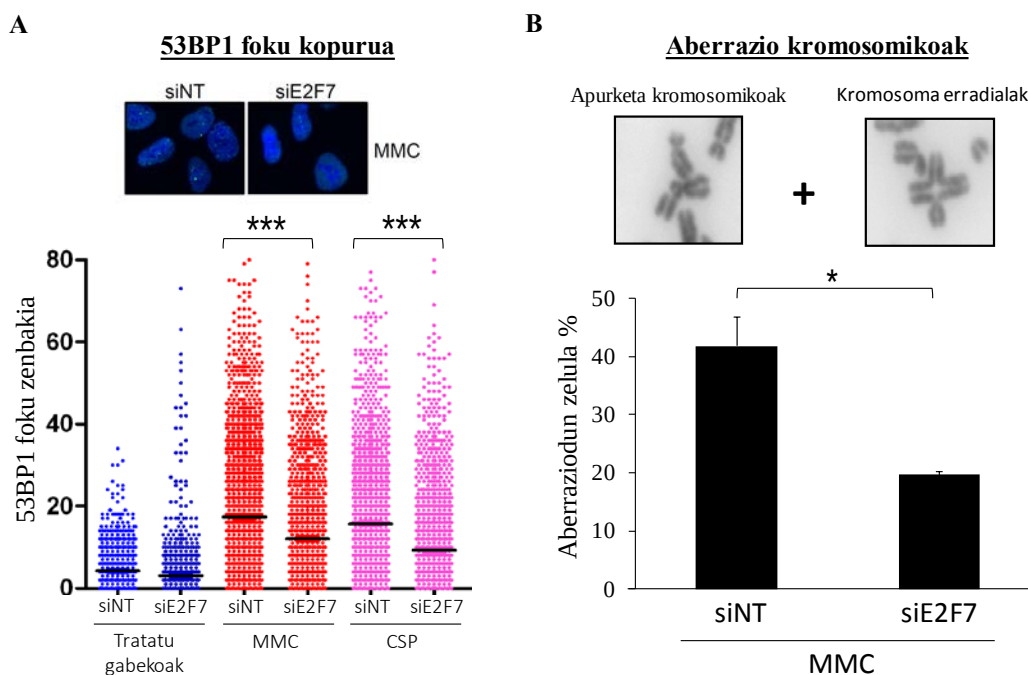
Ikusi dugu E2F7k DNAREN konponketa geneen adierazpena erregulatzen duela. Jarraian, E2F7k DNAREN konponketa prozesua bera erregulatzen duen ala ez jakin nahi izan genuen. Galdera hau erantzuteko, DNAREN konponketaren bi markatzaile analizatu genituen.

Alde batetik 53BP1 proteinaren fokuak aztertu genituen. 53BP1 proteina DNAREN konponketa prozesuan konponketa lekuetan lokalizatzen den proteina gako bat da. Ikusi genuen MMC eta CSP tratamenduan ostean, 53BP1 fokuen kopurua areagotu egiten zela (4A. irudia). Berriz, E2F7ren isilarazpenak foku hauen kopurua txikitzen zuen MMC eta CSPrekin tratatutako zeluletan (4A. irudia), konponketa handiago bat iradokiz. Bestalde, aberrazio kromosomikoak aztertu genituen; bai apurketa kromosomikoak, bai kromosoma erradialak (4B. irudia). Aberrazio kromosomiko hauek ohikoak dira ICL edo aduktuak sortzen dituzten tratamenduen ostean. Ikus dezakegu MMC tratamenduaren ostean zelulen %40ak mota bateko edo besteko aberrazio kromosomikoren bat aurkeztzen zutela (4B. irudia). Berriz, E2F7ren isilarazpenak, ehuneko hau erdira gutxitu egiten zuen (4B. irudia).

4. irudia. E2F7ren isilarazpenak foku kopurua eta aberrazio kromosomikoak murriztapen ditu.(A)

E2F7ren adierazpena isilarazita duten (siE2F7) eta isilarazi gabeko (siNT) U2OS zelulak CSP eta MMCekin tratatu ziren. 24 ordu eta gero, 53BP1en aurkako antigorputz espezifiko batekin tindatu ziren eta foku kopurua zenbatu zen. (B) E2F7ren adierazpena isilarazita duten eta isilarazi gabeko U2OS zelulak MMCekin tratatu ziren. 24 ordu eta gero “metaphase spread” protokoloa jarraitu zen aberrazio kromosomikoak mikroskopiaz aztertzeko.

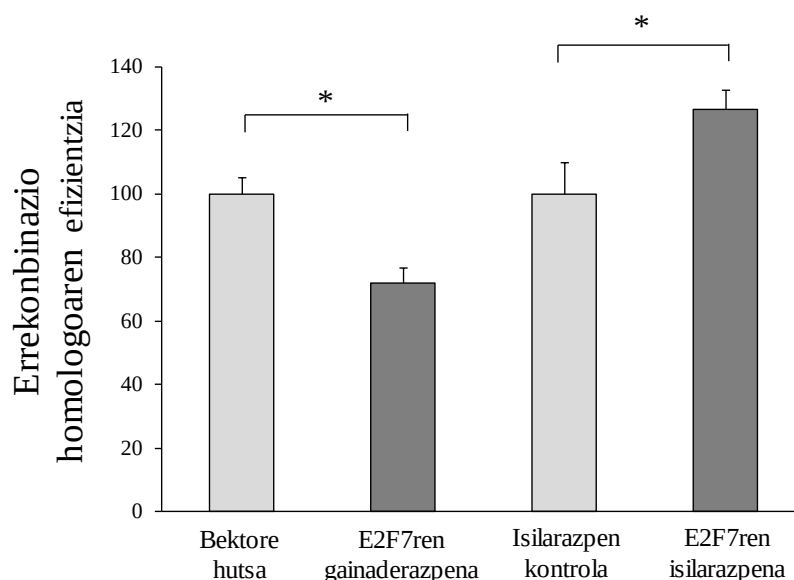
*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$



Bi emaitza hauek iradoki zuten E2F7ren isilarazpenak zelulen DNAREN konponketa gaitasuna areagotzen duela, beraz E2F7k konponketa hau erreprimitzen du. Gure hurrengo galdera E2F7k konponketa prozesuaren ze pausoa daukan efektua izan zen. Sarreran esan dugun bezala, ICL edo aduktu hauen konponketarako Fanconi Anemiaren bidezidorra erabiltzen da, eta bidezidor honen azken pausua, eta garrantzitsuenetarikoa, errekonbinazio homologoa (EH) burutzea da. Beraz, E2F7k errekonbinazio homologoa izan dezakeen efektua aztertzeko esperimentu bat proposatu genuen.

Errekonbinazio homologoa aztertzeko fluoreszentsian oinarritutako sistema bat erabili genuen, DR-GFP sistema. Sistema honekin, errekonbinazio homologoa zuzen burutu duen zelula bat, zelula fluoreszente bat bezala detekta dezakegu. DR-GFP sistema erabiltza ikusi genuen E2F7ren gainadierazpenak errekonbinazio homologoaren efizientzia jaisten zuela (5. irudia). Berriz, E2F7ren isilarazpenak, prozesu honen efizientzia areagotzen zuen. Emaita hauekin ondorioztatu dezakegu E2F7k errekonbinazio homologoa erreprimitzen duela.

5. irudia. E2F7k errekonbinazio homologoa erreprimitzen du. DR-GFP sistema duten U2OS zelulak bektore hutsa eta E2F7ren gainadierazpenaren bektorearekin transsektatu ziren. Bestalde, beste zelula batzuk isilarazpen kontrolarekin eta E2F7ren isilarazpenarekin transfektatu ziren. GFP positiboak ziren zelulen kopurua fluxu zitometria z neurtu ziren errekonbinazio homologoaren efizientzia neurtuz. *: $p < 0.05$.



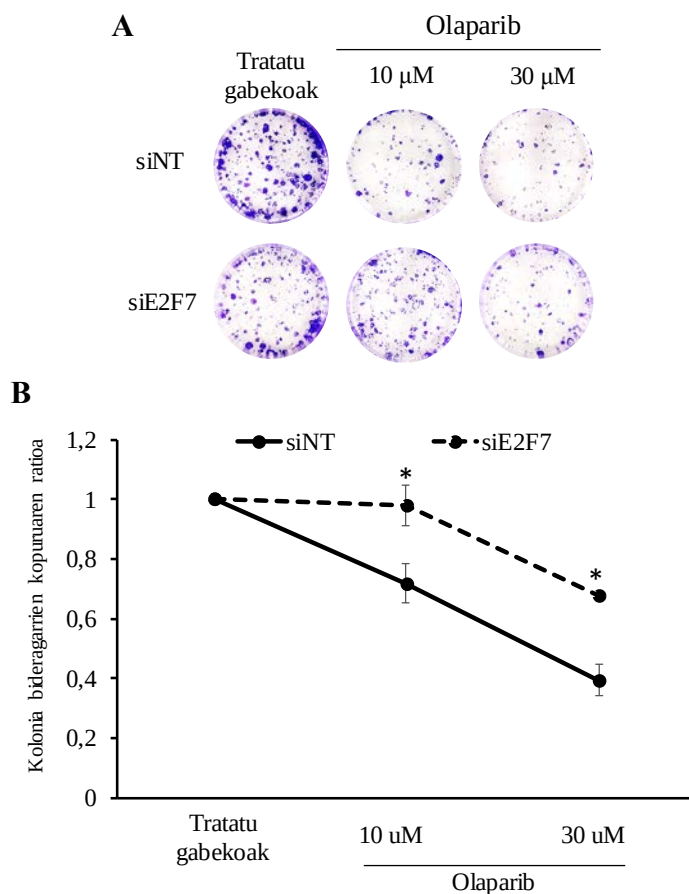
3.3. E2F7ren funtzioa egonkortasun genomikoan

Jakina da errekonbinazio homologoaren prozesuko akatsek ezegonkortasun genomikoa eragiten dutela, azken hau tumoreen garapenerako beharrezkoa den markatzaileetarikoa izanik. Egoera hau ohikoa da bularreko minbizi kasuen BRCA2 genearen mutazioak direla eta. Kasu hauetan, BRCA2 aktibo ez dagoenez, DNAREN kaltea PARP1 bidezidorraren bitartez konpontzen da. Beraz, BRCA2-defizienteak diren zelula hauek PARP1en inhibitzaileekiko oso sentikorrak dira (Lord & Ashworth, 2017).

E2F7k errekonbinazio homologoan eragiten duen errepresioa ikusita, BRCA2rako defizienteak diren zeluletan E2F7 isilaraziz gero, zelula hauek PARP1en inhibitzaileen aurrean erresistenteagoak diren jakin nahi izan genuen.

Capan-1 zelulak erabili genituen BRCA2ren defizientzia daramaten zelula modelo gisa (McCabe et al., 2005) eta ikusi genuen entsegu klonogeniko bat erabiliz, zelula hauek sentikorrak direla Olaparib (PARP1en inhibitzailea) kontzentrazio gorakorretara (6. irudia. Etenik gabeko marra). Berriz, E2F7ren isilarazpenak sentikortasun hau gutxitzen zuen kolonia tratamenduaren ostean kopurua areagotuz (6. irudia). Beraz, esan dezakegu, E2F7ren isilarazpenak zelula hauei PARP1en inhibizioaren aurrean erresistentzia ematen diela.

6. irudia. E2F7ren isilarazpenak egonkortasun genomikoa bermatzen du BRCA2-defizienteak diren zeluletan. Entsegu klonogenikoak burutu ziren siNT eta siE2F7rekin transkeftatutako Capan-1 zeluletan. Zelula hauek 10 μ M eta 30 μ M Olaparibaz tratatu ziren. *: $p<0.05$.



4. Ondorioak

E2F7k, DNAREN kaltearen ondoren, konponketa geneak erreprimitzen dituela ikusi dugu eta beraz, E2F7k DNAREN konponketa prozesua erreprimitzen duela ondoriozta dezakegu, zehazki, errekonbinazio homologoa. Gainera, E2F7ren ausentziak, errekonbinazio homologo ezegokia burutzen duten zeluletan, egonkortasun genomikoa ziurtatuko luke, kimioterapiaren aurreko erresistentzia areagotuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honek E2F7ren funtzio berri bat erakusten du DNAREN konponketaren erregulatzaile bezala tratamendu kimioterapikoen aurrean. Aurkikuntza berri honek zenbait erronka berri planteatzen ditu.

Alde batetik oso interesgarria izango litzateke, tratamendu hauen aurrean, E2F7ren lokalizazioa aztertzea. DNAREN konponketarako oso garrantzitsua da proteinen kokapen espaziala, beraz aztertzeke dago ea E2F7k konponketa proteina hauekin kolokalizatzen duen ala ez.

Beste aldetik oso interesgarria izango litzateke deskribatutako efektu hau ziklo zelularrean aztertzea.

6. Erreferentziak

- Alla, V., Engelmann, D., Niemetz, A., Pahnke, J., Schmidt, A., Kunz, M., ... Pützer, B. M. (2010). E2F1 in Melanoma Progression and Metastasis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(2), 127–133.
- Ginsberg, D. (2002). E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Letters*, 529(1), 122–5.
- Johnson, D. G., & Schneider-Broussard, R. (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 3, d447-8.
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2017). PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, 355(6330), 1152–1158.
- McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Martin, N. M. B., Smith, G. C. M., & Ashworth, A. (2005). BRCA2-deficient CAPAN-1 cells are extremely sensitive to the inhibition of Poly (ADP-Ribose) polymerase: an issue of potency. *Cancer Biology & Therapy*, 4(9), 934–6.
- Morgunova, E., Yin, Y., Jolma, A., Dave, K., Schmierer, B., Popov, A., ... Taipale, J. (2015). Structural insights into the DNA-binding specificity of E2F family transcription factors. *Nature Communications*, 6(1), 10050.
- Wang, L. C., & Gautier, J. (2010). The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(5), 424–39.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honen emaitzak Jon Vallejo-Rodríguez-en tesi doktoralaren ondorio dira. Jon Vallejo-Rodríguezek UPV/EHU-ko diru laguntza predoktorala jaso du (PIF 2014). Ana María Zubiagak Espainiako Jaurlaritzako (Ministerio de Ciencia e Innovación SAF2012-33551 and SAF2015-67562-R) eta UPV/EHU-ko (UFI11/20) diru laguntzak jaso ditu.

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 dinamikan 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 dinamikan 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 aztertu 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 ultraegituraren 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 hartzailerik (CB₁-KO; ingeleseko CB₁-*knock-out*).

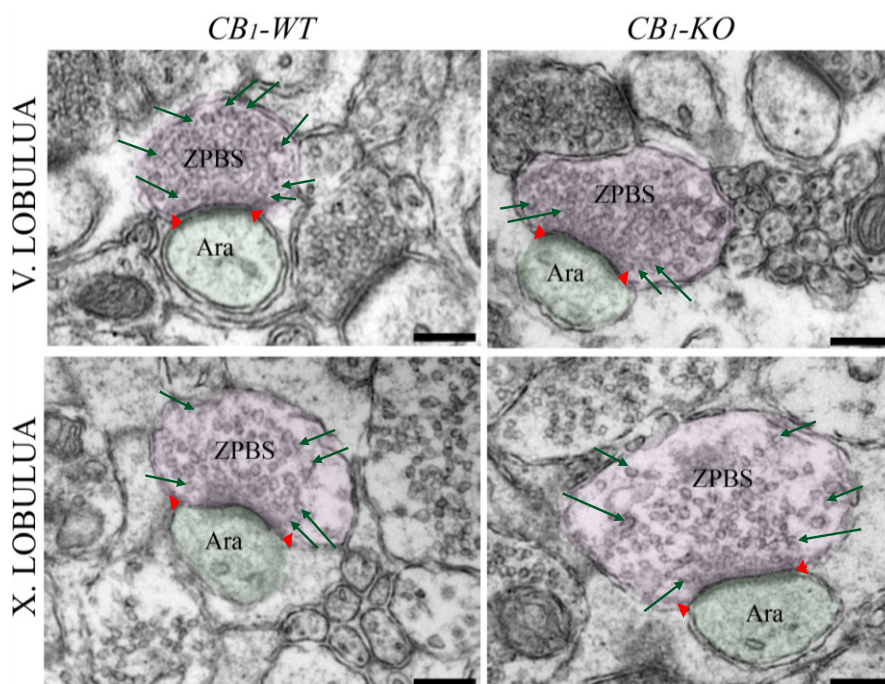
Sinapsiaren eremu aktiboaren hurrentasunean dauden besikulen kopurua zenbatzeko erabilitako irizpideak honako hauek izan ziren: aztertutako ZPBSak zeharka moztutakoak ziren eta ez zuten mitokondriarik eremu aktiboan; eremu aktibo honen arabera lerrokatu ziren ZPBSak. Sinapsiaren goiko aldean kokatutako 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-WTekin 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-WTekin. 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-KOek CB₁-WTek 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-KOen lobulu biek CB₁-WTekoek 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-KOen X. lobuluan besikula kopurua txikiagoa dela sinapsiaren hurbiltasunetik nabaria den arren, CB₁-WTen patroia berbera jarraitzen du eta animalia bietan, urruneko aldeko tartean, besikulak desagertu egiten dira, sinapsitik 45-60 nm-tara. CB₁-KOen V. lobuluan, aldiz, besikulak nahiz eta sinapsiaren hurbiltasunetik egon badauden, horiek bat batean murrizten dira sinapsitik 30 nm-tara (2. irudia).

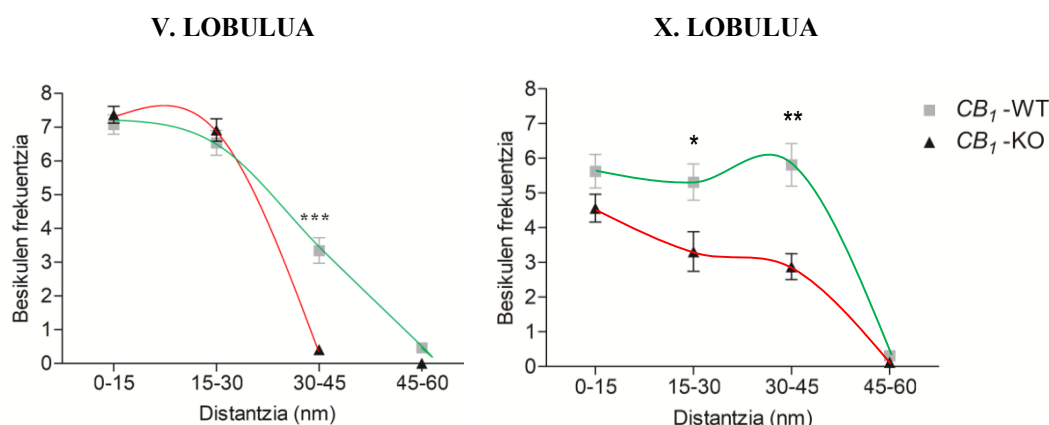
1. irudia. *CB₁*-WT eta *CB₁*-KO sagu helduen garuntxo-bermisko V. eta X. lobuluen mikroskopia elektroniko argazkiak. Nabaritu desberdintasunak ZPBSen tamainan, sinapsiaren luzeran eta besikulen banaketan. Gezi berdeak, besikulak adierazten dituzte. Gezi-buru gorriek, sinapsiaren luzera mugatzen dute. ZPBS, zuntz paraleloen bukaera sinaptikoa; Ara, arantza. Eskala-barrak: 0.250 μm .



1. taula: *CB₁*-KOen eta jatorrizko animalien garuntxoaren V. eta X. lobuluetako ZPBSetan aztertutako parametroen alderaketa.

Aztertutako parametroa	<i>CB₁</i> -WT V. lobulua	<i>CB₁</i> -KO V. lobulua	<i>CB₁</i> -WT X. lobulua	<i>CB₁</i> -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 basalekiko 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 egokitzapenak 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 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).

CB₁ hartzaile astrozitikoa mikroskopio elektronikoko prestakinetan detektatzeko markatzaile astrogialak: GFAP vs GLAST

Achicallende, Svein^{1,2}; Bonilla-Del Río, Itziar^{1,2}; Terradillos, Itziar^{1,2};
Egaña, Jon^{1,2}; Rico, Irantzu^{1,2}; Buceta, Ianire^{1,2}; Puente, Nagore^{1,2};
Elezgarai, Izaskun^{1,2}; Gerrikagoitia, Inmaculada^{1,2}; Grandes, Pedro^{1,2,3}

¹Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU),

²Achucarro Neurozientzien Euskal Zentroa, UPV/EHUko Zientzia Parkea

³Division of Medical Sciences, University of Victoria, Viktoria, BC, Kanada.

svein.achicallende@ehu.eus

Laburpena

Azken hamarkadetan burutu diren hainbat lanek aditzera eman dutenez, astrozitoak, neuronak euskarri estrukturalaz hornitzen dituzten zelula pasibo izatetik urrun, garuneko ezinbesteko elementuak dira. Gainera, hainbat hartzaile adierazten dituzte beraien mintzean, funtzio sinaptikoan eginkizun garrantzitsua duten zelula bezala nabarmenduz, “Sinapsi Tripartitako” partaide aktiboak direlarik. Hartzaile horien kokapena aztertzeke mikroskopio elektronikorako immunohistokimika bikoitza erabiltzen da, astrozitoak markatzeko zelula mota honetan bakarrik adierazten den GFAP zitoeskeletoko proteinaren aurkako antigorputzak erabiliz. Hala ere, GFAParen natura harikara dela eta, astrozitoen gorputz eta adarkadura nagusietara mugatzen da, astrozitoen morfologiaren irudi murriztu bat emanez. Lan honetan, GLAST glutamato garraiatzailea proposatu nahi da mikroskopio elektronikoko teknikan adierazle astrogial gisa erabiltzeko, eta astrozitoetan adierazten den CB₁ hartzaile endokannabinoidaren adibidearekin frogatzen da honen erabilerak dakartzan onurak.

Hitz gakoak: neurozientziak, astrozito, sistema endokannabinoida, GFAP, GLAST, mikroskopio elektronikoa

Abstract

Far from being merely passive cells providing structural support to neurons, astrocytes are now viewed as crucial active and dynamic elements of the brain circuitry. They express functional neurotransmitter receptors, being important active elements of the “Tripartite Synapses”. Using antibodies against GFAP to label astrocytes in a double immunocytochemistry for electron microscopy is the main technique used to decipher the exact localization of those astroglial receptors. However, as GFAP is a cytoskeletal protein assembled in intermediate filament packets, GFAP immunostaining is limited to the core in the main radial processes of the astrocyte, providing us a restricted morphology of astrocytes. In this work, GLAST glutamate transporter is proposed to use as glial marker in electron microscopy preparations, and the advantages that its use represents, is proved with the example of astrocytic CB₁ receptor detection.

Keywords: neuroscience, astrocyte, endocannabinoid system, GFAP, GLAST, electron microscopy

1. Sarrera eta motibazioa

Glia zelulak gizakien garuneko zelula mota ugariak dira, horietatik gehiengoa astrozitoak dira. Astrozitoak, urteetan zehar, neuronen elikaduraz eta euskarri estrukturalaz arduratzen ziren zelula pasiboak zirela uste izan da. Izan ere, perizitoekin batera hesi hematoentzefalikoaren ezinbesteko partaide dira, odol-hodietako egiturekin duten lotura estuari esker, odol-fluxutik diharduten molekulak aukeratuz eta garraiatuz, neuronei elikagaiak ematen baitizkiete (Abbott et al., 2006).

Hala ere, azken hamarkadetan egin diren lanei esker ikusi da, astrozitoak garuneko ezinbesteko elementuak direla, zeinek garun osasuntsu bateko hainbat oinarritzko prozesu fisiologikotan parte hartzen duten. Gaur egun, glia zelula hauek burmuin zirkuitoko funtsezko elementu aktibo eta dinamikotzat hartzen dira: hartzaileen garraioan, ioi eta metabolito energetikoen homeostasiaren kontrolean eta neurotransmisoreen garbiketan parte hartzen dute.

Gainera, funtzio sinaptikoan eginkizun garrantzitsua duten zelula bezala nabarmentzen ari dira, “Sinapsi Tripartitako” partaide aktiboak direlarik (Araque et al., 1999).

Astrozitoek, sinapsi eta neurona, beste glia zelula, eta garuneko odol-hodietako egiturekin kontaktu fisiko estua dute, eta inguruko aktibitate neuronalaren antzematea ahalbidetzen dieten hainbat hartzaile funtzional adierazten dituzte. Hartzaile hauen aktibazioak aktibitate sinaptikoa, odol-fluxua edo metabolismoa eraldatu dezakete gliotransmisioaren bidez. Hainbat patologiatan ikusi denez, garunean kalte bat izanez gero, hartzaile hauen adierazpena aldatzen da, eta gaixotasun edo infekzioen presentzian oso zelula aktiboak bihurtzen dira astrozitoak.

Glia zelula hauek ez dira elektrikoki kitzikagarriak, hau da, ez dute ekintza potentzialik izateko gaitasunik. Hala ere, kanpo seinale batek hartzaile astrozitikoren bat aktibatzen duenean, kaltzio igoera bat eragiten du astrozitoaren zitoplasman (kitzikapen kimikoa deritzona), eta ondorioz gliotransmisore izeneko molekulak askatuz, garuneko aktibitatean eragin dezakete (Harada et al., 2016). Gainera, astrozitoen adarkadurak gainjartzen ez diren arren, beraien artean Gap loturen bidez kontaktuan daude, eta kaltzioaren igoera hori sare astroglialean zehar hedatu daiteke (kaltzio olatua), distantzia handiago batera dauden sinapsien aktibitatean eraginez (Gómez-Gonzalo et al., 2014).

Astrozitoek adieraz ditzaketen hartzaile horien artean, endokannabinoiden sistemako (EKS) hartzaile nagusia, CB₁ hartzailea dago (Oliveira da Cruz et al., 2016). Endokannabinoiden sistemaren funtzio nagusia hainbat prozesu fisiologikoren modulazioa da, bai nerbio sistema zentralean, bai eta immune sistema, bihotz-hodietako sistema, sistema endokrino eta energia metabolismoan ere. EKSa hartzaile endokannabinoiden eta hauei lotzen zaizkien estekatzaile endogenoak osatuta dago, baita sintesi eta degradazioan diharduten entzimez, eta hartzaile-estekatzaile arteko interakzioaren ondorioz ekoizten diren proteina eta hauei erlaxatutako bidezidorez (De Petrocellis et al., 2004).

CB₁ hartzailea astrozitoetan adierazten dela egiaztatzeaz gain, bere aktibitateak ondorio garrantzitsuak dakartzala frogatu izan da (Metna-Laurent eta Marsicano, 2014). Elektrofisiologia tekniken bidez ikusi da CB₁ astrozitikoa aktibatzean, EKSari esker burutzen den bigarren mailako modulazio sinaptiko bat ematen dela. Sinapsi bat ematean askatzen diren endokannabinoiden astrozitoetako CB₁ hartzailea aktibatzean, astrozitoen barneko kaltzio kontzentrazioa emendatzen da, eta gliotransmisoreak askatzen dira. Gliotransmisore hauek hurbileko sinapsietan eragiteaz gain, urruneko sinapsietara ere irits daitezke (kaltzio olatuei esker beste astrozito batzuk aktibatzen badira), eta ondorioz sare astro-neuronalaren erregulazio zabalago bat ematen da (Gómez-Gonzalo et al., 2014, Navarrete et al., 2014). Gainera, gure ikerketa taldeak parte hartu zuen arinagoko ikerketa batzuetan ikusi genuen, hipokanpoko CA1ean dauden astrozitoen (eta ez neuronen) CB₁ hartzailearen aktibazioa, ezinbestekoa dela kannabinoide exogenoekiko esposizio baten ondorioz *in vivo* ematen den laneko memoriaren aldaketan (Han et al., 2012).

EKSak astrozitoetan duen funtzioa kontuan izanik, ezinbestekoa dela uste dugu glia zelula hauetan CB₁ hartzailearen adierazpena aztertzea: hartzailearen adierazpen osoaren zein zati den astrozitikoa, eta sinapsi mota ezberdinen inguruan nola kokatua dagoen aztertzea.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Mikroskopia elektronikorako immunourre metodoa, hartzaile ezberdinen kokapen zehatza aztertzeko erabiltzen den teknika immunohistokimiko nagusienetako bat da. Teknika honi esker aztertutako proteina, honen aurkako antigorputzak erabiliz, metal partikula batez markatua agertzen da. Ehunaren handipen handiko ultramikrografiak atera eta gure intereseko proteinaren distribuzioa azter daiteke.

Ultramikrografietan sinapsi ezberdinak bereiz daitezke (kitzikatzaile eta inhibitzaile), baita osatzen dituzten atal ezberdinak (pre- eta post-sinapsia). Era berean, hainbat organulu, mitokondrioak eta nukleoa esaterako, erraz bereizten dira argazkiotan. Honi esker, hartzaile ezberdinen antolamendua aztertu izan da mikroskopia elektronikorako metodo honi esker, hala nola, CB₁ hartzaile endokannabinoidearena.

Hala ere, batzuetan immunourre metodo hori, immunoperoxidasa metodoarekin bateratu behar da, immunohistokimika bikoitz bat ikustarazteko asmoz. Ondorioz, intereseko proteina edo hartzailearekin batera, zelula mota edo egitura zelular zehatz bat ere markatua agertzea ahalbideratzen da. Immunoperoxidasa metodoarekin, antigorputz primarioak ezagutzen duen proteina adierazten duten egitura zelular edo zelula mota guztiak diaminobentzidina (DAB) izeneko prezipitatu batez beteak egongo dira. Horrela, immunohistokimika bakun batez bereiztezin diren egituretan ematen diren adierazpen ezberdinak aztertu ahal dira.

Azken kasu hau da astrozitoena, immunoperoxidasa metodoaz markatu ezean, oso zaila baita neuronetatik bereiztea. Astrozitoek soilik adierazten dituzten hainbat proteina dauden arren, mikroskopio elektronikorako markatzaile erabilienean proteina harikara azidiko gliala (ingelesez: *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) izan da. GFAP astrozitoen zitoeskeletoko bitarteko proteina harikara nagusia da, eta ondorioz adierazpena glia zelula hauen gorputz eta adarkadura nagusietara mugatzen da. Beraz, GFAP erabiltzean markatzaile astrozitiko gisa, astrozitoen morfologiaren irudi murriztu bat ikusiko da mikroskopio elektronikoko ultramikrografietan, eta ondorioz ezin izango ditugu astrozitoetan adierazten diren hartzaile guztiak detektatu, batez ere hartzaile hauek sinapsi eta odol-hodietako egiturekin kontaktuan dauden astrozitoen adarkadura meheenetan kokatzen badira.

Bestalde, glutamato aspartato garraiatzailea (ingelesez: *glutamate aspartate transporter*, GLAST), astrozitoek era espezifikoan adierazten duten aminoazido kitzikatzaileen garraiatzaile bat da, zelula osoan zehar adierazten dena. Proteina honek izugarrizko garrantzia du garun osoko glutamatoaren homeostasian, eta ondorioz, astrozitoen mintz guztian zehar adierazten den arren, sinapsiak inguratzen dituzten luzapen astrozitiko finenetan ere adierazten da. Beraz, lan honetan, GLAST markatzaile astroglial gisa erabili da mikroskopio elektronikorako prestakinetan, GFAPekin alderatzeko asmoz.

Gainera, gure laborategian CB₁ astrozitikoa detektatzeko urteetan zehar erabili izan den GFAP-CB₁ mikroskopio elektronikorako immunohistokimika bikoitza (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018) GLAST-CB₁ konbinazioarekin alderatu da, GLAST markatzailearen erabilerak hartzaile ezberdinen adierazpenaren azterketan dakartzan onurak frogatzeko.

Astrozitoen azalera osoak identifikatuz CB₁ hartzaileen kokapen espezifikoa eta inguruko egitura sinaptikoekiko duen erlazioa zehaztasunez aztertzea garrantzitsua da astrozitoen eta EKSren harremanaren ikuspegi errealistago bat edukitzeko.

3. Ikerketaren muina

Lan honetan mikroskopio fokukide eta elektronikorako immunohistokimika ezberdinak burutu ziren, GFAP eta GLAST markatzaile astrozitikoak beraien artean alderatzeko. Gainera, markatzaileak CB₁ hartzailearen aurkako antigorputzekin konbinatu ziren CB₁ astrogliala detektatzeko. Honetarako, zortzi astetako C57/BL6 saguak %4 paraformaldehido, %0,2 azido pikriko eta %0,1 glutaraldehido zuen PB 0,1 M disoluzio bat erabiliz perfunditu ziren. Garunak egun berean atera eta aste batera 50 µmtako xerretan ebaki ziren bibratomoan. Azkenik, intereseko mikroskopiorako immunohistokimika burutu zen teknika bakoitzerako beharrezkoak diren antigorputzak erabiliz.

3.1. GFAP eta GLAST markatzaile astrozitikoen karakterizazioa

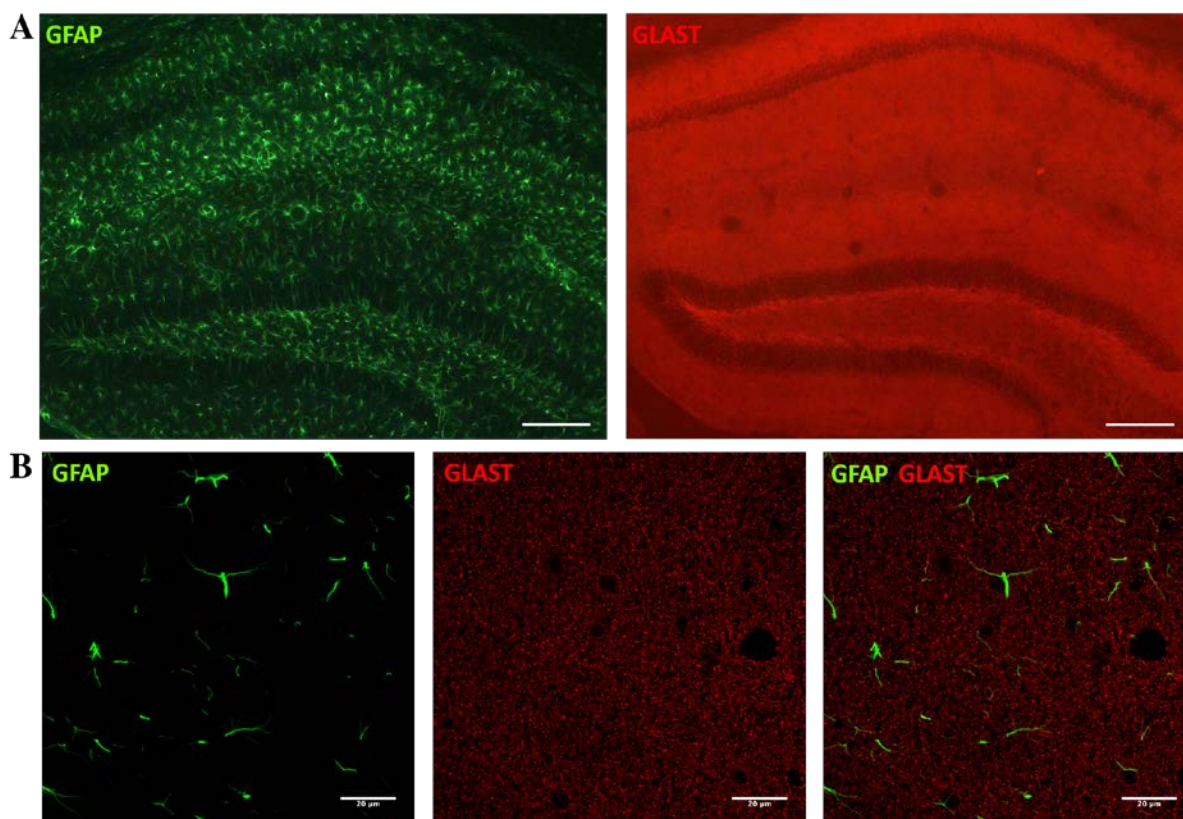
3.1.1. GFAP hipokanpoko astrozitoen gorputz eta adarkadura nagusietara mugatzen den bitartean, GLASTen markaketak hipokanpo osoa betetzen du

Mikroskopio fokukidea erabili zen hipokanpoko astrozitoetan bi markatzaile ezberdinek (GFAP eta GLAST) zuten markaketa patroia aztertzeako asmoz (1. irudia). GFAP astrozitoen zitoeskeletoko proteina garrantzitsuenetariko bat izanik, zelula hauen gorputz eta adarkadura nagusiak ikustea ahalbidetzen digu. Erabilgarria izango litzateke tratamendu baten ostean astrozitoen kopurua edo morfologia aldatzen denentz ikusteko. GLAST erabiliz ordea, immunofluoreszentzia hipokanpo osoan ikus daiteke, zelula piramidal eta granularren nukleoak kokatzen diren geruzetan izan ezik. Handipen handiagotan aztertuz gero, GLAST antigorputzak hipokanpoko azalera handiagoa betetzen du, izan ere, astrozitoen adarkadura guztietan

adierazten den garraiatzaile honek, benetan astrozitoek estaltzen duten azalera aditzera ematen du.

Astrozitoen morfologia eta kopurua aztertu nahi izanez gero, GLAST ez da mikroskopia fokukiderako markatzaile astroglial egokiena. Glia zelulok hartzen duten azalera guztiaren ideia bat ematen digun arren, ezin ditugu bereiztu astrozito ezberdinen gorputzak. Hala ere, honen arrazoa astrozito guztien mintz osoan zehar adierazten dela denez, mikroskopia elektronikoan astrozitoen adierazle gisa erabiltzeko ezin hobea dela dirudi.

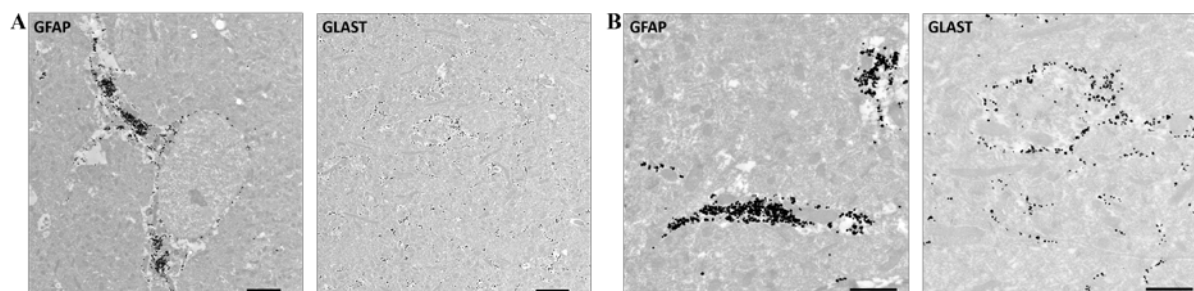
1. irudia. Mikroskopia fokukiderako immunohistokimika bidez markaturiko hipokanpoa, GFAP (berdea-alexa488) edo GLAST (gorria-cy3) antigorputzak erabiliz. A. GFAP astrozitoen soma eta adarkadura nagusietan kontzentratuta agertzen den bitartean, GLAST garraiatzaileak hipokanpo osoa hartzen du, zelula piramidal eta granularren geruzak izan ezik. B. Hipokanpoko CA1 geruzak erakusten duenez, GFAPk astrozitoen soma eta prozesu astrozitiko nagusiak markatzen ditu; bestalde, GLAST markaketa era homogeneoan banatzen da.



3.1.2. GFAPari lotutako metal partikulak astrozitoen gorputzen zitoplasmara mugatzen diren bitartean, GLASTi atxikitakoak astrozitoen mintz osoan zehar agertzen dira

Mikroskopia elektronikorako immunourre metodoaren bidez, GFAP eta GLAST proteinak astrozitoetan non kokatzen diren aztertu zen (2. irudia). Metodo honetan erabiltzen den bigarren antigorputzak, 1,4 nmtako urre partikula bat du itsatsia, zilarrez biziagotu ostean ikusarazten dena. Ondorioz, antigorputz primarioa lotzen den tokian, hau da, gure proteina adierazten den tokian, metal partikula bat agertuko da. GFAP astrozitoen gorputzean eta adarkadura handienetara mugatzen da, sinapsi eta egitura baskularrak inguratzen dituzten luzapen astrozitiko txikiak ez dutelarik GFAP zitoeskeletoko proteina adierazten. GLAST garraiatzailea, bestalde, espezifikoki astrozitoen mintzean agertzen da. GLAST antigorputzari lotutako urre partikulak ehun osoan zehar zabalduta agertzen dira, GFAP markatzaileak baino prozesu astroglial gehiago agertzen direlarik markatuta.

2. irudia. Hipokanpoko CA1 geruza, GFAP eta GLAST antigorputzak mikroskopio elektronikorako immunourre metodoarekin bateratuz markatua. GFAP antigorputzari lotutako metal partikulak astrozitoen zitoplasman kontzentratzen dira, hauen gorputz eta adarkadura nagusietara mugatuz. GLAST antigorputza erabiliz gero, metal partikulak ehun guztian zehar sakabanatzen dira, espezifikoki astrozitoen mintzean agertzen direlarik (B eskala barra=1 micra).

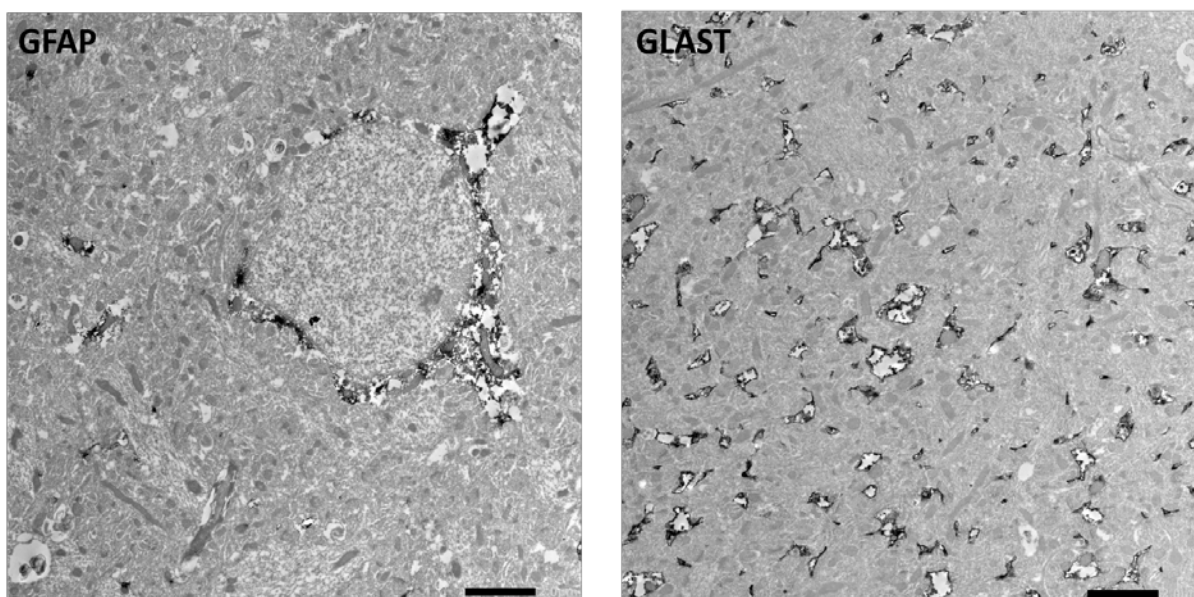


3.1.3. GLAST markatzaile astrozitikoak GFAPk baino hiru eta lau aldiz gehiago markatzen du astrozitoen azalera eta mintza, hurrenez hurren

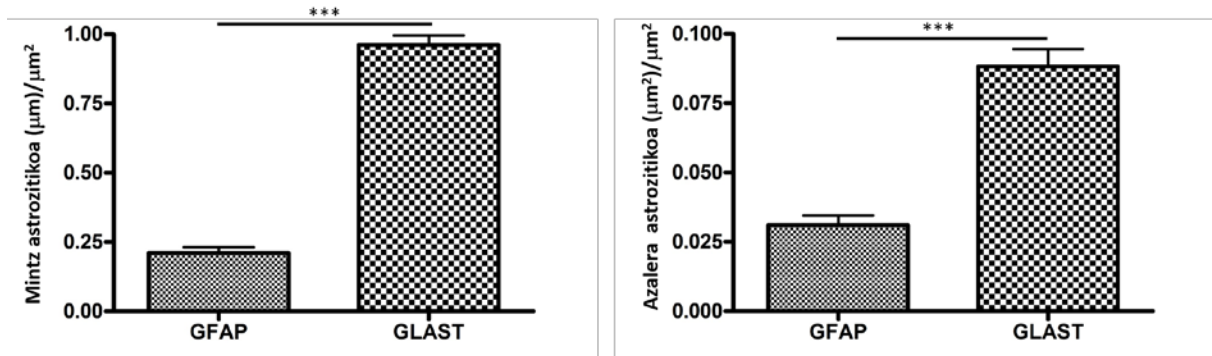
Ondoren, mikroskopio elektronikorako immunoperoxidasa metodoa erabiliz bi markatzaileei esker detekta daitezkeen prozesu astrozitikoaren azalera eta mintz luzera aztertu zen. Immunoperoxidasa metodoan erabilitako antigorputz sekundario biotinilatuari esker DAB prezipitatua, intereseko proteina adierazten den mota edo egitura zelularrean metatzen da. Ondorioz, kasu honetan bi proteina hauek soilik astrozitoetan adierazten direnez, astrozitoak errez bereiz daitezkeen prezipitatu beltz batez (DAB) beteak agertzen dira mikroskopio elektronikoko ultramikrografietan (3. irudia).

Handipen handiko argazki hauetan, ImageJ ordenagailu softwarea erabiliz, bi markatzaileek detektatzea ahalbidetzen duten astrozitoen azalera eta mintzaren luzera kalkulatu zen, eta GraphPad software bidez analisi estatistikoa burutu zen (4. irudia). GLAST antigorputza erabiltzean astrozitoen azalera hirukoitza antzeman daiteke GFAPekin konparatuz. Detekta daitezkeen astrozitoen mintz luzera, ordea, lau aldiz handiagoa da. Hau logikoa da, GLAST markatzaileari esker, GFAPekin markatzea ezinezkoak diren luzapen astroglial meheenak ere betetzen baitira DABz, zeinek azalera txikia duten mintzaren luzerarekin alderatuz.

3. irudia. Hipokanpoko CA1 geruza, GFAP eta GLAST antigorputzekin markatua, mikroskopio elektronikorako immunoperoxidasa metodoaren bidez. GLAST antigorputza erabiliz astrozitoen azalera gehiago betetzen da DABz. GLAST garraiatzailea astrozitoen mintz osoan zehar adierazten denez, GLAST antigorputza erabiliz astrozitoen adarkadura txikiak ere DABz betetzen dira. GLAST markatzailearekin, GFAP antigorputzarekin baino askoz proiektzio astrozitiko gehiago markatzen dira, izan ere, GFAP markaketak ez ditu astrozitoen adarkadura meheenak betetzen.



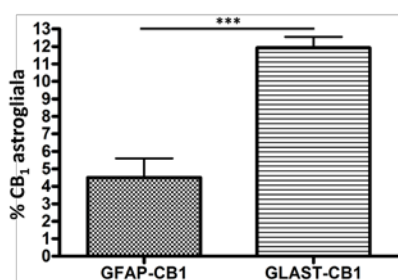
4. irudia. Mikroskopia elektronikorako immunoperoxidasa metodoa erabiliz markatutako prozesu astrozitikoen analisi estatistikoa. **A.** GLAST antigorputzak lau aldiz mintz astroglial gehiago markatzen du ($0,96 \pm 0,019 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) GFAP antigorputzarekin alderatuz ($0,21 \pm 0,034 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$), (t-test, $p < 0,0001$). **B.** DABz betetako azalera astrozitikoa ere, hiru aldiz gehiago da GLAST markaketarekin ($0,088 \pm 0,0063 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$) GFAPekin konparatuz ($0,031 \pm 0,0034 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$), (t-test, $p < 0,0001$). Analizatutako azalera = $2.300 \mu\text{m}^2$ antigorputz bakoitzarentzako.



3.2. GLAST-CB₁ immunohistokimika bakoitzak GFAP-CB₁ konbinazioak detektatzen duen CB₁ astrozitikoaren bikoitza identifikatzen du

Astrozitoetan adierazten diren hartzaileen analisirako GLAST markatzaile astrozitiko erabilgarriagoa dela frogatzeko, urteetan gure laborategian erabilitako mikroskopia elektronikorako immunourre eta immunoperoxidasa immunohistokimika bikoitza, GFAP-CB₁, GLAST-CB₁ antigorputz konbinazioarekin alderatu zen. Analisi hau hipokanpoko CA1 gunean burutu zen. Astrozitoak markatzeko GLAST erabiltzean prozesu astroglial gehiago antzeman daitezke, GFAPekin alderatuz, luzapen astrozitiko mehe gehiago ikusten direlarik, besteak beste, sinapsiak inguratzen dituztenak.

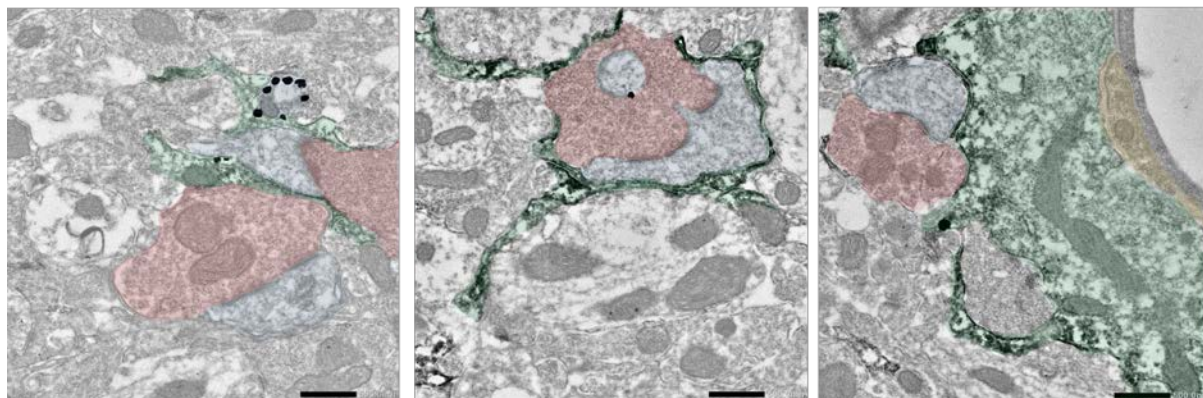
CB₁ hartzailea perisinapsian kokatzen da batez ere, bertan burutzen baititu funtzio nagusiak. Analisi estatistikoa ikus daitekeenez, GLAST-CB₁ immunohistokimikari esker, GFAP-CB₁ antigorputz konbinazioarekin detektatzen den CB₁ astroglialaren bikoitza hauteman daiteke (5. irudia).



5. irudia. Hipokanpoko CA1 gunean detektatutako CB₁ astroglialaren analiza, GFAP edo GLAST erabiltzean astrozitoak markatzeko mikroskopia elektronikorako immunourre eta immunoperoxidasa markaketa bikoitzaz. GLAST antigorputza erabiltzean CB₁ astrozitiko gehiago detektatzen da (CB₁ totalaren % $11,92 \pm 0,64$), GFAP markatzailearekin alderatuz (CB₁ totalaren % $4,5 \pm 1,102$). Aztertutako azalera = $2.300 \mu\text{m}^2$ antigorputz konbinazio bakoitzarentzako

Azkenik, GLAST-CB₁ immunohistokimikaz markaturiko kortex piriformearen ultramikrografiak atera ziren, garuneko gune honen arkitektura zelularra hobeezina baita astrozitoen luzapen mehenak aztertzeko (6. irudia). Astrozitoek mota ezberdinetako sinapsiak inguratzen dituzte, eta gainera CB₁ hartzailea adierazten dute mintzean.

6. irudia. GLAST-CB₁ antigorputz konbinazioarekin markaturiko kortex piriformearen I. geruzaren ultramikrografiak. Kortex piriformearen arkitektura zelularra hobeezina da astrozitoek sinapsi mota ezberdinekin lotura estua dutela eta beraien mintzetan CB₁ hartzailea adierazten dutela frogatzeko. GLAST astrozitoen mintz osoan zehar adierazten den glutamatoaren garraiatzaile bat denez, mikroskopio elektronikorako immunoperoxidasa metodoan erabiltzean, astrozitoen luzapen meheenak ere DABz betetzen dira. Honi esker, sinapsien inguruan adierazten diren CB₁ hartzaileak ere detekta daitezke. Terminala (gorria), arantza dendritikoa (urdina), astrozitoa (berdea), perizitoa (horia).



4. Ondorioak

Lan honen emaitzek nabarmentzen dutenez, GLAST glutamato garraiatzaile astrogliala astrozitoen markatzaile hobeezina da mikroskopio elektronikoko immunohistokimika bikoitzan. GFAP adierazle klasikoarekin alderatuz gero, azalera astrozitikoaren hirukoitza agertzen da DABz betea, eta lau aldiz mintz astroglial gehiago detekta daiteke. GFAP astrozitoen zitoeskeletoko proteina harikara bat denez, zelulen gorputz eta adarkadura nagusietara mugatzen da, sinapsi eta odol-hodietako egiturekin kontaktuan dauden luzapen astrozitiko meheenak ez dira markatzen. Ondorioz, gune perisinaptikoan funtzio garrantzitsua duten hartzaileak ezin dira astroglial gisa antzeman, hartzaile astrozitikoen parte bat gutxietsiz.

GLAST garraiatzaileak izugarrizko funtzio garrantzitsua du garunean glutamatoaren homeostasiaren kontrolean eta astrozitoen mintz osoan zehar adierazten da, baita glia zelula hauen luzapen txikienetan ere. Ondorioz, astrozitoen adarkadura guztiak markatuak agertzen dira mikroskopio elektronikoko ultramikrografieta, astrozitoetan adierazten diren antigorputz gehiago detektatzea ahalbidetzen duelarik.

Sistema endokannabinoidiko CB₁ hartzaile nagusia astrozitoetan adierazten dela eta neuronen aktibitatean funtzio garrantzitsuak izan ditzakeela frogatuta dago dagoeneko. Hala ere, lan honetan frogatzen denez, uste zena baino CB₁ hartzaile gehiago adierazten da astrozitoetan. Izan ere, orain arte GFAP markatzaile astrozitikoa erabili da azterketa hau burutzeko, sinapsien inguruan kokatzen diren hartzaileak ezin zirelarik astroglial bezala antzeman. Beraz, mikroskopio elektronikorako immunohistokimika bikoitzan anti-GLAST erabiliz CB₁ hartzailearen aurkako antigorputzarekin batera, GFAP-CB₁ konbinazioarekin antzematen den CB₁ astroglial bikoitza detektatzen da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honek etorkizunean hainbat esperimentu burutzera eramaten gaitu. Izan ere, orain arte gure laborategian astrozitoetan adierazten den CB₁ hartzailea kalkulatzeko GFAP markatzaile astrozitikoa erabili da. Tratamendu ezberdinen aurrean CB₁ hartzailearen adierazpenean ematen diren aldaketak aztertzeko erabiltzen genuen immunohistokimika bikoitz hori. Emaita hauek aditzera ematen dute GLAST markatzaile astrozitiko hobea dela mikroskopio elektronikorako, eta beraz, interesgarria izango litzateke lehen burutu ditugun azterketak GLAST-CB₁ konbinazioarekin burutzea, astrozitoen azalera gehiago ikustean, ezberdintasunak nabarmenagoak izan daitezkeelako.

Beste alde batetik, oraindik ez da ezaguna nola kokatzen diren CB₁ hartzaile astrozitiko hauek sinapsi ezberdinen inguruan, nahiz eta ikusi den funtzio garrantzitsuak dituztela garunaren eta neuronen aktibitatean. Interesgarria izango litzateke immunohistokimika honen bidez hau argitzea, EKSaren funtzioa eta ekintza mekanismoak ulertzen lagunduko baitu.

Azkenik, EKSaz gain beste sistema batzuetako eta astrozitoetan adierazten diren hartzaileen kokapen ultraestrukturala aztertzeke tresna erabilgarria da GLAST markatzaile astrozitikoa.

6. Erreferentziak

- Abbott, N. J., Rönneback, L., Häansson, E. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier". *Nature Reviews Neuroscience*. 7, 41-53
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., Haydon, P. G. (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner". *Trends Neuroscience*. 22, 208-215
- De Petrocellis, L., Cascio, M., Di Marzo, V. (2004). "The endocannabinoid system: a general view and latest additions". *British Journal of Pharmacology*. 141, 5, 765-774
- Gómez-Gonzalo, M., Navarrete, M., Perea, G., Covelo, A., Martín-Fernández, M., Shigemoto, R., Luján, R., Araque, A. (2014). "Endocannabinoids induce lateral long-term potentiation of transmitter release by stimulation of gliotransmission". *Cerebral Cortex*. 25, 10, 3699-3712
- Gutiérrez-Rodríguez, A., Bonilla-Del Río, I., Puente, N., Gómez-Urquijo, S., Fontaine, C. J., Egaña-Huguet, J., Elezgarai, I., Ruehle, S., Lutz, B., Robin, L. M., Soria-Gómez, E., Bellocchio L., Padwal, J. D., van der Stelt, M., Mendizabal-Zubiaga, J., Reguero, L., Ramos, A., Gerrikagoitia, I., Marsicano, G., Grandes, P. (2018) "Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus" *Glia*. 66, 7, 1417-1431
- Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Georges, F., Koehl, M., Abrous, D. N., Mendizabal-Zubiaga, J., Grandes, P., Liu, Q., Bai, G., Wang, W., Xiong, L., Ren, W., Marsicano, G., Zhang, X. (2012). "Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB₁ receptor modulation of hippocampal LTD". *Cell*. 148, 5, 1039-1050
- Harada, K., Kamiya, T., Tsuboi, T. (2016). "Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental, and pathological implications in the brain". *Frontiers in Neuroscience*. 9, 1-9
- Metna-Laurent, M., Marsicano, G. (2016). "Rising stars: modulation of brain functions by astroglial type-1 cannabinoid receptors". *Glia*. 63, 3, 353-364
- Navarrete, M., Díez, A., Araque, A. (2014). "Astrocytes in endocannabinoid signalling". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 369, 1654
- Oliveira da Cruz, J. F., Robin, L. M., Drago, F., Marsicano, G., Metna-Laurent, M. (2016). "Astroglial type-1 cannabinoid receptor (CB₁): a new player in the tripartite synapse" *Neuroscience*. 323, 35-42

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau honako laguntzei esker burutu da: Eusko Jaurlaritza BCG IT764-13 eta MINECO/FEDER SAF2015-65034-R. SA-k Euskal Herriko Unibertsitatearen PhD kontratu bat dauka (PIF 16/251).

Mikrogliaren aktibazioa eta 2 motako hartzaile kannabinoidearen de novo adierazpena loki bihurguneko epilepsia eremuan

Terradillos, Itziar^{1,2}; Bonilla-Del Río, Itziar^{1,2}; Achicallende, Svein^{1,2}; Egaña, Jon^{1,2}; Rico, Irantzu^{1,2}; Buceta, Ianire^{1,2}; Lekunberri, Leire^{1,2}; Reguero, Leire^{1,2}; Mendizabal, Juan Luis^{1,2}; Romero, Julian⁴; Grande, Maria Teresa⁴; Hillard, Cecilia J.⁵; Puente, Nagore^{1,2}; Elezgarai, Izaskun^{1,2}; Guerricagoitia, Inmaculada^{1,2} eta Grandes, Pedro^{1,2,3}

¹Medikuntza eta Erizaintzako fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU

²Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzietako parkeko eraikina

³Zientzia medikoen barrutia, Victoriako Unibertsitatea, Victoria, BC, Kanada; ⁴Zientzia esperimentalen fakultatea, Francisco de Vitoria Unibertsitatea, Madril;

⁵Farmakologiako departamentua eta Neurozientzien ikerketa zentroa, Wisconsin-eko Medikuntza eskola

itziar.terradillos@ehu.eus

Laburpena

Loki bihurguneko epilepsia (ingeleseko Mesial Temporal Lobe Epilepsy, MTLE) epilepsia partzial mota ohikoena da, tratamenduari erresistentzia handia garatzen duena eta osasun fisiko eta mentala erabat kaltetzen dituen. Ikerketa honetan epilepsiarekin erlazionaturik egon daitezkeen inflamazio prozesuekin gertatzen den mikrogliaren aktibazioan eta CB₂ hartzailearen espresioan zentratu gara. Izan ere, mikroglia M₁ inflamazio-aldeko egoeran ala M₂ inflamazio-kontrako egoeran sartzen da CB₂ hartzailearen aktibazioaren bidez. Gainera, hartzaile horren espresioa, garun lesioetan eta neuroendekapenezko zenbait gaixotasunetan, handitzen dela frogatu da. Ikerketa honetan, CB₂ hartzailearen adierazpena hipokanpoan aztertu dugu MTLE sagu eredu batean. Helburu honetarako CB₂ hartzailearen espresioa markatuta duten saguak (CB₂-GFP) eta hartzailea adierazten ez duten saguak erabili ditugu (CB₂-KO).

Hitz gakoak: inflamazioa; CB₂ hartzailea; mikroglia; loki bihurguneko epilepsia.

Abstract

Medial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the most common form of partial epilepsy that presents great resistance to treatment and severely impairs physical and mental health. In this study, we have focused on microglial activation and CB₂ receptor expression related to the inflammatory processes that could be involved in epilepsy. Pro-inflammatory M₁ state microglia enters the anti-inflammatory M₂ state by the CB₂ receptor activation. Furthermore, this receptor expression has been shown to increase in brain injuries and in several types of neurodegenerative diseases. Here, we have investigated the CB₂ receptor expression in the hippocampus of a MTLE mouse model by using CB₂-GFP and CB₂-KO mutant mice.

Key words: inflammation; CB₂ receptor; microglia; temporal lobe epilepsy.

1. Sarrera eta motibazioa

Epilepsia gaixotasun neurologiko ohikoenetarikoa bat da, kronikoa eta sendaezina. Munduko biztanlerian %1-3-ko prebalentzia du (Bhalla et al., 2012; O'Connell et al., 2017), guztira 50 milioi pertsonen jasaten dutelarik mundu osoan (Herrera-Vázquez et al., 2016). Paziente epileptiko guztien %30-ak tratamenduari erresistentea den epilepsia pairatzen du, nahiz eta existitzen diren terapia motak oso desberdinak diren: farmako bidezko terapiak eta prozedura kirurgikoak adibidez. Paziente hauek morbiditate larria jasaten dute eta hilkortasun tasaren handipen esanguratsua. Gainera, bizitzaren lehen urteetan ondorio larriak agertu daitezke, hala nola, alderdi kognitiboan eta motorrean atzerapena. Tratamenduak eraginkorrak direnean ere, ezgaitasuna sortzen duten albo eragin kaltegarriak agertzen dira eta dosifikazioaren aldaketa txikiak edo bizitzako egoera desberdinek konbultsio gertakariak piztu ditzakete (adibidez, dosi baten hartzearen ahaztearekin, alkoholaren kontsumoarekin, lo gabeziarekin, etab.) (O'Connell et al., 2017). Gainera, farmako antiepileptikoekin tratamendua burutzeak konbultsioak saihesten ditu askotan, baina kasu gehienetan, hauen eraginkortasuna paziente epileptikoen asaldura kognitiboan zailantzarria da (Di Marzo et al., 2015). Beraz, epilepsiaz diagnostikatutako paziente

gehienentzat, bizi kalitatea okertzen da gaixotasuna eta honen kontrako terapien albo ondorioak direla eta (O'Connell et al., 2017). Arlo honetako gaur egungo ikerketa asko, ordezkio bide terapeutikoen garapenean bideratu dira, estatus epileptikoaren (EE) ostean epileptogenesia eta bere ondorio kaltegarriak, hala nola, oxidazio-estresa, kalte neuronalak, eta hauen ondoriozko funtzio kognitiboen okerragotzea ekiditeko (Tchekalarova et al., 2018).

Hipokanpoa konbultsio epileptikoen gune garrantzitsua da (Wallace et al., 2003) epilepsia partzial mota ezberdinen artean, ohikoenetarikoa loki bihurguneko epilepsia delarik (MTLE) (Herrera-Vázquez et al., 2016). MTLEa giza-populazioaren %1-ari eragiten dio (Bhaskaran and Smith, 2010). Oraindik ez dira epilepsia mota honen eta bere ondoriozko bat bateko konbultsioen kausak ondo ezagutzen. Hala ere, MTLEren agerpena hurrengo aldaketa anatomikoekin erlazionatzen da beti: neuronen galera, neuronen kitzikakortasunaren handipena, inhibizioaren ahultzea, zirkuituen berantolaketak, sinapsien anormaltasunak eta inflamazioa (Long et al., 2014; Herrera-Vázquez et al., 2016).

Bildutako datu kliniko eta esperimentalek endokannabinoide sistema (EKS) neuroendekapenezko gaixotasunetan itxurazko potentziala izan daitekeela iradokitzen dute, hala nola, epilepsian, Alzheimer gaixotasunean, esklerosi anizkoitzean eta Parkinson gaixotasunean.

Kannabinoideekin eta endokannabinoideekin erlazionatutako hartzaileen espresio maila neuronetan eta glia zeluletan aldatu daiteke. Gaixotasun neurologikoetan, endokannabinoideen seinaleztapeneko alterazio kronikoak ematen dira, eta sarritan baita immunitate sisteman ere. Burmuin parenkima inbaditzen duten immunitate zelula jakin batzuk agertuko dira, hartzaile kannabinoideak espresatuko dituztenak (Di Marzo et al., 2015).

Hainbat ikerketek aurkeztutako datuetan, 2 motako hartzaile kannabinoidearen (CB₂) bitartez eragiten duten farmakoak nerbio sistema zentralako (NSZ) gaitzen kontrako eragile farmakologiko gisa erabili ahalko litekeela iradokitzen da. Azken urtetan, CB₂ hartzailearekiko afinitatea duten zenbait konposatu sintetiko eta natural berriak aztertzen ari dira NSZeko gaitzen kontrako ohiko farmakoen ordezkio gisa. Hauen artean, seskiterpeno bizikliko natural bat, b-kariofilenoa (BCP), espezieen olio esentzialen (kanela, piperbeltza, oreganoa, iltzea, erromeroa eta ezkaia) eta zenbait landareen ohiko konposatua dena, nagusiki *Cannabis sativa* eta *Copaifera* spp. BCPak CB₂ hartzailearekiko afinitate handia dauka, eta etorkizun handiko fitokannabinoide dietetikoa kontsideratzen da, azterketa sakonago bat merezi duena. CB₂ hartzailearen agonista honek alkoholaren adikzioaren ondoriozko inflamazioan, nozizepzioan, depresioan, garun iskemian eta Alzheimer gaixotasunean eragin babesle bat duela aurkitu da. Orain arte argitaratutako ikerketa batzuetan karraskarietan egindako frogetan konbultsioen kontrako ekintza potentziala erakutsi du. Azido kainikoak (AK), glutamato aminoazido kitzikatzaileraren analogo bat dena, oso erabilia izan da estatus EE eragiteko tresna bezala. Saguetan egindako entsegu batean, CB₂ hartzailearen agonista selektiboak, konbultsio toniko-klonikoak ezabatu zituen eta kainatoak eragindako neurotoxikotasuna eta oxidazio-estres konkomitantea arindu zituen. Honek, CB₂ hartzaileen aktibazioak EEren ondoriozko konbultsioen hedapenaren aurrean eta oxigenoaren espezie errektiboak (Ingelese, Reactive Oxygen Species, ROS) aktibazioaren aurrean babeslea dela iradokitzen du.

CB₂ hartzaileak, ehun periferikoetan eta konkretuki B linfuzitoetan, makrofagoetan, mastozitoetan, *Natural Killer* zeluletan, barean, amigdaletan eta timoan kokatzen dira. Hauen banaketa NSZean gutxiago aztertu da oraindik, baina badirudi bere kokapen nagusia mikroglia zeluletan ematen dela (Tchekalarova et al., 2018).

Mikroglia zelulak garunean kokatzen diren makrofagoak dira, bertako immunitate sistemaren lehenengo erantzuleak. Plastikotasun handidun zelulak dira, fenotipo ezberdinak hartu ditzaketelarik eta programa funtzional ezberdinetan parte hartu, mikroingurunearen seinale espezifiko ezberdinei erantzunez. Mikroglia bi egoerataratu aktibatu daiteke: M₁, aktibazio fenotipo klasikoa, eta M₂, ordezkio forman aktibatutako fenotipoa. Zehazki, interferoi- γ -rekin edo lipopolisakaridoekin egindako estimulazioak mikroglia M₁ motako fenotipora aktibatzea sustatzen du, inflamazioaren bitartekariak askatuko dituelarik. Hala nola, nekrosi tumoralaren faktore- α (TNF- α) eta 1 β interleuzina (IL-1 β) bezalako zitokinak, kimiozinak, redox molekulak, proteina koestimulatzailerak eta II motako histokonpatibilitate konplexu nagusia. Hauek inflamazioa areagotzen dute, ehun eta zelulei kalteak eraginez. Aldizka, mikroglia M₂ polarizazio egoerara aktibatu daiteke. Interleuzina-4 (IL-4) eta interleuzina-10 (IL-10) bezalako zitokinek mikroglia M₂ fenotipoa sustatzen dute. Egoera honetako mikroglia inflamazioaren kontrako zitokinak sortzen ditu, hazkuntza faktore bihurgarria beta (TGF- β) eta IL-10 bezala, propietate neurobabesleak dauzkatenak. Inflamazioaren kontrako bitartekari hauek garunaren berreskuratzea sustatuko dute, hondakin zelularren ezabapenaz, inflamazio lokala konponduz eta ehunen birmoldaketan parte hartuz.

Mikroglia aktibazioa eta M₁/M₂ polarizazioa NSZeko hainbat kaltetan behatu da.

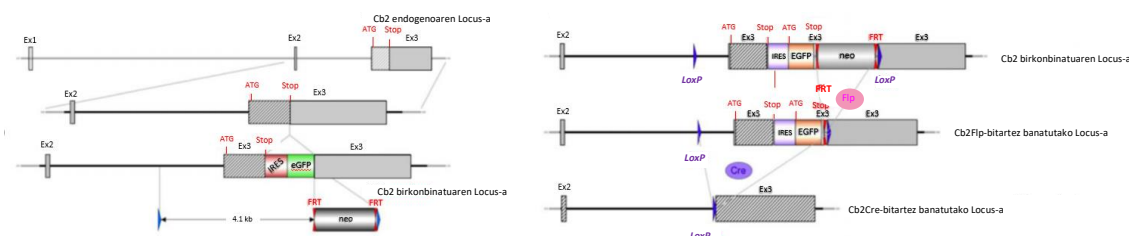
CB₂ hartzailearen seinaleztapen bideak paper garrantzitsua jokatzeko du NSZeko kaltean, ekintza

mikroglialaren erregulazioaren bidez. Mikroglia aktiboan espresatzen den CB₂ hartzaileak migrazio mikroglialaren propietateak erregulatzen dituela frogatu da. Gainera, CB₂ hartzailearen estimulazio selektiboak garun lesio egoeran esanguratsuki babesten duela ikusi da eta inflamazioa ezabatu, mikroglia M₂ polarizazioa sustatuz. Bestalde, CB₂ hartzailearen espresioa mikroglia bere aktibazio egoeraren menpekoa da nagusiki. Beraz, NSZaren lesio eta kalteetan CB₂ hartzailea ito terapeutiko potentziala izan daiteke. Hala ere, mikroglia aktibazio egoera aldatzeak, NSZaren defentsa mekanismo fisiologikoen gabezia eragin dezake, eta zeharkako efektu kaltegarriak agertu daitezke. Izan ere, aktibatzen direnean, mikroglia eta makrofagoak aldibereko aurkako ekintzak dituzte, kalte neurologiko eta babesaren artean. Beraz, polarizatutako mikroglia aktibazio egoera eta funtzioa ulertzea ezinbestekoa da inflamazioaren aurrera egitea ebaluatzeko eta tratamendua hobetzeko (Lin et al., 2017).

Bestalde, CB₂ hartzailearen presentzia NSZean eztabaida gaia izan da azken hamarkadan. Entsegu batzuek CB₂ hartzailearen espresioa zegoela adierazten zuten garun osasuntsuko neuronetan, immunohistokimika tekniketan oinarrituz batez ere. Beste entsegu batzuek, ordea, CB₂ hartzailearen presentzia NSZean glia zeluletara mugatzen zuten, eta bereziki, mikroglia. Proposatu zen, beraz, CB₂ hartzailea mikroglia zeluletan espresatzea, eta espresio maila aktibazio zelularren arabera aldatzen zela ikusi zen. Ondorengo entseguek hipotesi hau konfirmatu zuten. Gizaki laginetan, hartzailearen presentzia odol-hodien inguruko mikroglia mugatzen zen garun osasuntsuetan (kontroletan), baina egoera patologiko ezberdinetan proteina honen espresioa bortizki handitzen zen. Alzheimer gaixotasunean, esklerosi anizkoitzean, Down sindromean eta immunoeskasia birusak eragindako entzefalitisean egindako behaketek, CB₂ hartzailearen presentzia neuroinflamazio eremuetan handituta dagoela adierazten zuten, mikroglia nagusiki. Hala ere, proteina honen kontrako antigorputzen espezifikotasun falta dela eta kezka planteatu dira eta emaitza hauek zalantzan jartzen dira. Argi dago CB₂ hartzailearen presentzia gorputz osoan modu garbian egiaztatzeko tresna gehigarriak beharrezkoak direla, NSZean batez ere. Hemen saguen eredu transgeniko bat azaltzen da. Sagu hauetan CB₂ hartzailearen espresioa ikus daiteke zeharkako modu batera (Lopez et al., 2018). CB₂ espresatuko duten zelulek proteina berde fluoreszentea (ingelesez, Green Fluorescent Protein, GFP) espresatuko dute aldi berean. Horrela CB₂ espresatu duten edo espresatzen ari diren zelulak identifikatu ahal izango ditugu. Gainera, CB₂ hartzailea espresatuko ez duten saguak, CB₂ Knock-Out (CB₂-KO) saguak, garatu dituzte ere. Modu honetan, CB₂aren gabezia izateak MTLE prozesuan eragingo dituen aldaketak behatu ditzakegu.

1. irudia. CB₂-KO eta CB₂-GFP sagu eredu transgenikoen eskema

CB₂-GFP saguek GFP espresatzen dute, *cnr2* genearen sustatzailearen kontrolpean, IRES bat txertatuz GFP kodetze eskualdeaz jarraituta, berehala *cnr2* genearen 3' eremuan. Knock-out saguak sortzeko (CB₂ - / -) sagu horiek Cre-errekonbinasa espresatzen zuten saguekin gurutzatu zituzten loxP-eremuaren ezabapena lortuz (Lopez et al., 2018).



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun ez da epilepsiaren kontrako behin betiko tratamendurik existitzen eta klinikan erabiltzen direnak eragin kaltegarri ugari eta dosifikazio arazoak dauzkate. Hori dela eta, gaixotasun neurologiko honen kontrako tratamendu eraginkorrak topatzeko itxaropatsuak berriak aztertzea beharrezkoa da. EKS epilepsia gaixotasunarentzako itxaropatsuak berri bat bezala proposatu da azken urteetan, eta hau aztertzen duten gero eta ikerketa gehiago daude. CB₁ hartzaileari, espresio maila handia duenez NSZan, arreta handia eskaini zaio. Aldiz, CB₂ hartzaileak espresio maila oso baxuak dauzka egoera osasuntsu batean NSZean. Gaixotasunean maila hauek handitzen badira ere, aztertze oso zaila izan da, bere identifikaziorako existitzen diren antigorputzak ez direlako espezifikoak. Beraz, zeharreko bide batez baliatu gara, CB₂ hartzailearen espresioarenpean GFP sintetizatzen duten sagu transgenikoak, eta CB₂ hartzailea espresatzen ez duten (CB₂-KO) sagu transgenikoak. Tresna baliotsu hau erabiliz, CB₂ hartzailearen espresioa aztertu nahi dugu MTLE eremuan, eta baita mikroglia ematen diren aldaketa fenotipikoak CB₂ hartzailea espresatzen ez duten saguetan. Ikerketa honen helburu nagusia, CB₂ hartzaile kannabinoideak epilepsiaren itxaropatsuak potentzial gisa izan dezakeen garrantzia ikusirik MTLE eremuan hipokanpoak duen adierazpena sakontasunean aztertzea da.

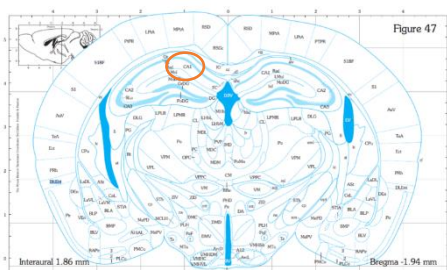
Bestalde, inflamazioa eta epilepsiaren kausalitate erlazioa gero eta gehiago aztertzen ari den fenomeno da. Krisi errepikakorrek inflamazioa eragiten dutela frogatu egin da, eta aldi berean inflamazioak krisi berrien sorrera eta gaixotasunaren okerragotzea eragiten du. Zehazki, gliak jariatutako zitozina proinflamatorioek paper garrantzitsua jokatzeko dute krisi epileptikoetan inplikaturako hiperkitzikakortasun neuronalean, eta honekin erlazioatutako kalte zelular eszitotoxikoan (Herrera-Vázquez et al., 2016). Ondorioz, mikroglia epilepsia gaixotasunean aztertze oso zaila zelula populazio garrantzitsua iruditzen zaigu, honen egoeraren arabera fenotipo proinflamatorioa edo antiinflamatorioa izan dezakeelako. Beraz, beste helburu bat polarizatutako mikroglia aktibazio egoera eta funtzioa ulertzea da, inflamazioaren aurrera egitea ebaluatzeko.

3. Ikerketaren muina

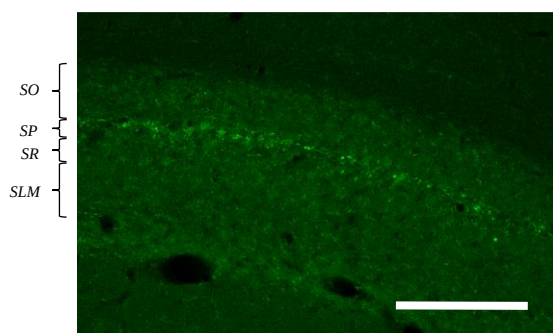
Behin ikerlan honen helburuak aurkeztuta, azaldu beharra dago orain arte aurretiazko ikerketa bakarrik egin dela. Lortutako datuak nahiz eta gutxi izan, etorkizunean ikerketak hartuko duen norabidea zehazteko lagundu digute, eta animalia hauen GFP seinaleztapena, CB₂ hartzailearen espresioaren adierazle dena, non eta nola ematen den ikusteko balioko dute ere.

Bi sagu transgeniko mota ezberdinei (CB₂-GFP eta CB₂-KO) EE indutitze kirurgia estereotaxiko bidez, 20mM kainato soluziozko 50nl administratu zaie eskumaldeko hipokanpo (hipokanpo ipsilateral) CA1 eremuan. Bi talde hauen kontrolei, gatz-disoluzioa administratu zaie. Guztira 3 CB₂-GFP animalia kainatoa, eta bi animalia salinoa administratu zaie. CB₂-KO animalien kasuan 2 animalia kainatoa administratu zaie eta 2 animalia salinoa. Saguek pairatzen dituzten krisien balorazioa egiteko Racine-ren eskala eraldatu bat erabili da (Lüttjohann et al., 2009). 15 egun igaro ondoren, perfusio transkardiakoa eginez garunak fixatu dira, ondoren 40µm lodierako koroa-ebakinak lortzeko. Ebakin hauetan, hasteko, GFPren berezko seinalea ikusi dugu, batez ere CA1 eskualdeko zelula piramidalen eremuan kontzentratzen dena. Hau konfirmatzeko mikroskopia optikorako immunoperoxidasa teknika aplikatu dugu GFPa markatuz. Hemen fluoreszentzia ikusitako patroi berdina behatu daiteke.

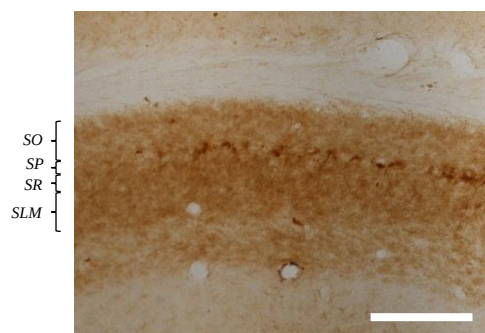
2. irudia. Burutzen den kirurgia estereotaxikoaren itua saguaren koordinatu estereotaxikoaren atlasean, eta horretarako erabiltzen den marko estereotaxikoa eta Nanoject II injektorea (Paxinos G, 2012).



3. irudia. CB2-GFP-sagu baten hipokanpo ipsilateraleko GFP markaketa fluoreszentea CA1 eskualdean. Eskala-barra: 200µm-a. CA1 eremuaren egitura eta eskema. SO, *Stratum oriens*; SP, *Stratum pyramidale*; SR, *Stratum radiatum*; SLM, *Stratum lacunosum-moleculare*.

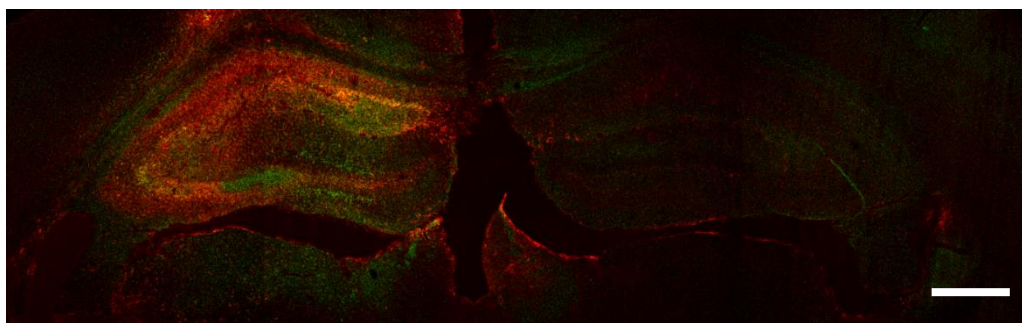


4. irudia. GFPren immunoperoxidasa markaketa CB2-GFP saguaren hipokanpo ipsilateralean. GFPren markaketa fluoreszentearen antzeko markaketa patroia behatu daiteke CA1 eskualdeko zelula piramidaletan zehar. Eskala-barra: 200µm. CA1 eremuaren egitura eta eskema. SO, *Stratum oriens*; SP, *Stratum pyramidale*; SR, *Stratum radiatum*; SLM, *Stratum lacunosum-moleculare*.



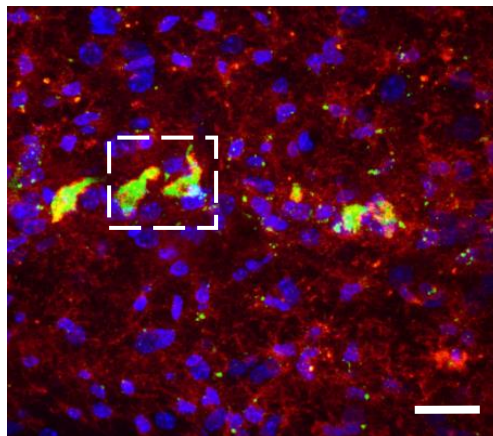
GFPren seinalea (CB₂ hartzailearen espresioaren adierazlea dena) ikusi ondoren, horrek mikrogliaekin duen erlazioa aztertu nahi izan dugu, eta horretarako, mikroglia eta makrofagoen kaltzio-lotura proteina espezifikoa den, ionizatutako kaltzio lotura egokitze proteinaren (Ingelesez, Ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba1) kontrako antigorputza erabili dugu. Aldibereko markaketa gauzatu dugu fluoreszentsia teknikaren bidez, eta mikrogliaen markaketa ematen den eremu bizienetan topatu dugu GFP markaketa.

5. irudia. GFPren (berdea) eta Iba1-en (gorria) markaketa CB2-GFP saguaren hipokanpoan. Alde ipsilateralean bi markaketen handipen bat behatu daiteke hipokanpo kontralateralarekin konparatuz. Markaketa hau ez da agertzen gatz-disoluzioa injektatutako kontrol saguan. Eskala-barra: 500µm



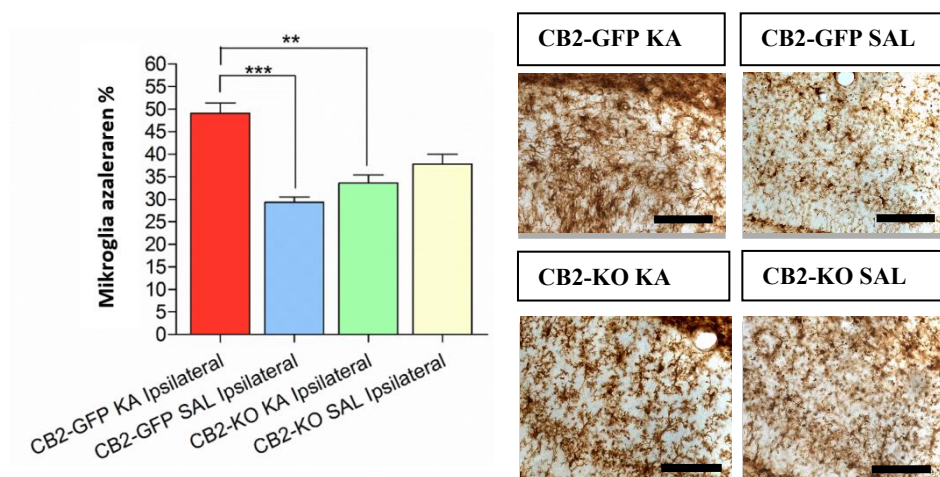
Handipen handiago batekin ikusi nahi izan dugu mikroglia eta GFPren aldibereko markaketa hori, bien banaketa eta kokapena nolakoa den zehazteko asmoz. Badirudi bien kolokalizazio bat dagoela.

6. irudia. GFPren (berdea), Iba1-en (gorria) eta Hoeschen (urdina, nukleoen markatzailea) markaketa CB2-GFP kainato saguaren hipokampo ipsilateraleko CA1 eremuan. Kolokalizazioa dagoela iradokitzen du. Eskala-barra: 25µm



Azkenik, mikroskopia optikorako immunoperoxidasa teknika aplikatuz mikrogliaen markaketa gauzatu dugu, CB2-GFP kainato animalien hipokampo ipsilateral bere gatzeko-disoluzio animaliarekin konparatzeko, eta baita CB2-KO animalien hipokampo ipsilateralarekin. Horrela kainatoak eragiten duen kaltea eta inflamazioa bi animalia ezberdinetan nolakoa den zenbatetsi dezakegu. Iba1-engatik markatutako mikrogliaen azaleraren analisi estatistikoa egin da hipokampo ipsilateraleko hortz bihurtzeko geruza molekularrean.

7. irudia. Mikrogliaen batz besteko azalera CB2-GFP Kainato (CB2-GFP KA), CB2-GFP gatz-disoluzio (CB2-GFP SAL), CB2-KO Kainato (CB2-KO KA) eta CB2-KO gatz-disoluzio (CB2-KO SAL) saguetan. Batz besteko azalera CB2-GFP kainato saguen hipokampo ipsilateralean esanguratsuki handiagoa da bere kontrol gatzeko-disoluzioarekin konparatuz (** $p < 0.001$). Batz besteko azalera CB2-KO kainato saguen hipokampo ipsilateralean CB2-GFP kainato saguen hipokampo ipsilateralean baino esanguratsuki txikiagoa da (** $p < 0.01$). Kruskal-Wallis-en froga $p < 0,05$ *; $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ ***. Eskala-barra: 100µm



Hauek aurretiazko datuak dira, baina ondorengo entseguak bideratzeko oinarria dira.

4. Ondorioak

- Kainatoaz indutitutako estatus epileptikoak CB₂ hartzailearen espresio berria eragiten du CB₂-GFP saguen hipokanpoan. Hartzaile hauek CA1 eta CA2 eremuetako zelula piramidalen zonaldean kokatzen dira batez ere, eta CA3 eremuan eta hilusean neurri baxuago batean. Hau esperotako emaitza da, injekzioa CA1 eremuan ematen delako.
- CB₂ hartzailearen espresioa Iba1-engatik intentsitate handiagoz markatutako mikrogliaekin bat egiten du. Aldaketa mikroglial hauek ez ditugu behatzen gatzezko-disoluzioa injektatutako saguetan.
- Iba1-en immunofluoreszentzia *stratum radiatum* eta *oriensean* zehar behatu daiteke, baina nagusiki zelula piramidalen geruzan kontzentratzen da, CB₂ hartzailearekin kolokalizatzen duela ematen duelarik CB₂-GFP saguetan.
- Mikrogliaaren azalera CB₂-KO saguen hipokanpo ipsilateralean CB₂-GFP saguaren hipokanpo ipsilateralean baino esanguratsuki txikiagoa da kainato injekzioaren ondoren.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

CB₂ hartzailearen presentziak mikroglia duen eragina sakonago aztertu behar dugu. Mikroglia betetzen duen azaleraz gain, CB₂ hartzailearen presentzia edo gabeziak honen fenotipoan (M1 edo M2) duen eragina aztertu beharra dago, morfologia eta zitokina proinflamatorio eta antiinflamatorioak behatuz. CB₂ hartzailearen agonista selektiboaren administrazioak krisi epileptikoetan eta animalien ondorengo egoera kognitiboan eta anatomikoan duen eragina aztertzea garrantzitsua izango litzateke baita ere. Izan ere, CB₂ hartzailearen agonistak klinikoki eraginkorrak izan litezke EEn tratamendu osagarri gisa oxidazio-estresa, neurotoxizitatea eta asaldura-kognitiboak murrizteko.

6. Erreferentziak

Bhalla D., Chea K., Hun C., Vannareth M., Huc P., Chan S., et al. (2012): Population-based study of epilepsy in Cambodia associated factors, measures of impact, stigma, quality of life, knowledge-attitude-practice, and treatment gap. *PLoS One*;7(10):e46296.

Bhaskaran MD eta Smith BN. (2010): Effects of TRPV1 activation on synaptic excitation in the dentate gyrus of a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*;223(2):529-536.

----- (2010): Cannabinoid-mediated inhibition of recurrent excitatory circuitry in the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *PloS one*;5(5):e10683.

Di Marzo V, Stella N, Zimmer A (2015): Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nature reviews Neuroscience*;16(1):30.

Herrera-Vázquez O, Toledo Rojas A, Fleury A (2016): Neuroinflamación y epilepsia. *TIP.Revista especializada en ciencias químico-biológicas*;19(1):24-31.

Lin L, Yihao T, Zhou F, Yin N, Qiang T, Haowen Z, et al. (2017): Inflammatory regulation by driving microglial M2 polarization: neuroprotective effects of cannabinoid receptor-2 activation in intracerebral hemorrhage. *Frontiers in immunology*;8:112.

Long LL, Song YM, Xu L, Yi F, Long HY, Zhou L, et al. (2014): Aberrant neuronal synaptic connectivity in CA1 area of the hippocampus from pilocarpine-induced epileptic rats observed by fluorogold. *Int J Clin Exp Med*;7(9):2687-2695.

López A, Aparicio N, Pazos MR, Grande MT, Barreda-Manso MA, Benito-Cuesta I, et al. (2018): Cannabinoid CB₂ receptors in the mouse brain: relevance for Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*;15(1):158.

Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijcklaar G (2009): A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav*;98(5):579-586.

O'Connell BK, Gloss D, Devinsk O (2017): Cannabinoids in treatment-resistant epilepsy: A review. *Epilepsy & Behavior*

Paxinos G (2012). Paxinos and Franklin's The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *Elsevier Academic Press*.

Tchekalarova J, da Conceição Machado K, Júnior ALG, Cavalcante, Ana Amélia de Carvalho Melo, Momchilova A, Tzoneva R (2018): Pharmacological characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene on seizure models in mice. *Seizure*;57:22-26.

Wallace MJ, Blair RE, Falenski KW, Martin BR, DeLorenzo RJ (2003): The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther*;307(1):129-137.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Eusko Jaurlaritzarengatik (BCG IT764-13) eta Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioarengatik MINECO/FEDER (SAF2015-65034-R; SAF2016/75959-R) finantziatuta dago. ITIk Euskal Herriko Unibertsitateko PhD kontratua jaso du (PIF 17/292).

Julian Romero jaunaren ikerketa taldeak eman ditu ikerketa honetarako ezinbestekoak izan diren animaliak.

THC fitokannabinoidearen inplikazioa sagu oozitoen heltze-prozesuan eta ernalketan

Totorikaguena, Lide; Olabarrieta, Estibaliz; Agirregoitia, Naiara eta Agirregoitia, Ekaitz

Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea

lide.totorikaguena@ehu.eus

Laburpena

Ugaztun emeen oozitoen heltze-prozesua ugalkortasunean garrantzia handia duen prozesu bat da, obulua ernaldia izateko beharrezkoa delako. Oozitoak obulutegiko folikuluetan sortzen dira eta lehenengo meiosiaren profasean daude geldituta, obulutegietan. Oraindik ez dira ondo ezagutzen meiosiaren berraktibazioa eragiten duten seinaleak baina hauei esker abiatuko da obulazioa non, emakumeen kasuan, hilero oozito bakarra obulutegitik irtengo den. Gero eta ebidentzia gehiago dago seinale horietako asko G proteinei loturiko hartzaileen (GPCR) menpe dagoela eta horien aktibazioak edo inaktibazioak oozitoen heltze-prozesua modulatzeko dituzten seinalizazio ur jauziak pizten dituztela. Gakoa da aurkitzea zeintzuk diren berpizkunde meiotikoa eragiten eta erregulatzen dituzten kanpo seinaleak, seinale horiek farmakoek bidez kontrolatuz heltze-prozesua ere kontrolatu genezakeelako. Horrela, ikusi da kannabinoideek eragiten duten seinaleztapena eta oozitoen heltze-prozesua hasteko gertatu behar dena berdina dela, beraz, prozesuan lagungarriak izan litezkeen lotugai interesgarriak ditugu. Gure ikerketa taldeak sistema kannabinoidearen funtzioa aztertu du sagu oozitoen heltze-prozesuan, ernalketan eta enbrioaren garapenean eta haren parte-hartzea baieztatzeaz gain, THC fitokannabinoideak sagu oozitoen heltze-prozesua modulatzeko duela ikusi du. Gainera, etorkizunerako kannabinoideen erabilera terapeutikoa aztertzen jarraitzea interesgarria litzateke, besteak beste, IVM medioetan osagai gisa erabilita. Nabarmendu behar da oozitoen in vitro heltzea askoz alternatiba onuragarriagoa, erosoagoa eta arrisku gutxiagokoa izango litzatekeela ugalkortasun klinika batera joan behar den edozein pazienterentzako, obarioen estimulaziorako beharrezkoak diren hormonak hartzea ekidindo litzatekeelako edo behintzat dosia murriztuko litzatekeelako. Are gehiago, hormonaren estimulazioa kontraindikatu dagoen emakumeentzako haurdunaldia lortzeko aukera bakarra izan ahalko litzateke.

Ugalkortasuna, oozitoen heltzea, IVM, sistema kannabinoidea, THC fitokannabinoidea

Abstract

Oocyte's maturation is a very important process in fertility. The oocyte meiotic maturation is a complex process whereby immature oocytes acquire the characteristics required for successful fertilization and embryogenesis. For that, immature oocytes arrested at the diplotene of prophase I (GV) must resume meiosis until the metaphase II of meiosis (MII). However, although all the mechanisms that leads for the reactivation of meiosis are not still known, there are known certain molecules that are able to modulate this process. In this sense, we are interested in the role that cannabinoids could have as IVM promoters because cannabinoid's molecular pathway is similar to the one by which oocyte's meiosis resumption is activated. That's why, our research team has studied the function of the cannabinoid system in the process of maturation, fertilization and embryo development in mice, and we have confirmed its participation. Beyond that, we have seen that in fact, the fitocannabinoid (THC) modulates oocyte maturation. The aim of this study was to characterize the role of the phytocannabinoid THC in the IVM process, due to its possible use in clinic is most feasible and reliable than any synthetic cannabinoid. The most important goal of IVM method is that could be the only hope or alternative for a not insignificant number of patients

Fertility, oocyte maturation, IVM, cannabinoid system, THC cannabinoid

1. Sarrera eta motibazioa

Ugalkortasun zentroen estatistikak aztertuta, ikusten da gero eta gehiago direla oozitoen *in vitro* heltzea (IVM) jasateko balizko egoeran dauden pazienteak. Baina, oraindik, IVM teknika berria da eta, duen arrakasta txikiagatik eta haren inguruan dagoen ezjakintasunagatik, gutxi erabiltzen da. Oozitoen *in vitro* heltzean, pazienteari hormonekin estimulatutako gabeko obarioetatik edo estimulazio txikia jaso duten obarioetatik, heldu gabeko oozitoak erauzten zaizkio eta hazkuntza-medioetan heltzen dira.

Ugaltun emeean, oozitoak obulutegiko folikuluetan sortzen dira. Enbrioi emeen obulutegietan, oozitoak lehenengo meiosiaren profasean daude geldituta eta seinale zehatzak jasotzen dituzten arte ez dira berpizten bigarren fase meiotikora heltzeko, meiosis I. profasean etenda daude obulazioa gertatu arte. Oozito horiek besikula germinal bezala izendatzen dira (GV). Hainbat hormona jariatzen direnean eta oraindik ondo ezagutzen ez diren seinale zehatzak jasotzen dituztenean hasiko da meiosiaren berraktibazioa. Hor abiatuko da obulazioa, non oozito bakarra obulutegitik irtengo den eta meiosiarekin jarraituko duen, lehenengo meiosis II. meiosiaren metafasea pasatuz (MII). Espermatozoide batek ernaldutako ahal izateko, oozitoa metafase IIan egon behar da eta, ernalketa gertatzen baldin bada, bukatuko da meiosis eta zigotoaren zatiketa mitotikoarekin enbrioiaren garapena abiatuko da (Rodríguez eta Farin 2003, Sun eta Nagai 2003).

Nahiz eta oraindik ezezagunak diren oozitoen heltze-prozesua pizten dituzten seinaleak, gero eta ziurtasun gehiago dago seinale horietako asko G proteinei loturiko hartzaileen (GPCR) menpe daudela (El Jouni eta lank., 2007) eta GPCR hartzaile horien aktibazioak edo inaktibazioak oozitoen heltze-prozesua modulatu dituzten seinalizazio ur jauziak pizten dituztela (Schindler, 2011). Beraz, gakoa da aurkitzea zeintzuk diren berpizkunde meiotikoa eragiten eta erregulatzen duten kanpo seinaleak, seinale horiek farmakoen bidez kontrolatuz gero, heltze-prozesua ere kontrolatu genezakeelako. Saguak deskribatu da meiosis geldirik mantenduko lukeen konstitutiboki aktiboa den GPCR-Gs den GPR3 hartzailea, hain zuzen. Ondorioz, hipotetiza daiteke meiosiaren heltze-prozesua indusituko lukeen hartzailearen bat egotea (GPCR-Gi dena) (Mehlmann, 2005) baina ez dira ondo ezagutzen zeintzuk izango liratekeen haien lotugaiak.

Orokorrean, konposatu kannabinoideek G proteinei (Gi/o) loturiko hartzaile espezifikoetan (CB1 eta CB2 hartzaile kannabinoideak) eragiten dute AC (adenilato ziklasa) inhibituz eta, ondorioz, AMPz-aren murrizketa eta protein kinasa A (PKA)-ren inhibizioa gertatzen da. Beste alde batetik, protein kinasa B (AKT) proteina aktibatuko dute PI3K-ren aktibazioaren bidez. Azkenik, beste hainbat kinasen fosforilazioan eta aktibazioan parte hartzen dute, hala nola, ERK proteinarenean (Dalton eta Howlett, 2011).

Barne-sistema kannabinoidea osatzen dute kannabinoide-hartzaileek, euren barne-estekatzailerek (barne-kannabinoideak) eta sintesi eta degradazio entzimek. Gorputzeko barne-kannabinoideen artean, N-arakidonoiletanolamina (anandamida; AEA) (Devane eta lank., 1992) eta 2-arakidonoilglizerola (2-AG) (Mechoulam eta lank., 1995) dira ezagunenak eta konposatu horiek 1 motako hartzaile kannabinoidea (CB1) eta 2 motako hartzaile kannabinoidea (CB2) deituriko hartzaileetara lotzen dira.

CB1 eta CB2 hartzailak G proteina inhibitzaileei loturiko hartzailak dira eta mintz plasmatikoa zeharkatzen duten 7 α -helizez osatuta daude.

Fitokannabinoideak *Cannabis sativa L.* landaretik eratorriak diren konposatu lipofilikoak dira. 60. hamarkadan hasi ziren indarra hartzen kannabinoideekin egindako ikerketak, kannabis landarearen Δ^9 -tetrahidrocannabinola (THC) purifikatu eta deskribatu zenean. THC da efektu bioaktiboen arduradun nagusia eta kannabinoide ugariena (Elsohly eta Slade, 2005).

2. Arloko egoera eta helburuak

Sistema kannabinoidea ugalkortasunean inplikaturik dagoela ikusi da: gametogenesis, ernalketan, enbrioaren ezarpena, plazentazioan, haurdunaldian eta erditzean (Battista, eta lank. 2008, Maccarrone 2009) eta sistema kannabinoidean parte hartzen duen makinaria guztia ugal-aparatuko organo, ehun eta zeluletan dagoela frogatu da. Gure taldeak, hala nola, sistema kannabinoidea bai giza oozitoetan eta granulosetan (Peralta eta lank., 2011, Agirregoitia, et al. 2015, Agirregoitia, eta lank. 2016) zein behien oozitoetan espresatzen dela deskribatu du (Lopez-Cardona eta lank., 2016) baina oraindik oso gutxi dakigu barne-sistema kannabinoidearen funtzioari, jardunari eta eraginari buruz oozitoen heldutasunarekin edota ernalketan. Horregatik, gizakiekin lan egiteak dakartzen mugengatik gizakiekin ez ezik saguekin lan egiten jarraitu du taldeak, zehazki kannabinoide sintetikoek (HU-210) nola jarduten duten oozitoen heldutasunarekin eta zer nolako eragina duten ernalketan. Gainera, CB1 eta CB2 hartzailentzako *knockout* (KO) saguen sorrerak kannabinoideen seinalizazioaren eraginari buruzko informazio gehiago lortzeko aukera eskaini digu.

Egin diren ikerketa urriek frogatzen dute kannabinoideak heldute-prozesua modulatu lezaketela: alde batetik, anandamida (AEA) barne-kannabinoidearen kontzentrazioa emendatuz doa likido folikularrean giza oozitoen heldute-prozesuan (El-Talantini eta lank., 2009). Beste alde batetik, gure ikerketa-taldeak sistema kannabinoidea deskribatu du giza oozitoetan eta granulosetan meiosisaren berraktibazioan, era berean, oozitoen heldutasunarekin kannabinoide-hartzailen lokalizazioan aldaketak daudela baieztatu digu. (Peralta eta lank., 2011, Agirregoitia eta lank., 2015, Agirregoitia eta lank., 2016).

Aurrekariak kontutan hartuta, gure ikerketa lanean aurrera egiteko, alde batetik, THC fitokannabinoidearen eragina aztertu da bai oozitoen heldute-prozesuan, PI3K/Akt eta MAP kinasen (MAPK) bidezko seinaleztapenean ERK proteina bidez nola eragiten duen behatuz eta baita geroko ernalketa prozesuan ere, blastozistoen kopuruari erreparatuz. Beste alde batetik, THC fitokannabinoidearen eragina aztertu da oozitoen heldute-prozesuan eta ernalketan baina, kasu honetan, hormonatu gabeko sagu prepubereen oozitoetan.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

3.1. CB1 eta CB2 hartzaileen lokalizazioaren dinamika saguen oozitoen meiosiaren beraktibazioan eta madurazio nuklearrean THCren presentzia

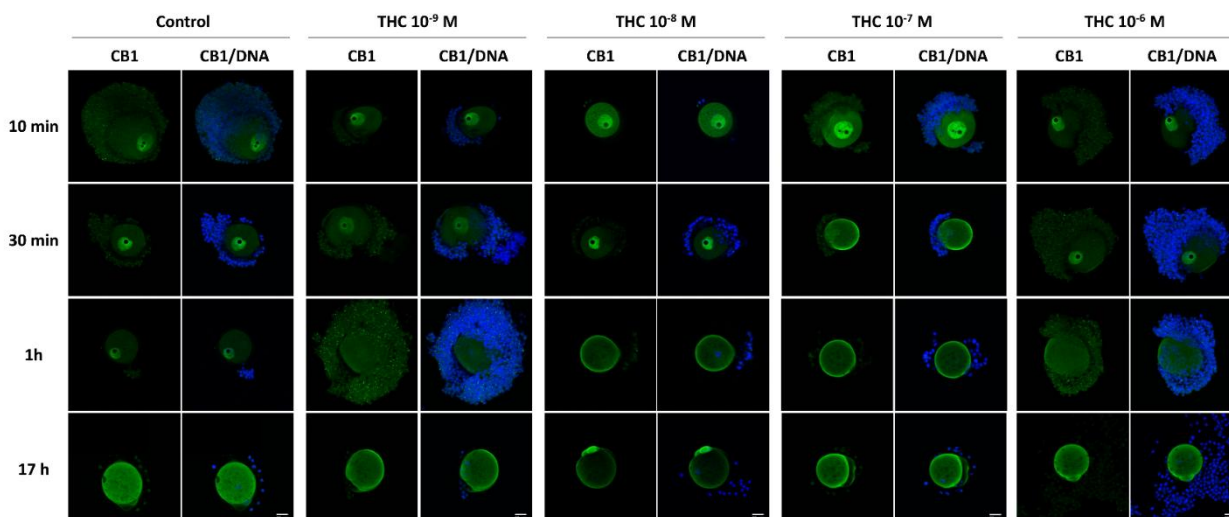
Oozitoen heltze-prozesuan barne kannabinoideen rola ulertzeko, CB1 eta CB2 hartzaileen presentzia aztertu zen sagu oozitoetan THC fitokannabinoidearekin *in vitro* heldu ondoren.

López-Cardonak eta gure taldekideek (2016) behi emearen oozitoetan frogatu zuten exokannabinoideak heltze-medioan gehitzailearen oozitoen madurazio nuklearraren abiadura aldatzen zela, GVtik MI fasera azkarrago pasatuz. Saguekin egindako esperimenduetan ere efektu berdina ondorioztatu genuen, kannabinoideek *in vitro* heldutako oozitoen meiosiaren berraktibazioa indusitzen dutela, alegia.

Ikusteko THC fitokannabinoideak eraginik duen hartzaile kannabinoideen lokalizazioan, oozito heldugabeak THC goranzko kontzentrazioekin inkubatu genituen 17 orduz eta hainbat denbora tartetan fixatu genituen (10 minutu, 30 minutu, ordu 1 eta 17 ordu) CB1 eta CB2 hartzaileen lokalizazio patroia ikusteko. Oozitoen fase nuklearrak sailkatu ziren, hurrenez hurren, GV, MI eta MII faseetan.

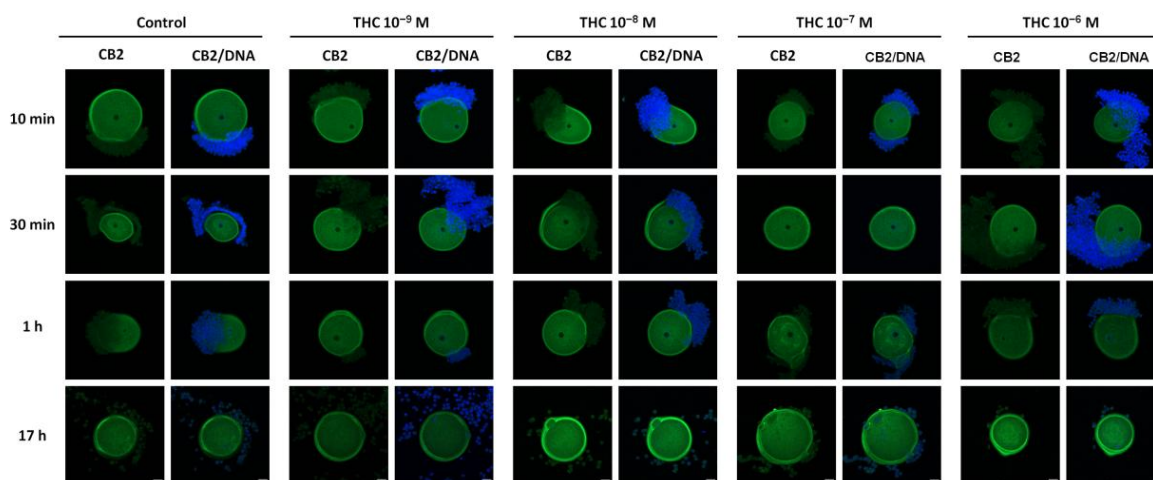
Oozito heldugabeetan CB1 hartzailea homogeneoki banatuta agertzen da GV fasean eta meiosiaren beraktibazioan periferiarantz mugitzen hasten da (1. irudiko kontrola). Hala ere, THC kontzentrazio desberdinak gehitzailearen berlokizazioa aurreratzen da kontrolarekin alderatuta. Horrela, THC kontzentrazio guztietan (10^{-9} M –tik 10^{-6} M-ra) ordu batera CB1 hartzailea ez da adierazten GV-aren inguruan eta, zehazki, 10^{-7} M kontzentrazioarekin azkartu egiten da berlokizazioa 30 minututan (1. irudia).

1. irudia. CB1 hartzailearen immunolokalizazioa sagu-oozitoen heltze-prozesuan. Oozito heldugabeak *in vitro* kultibatu ziren THC-ren ausentzia eta presentzia 1 nM (10^{-9} M), 10 nM (10^{-8} M), 100 nM (10^{-7} M) eta 1 μ M (10^{-6} M) kontzentrazioetan hainbat denbora tartetan: 10 min, 30 min, 1h and 17 h. CB1 hartzailearen distribuzioa, berdez. Hoechst DNA-markatzailea, urdinez. n = 5 Erreferentzia barra: 25 μ m.



THC-ren eginkizuna ulertzen jarraitzeko, eta CB1 hartzailearen lokalizazioa zehaztu ondoren, fitokannabinoide honek CB2 hartzailearengan zeukan efektua aztertzeari ekin genion. CB1 hartzaileako prozedura berdina jarraitu genuen. Hala ere, CB2 hartzaileak banaketa homogenea erakusten zuen oozitoan zehar, periferian tindaketa intentsitate altuagoa zuelarik bai THC kontzentrazio desberdinetan bai THC gehitu ez zaionean ere (2. irudia).

2. irudia. CB2 hartzailearen immunolokalizazioa sagu-oozitoen heltze-prozesuan. Oozito heldugabeak *in vitro* kultibatu ziren THC-ren ausentzian eta presentzian 1 nM (10^{-9} M), 10 nM (10^{-8} M), 100 nM (10^{-7} M) eta 1 μ M (10^{-6} M) kontzentrazioetan hainbat denbora tartetan: 10 min, 30 min, 1h and 17 h. CB1 hartzailearen distribuzioa, berdez. Hoechst DNA-markatzailea, urdinez. n = 5 Erreferentzia barra: 20 μ m.



3.2. ERK-ren fosforilazio patroia sagu oozitoen *in vitro* heltze-prozesuan

MAPK bidezko seinaleztapenak funtzio garrantzitsua betetzen du oozitoen heltze prozesuan, ERK-ren fosforilazioak eta desfosforilazioak oozitoarentzako garrantzitsua diren seinaleak modulatzeko dituelako (Sanchez eta Smits 2012). Bidezidor hori kannabinoideek ere modulatzeko dutela jakina denez (López-Cardona et al., 2016), heltze-medioan THC fitokannabinoidea gehitu genuen egiaztatzeko CB1 eta CB2 hartzaileen aktibazioak ERK-ren fosforilazio patroian eragin zezakeen oozitoaren heltze-prozesuan zehar eta kontrolarekin alderatu genuen (dimetil sulfoxidoa, DMSO, garraiatzailea soilik duen media).

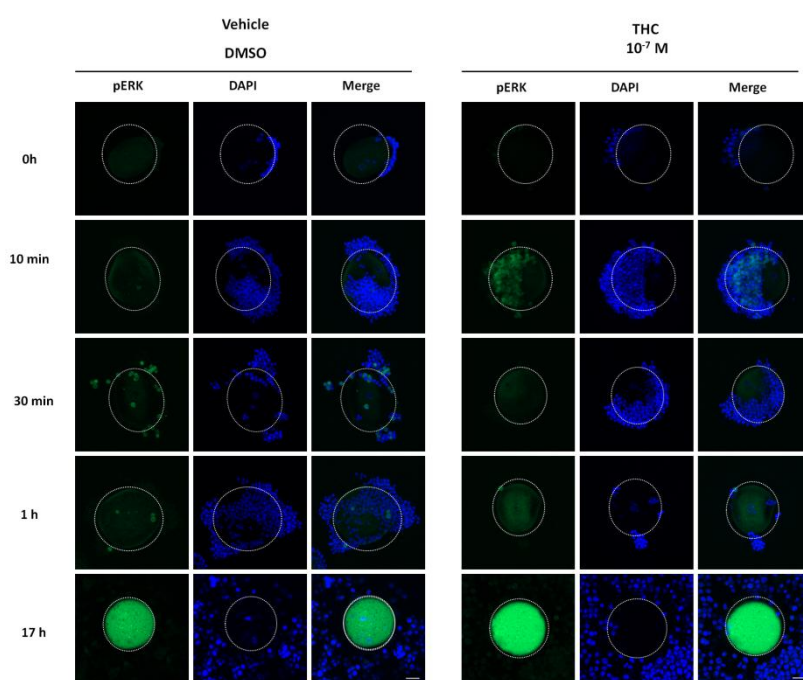
Oozitoen heltze-prozesuan zehar hartzaile kannabinoideen lokalizazioan ondorioztaturiko emaitzen arabera, kontrolarekin alderatuta aldaketa gehien ekarri dituen THC kontzentrazioa erabili zen (10^{-7} M) gainontzeko esperimentuetarako.

Alde batetik, oozitoak hainbat denbora tartetan fixatu genituen (10 minutu, 30 minutu, ordu 1 eta 17 ordu) 10^{-7} M kontzentrazioekin *in vitro* heldu ondoren. Oozito heldugabeetan ERK desfosforilatuta agertzen da baina 17 ordutara (sagu oozitoetan heltzeko behar den denbora) ERK oozitoan agertzen da fosforilatuta. 10 minututara, ERK fosforilaturik ageri da bakarrik granulosa zeluletan THC-ren presentzian inkubatu diren oozitoetan. 30 minutu igaro arte ez zen ikusi fosforilaziorik kontroleko granulosa zeluletan. Hala ere, denbora tarte berdinean THC-ren presentzian

inkubatutako oozitoen kasuan, granulosa-zelulak desfosforilatuta ageri dira baina oozito barnean, ordea, ERK fosforilatuta agertzen hasten da. Ordu batera, THC-rekin heldutako oozitoen kasuan, ERK-ren fosforilazioak intentsitate altuagoa dauka kontrolarekin konparatuz (3. irudia).

Hartzaile kannabinoideak falta zitzaizkien *knock out* saguak erabiltzean (CB1^{-/-}, CB2^{-/-} y CB1^{-/-}/CB2^{-/-}), ez zen desberdintasunik antzeman ERK-ren fosforilazio patroian THC-ren ausentzian eta presentzian heldutako oozitoen artean. Hori dela eta, ondorioztatu genezake bai CB1 bai CB2 hartzaileek parte hartzen dutela THC-ren bidezko modulazioan.

3. irudia. ERK proteinaren aktibazioa sagu-oozitoen madurazio nuklearrean zehar, oozito heldugabeak a) DMSO-rekin b) THC 100 nM-eko kontzentrazioarekin *in vitro* inkubatu ondoren 17 h-z. ERK- ren fosforilazioa 10 min, 30 min, 1h eta 17h-tan ikusi zen, berdez. DNA-markatzailea, urdinez. Erreferentzia barra: 20 μ m.

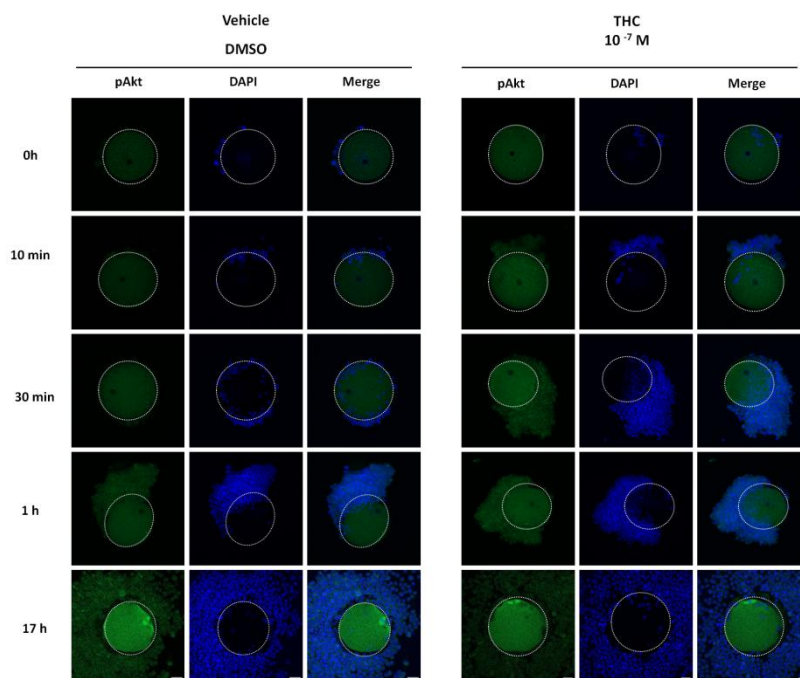


3.3. AKT-ren fosforilazio patroia sagu oozitoen *in vitro* heltze-prozesuan

PI3K/AKT bidezidorraren seinaleztapenak ere rol garrantzitsua dauka oozitoen heltzean (Cecconi eta lank. 2012) AKT-ren jarduera altua beharrezkoa baita meiosia beraktibatzeke. Gainera, proteina kinasa hau ere kannabinoideek modulatzeko dutela jakinda, THC erabili zen ikusteko oozitoen heltze prozesuan zehar CB1 eta CB2 hartzaileen aktibazioak eraginik zuen AKT-ren seinaleztapenean, esaterako, fosforilazioa azkartuz DMSO-rekin inkubatutako oozitoekin alderatuta. Horretarako, aurreko esperimentuan bezala, oozitoak hainbat denbora tartetan fixatu genituen (10 minutu, 30 minutu, ordu 1 eta 17 ordu) THC 10^{-7} M kontzentrazioekin *in vitro* heldu ondoren. Kasu honetan, AKT-ren fosforilazio patroian desberdinatsunak ikusi genituen kontrolaren eta THC-rekin inkubatutako oozitoen artean, 10 eta 30 minututan granulosa zeluletan fosforilatuta agertzen delako. Hala ere, oozitoen kasuan fosforilazio patroia antzerako zen bai THC-rekin bai THC gabe inkubatu zenean (4. irudia).

Kasu honetan ere, hartzaile kannabinoideak falta zitzaizkien *knock out* saguak erabiltzean (CB1^{-/-}, CB2^{-/-} y CB1^{-/-}/CB2^{-/-}), ez zen desberdintasunik antzeman AKT-ren fosforilazio patroian THC-ren ausentzian eta presentzian heldutako oozitoen artean. Modu honetan, esan genezake THC-ren bidezko modulazioan bi hartzaile kannabinoideek parte hartzen dutela.

4. irudia. AKT proteinaren aktibazioa sagu-oozitoen madurazio nuklearrean zehar, oozito heldugabeak a) DMSOrekin b) THC 100 nM-eko kontzentrazioarekin *in vitro* inkubatu ondoren 17 h-z. AKT-ren fosforilazioa 10 min, 30 min, 1h eta 17h-tan ikusi zen, berdez. DNA-markatzailea, urdinez. Erreferentzia barra: 20 µm.



3.4. THC-ren presentzian heldutako oozitoetatik eratorritako enbrioi-tasa.

Gure hurrengo helburua izan zen behatzea ea ernalketan eta enbrioiaren garapenean eraginik zuen THC-ren presentziak oozitoen heltze-prozesuan.

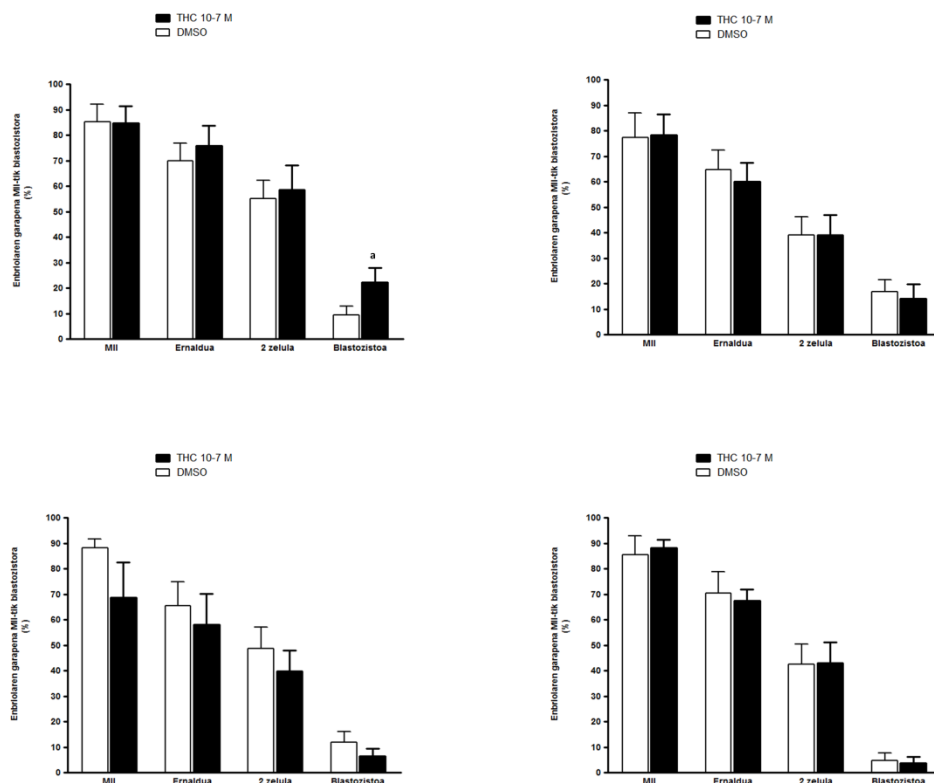
Kontuan izanda CB1 hartzailearen berlokalizazioan eta bai ERK-ren eta AKT-ren fosforilazio patroietan aztertutako emaitzak, aldaketa handienak eragin zituen THC kontzentrazioa erabili genuen gainontzeko esperimentuetarako (10^{-7} M). Horrela, 17 orduz (sagu oozitoen heltze-prozesurako batez besteko denbora) inkubatu genituen oozitoak THC 10^{-7} M kontzentrazioarekin eta THC-rik gabe eta, ondoren, *in vitro* ernalkuntza egin genuen (IVF). Saguetan, *in vivo* heldu ziren oozitoen heltze-fase zein IVF geroko enbrioi-fase guztietan %80tik gora mantendu ziren eta horrek erakusten du *in vitro* ernalkuntza ondo eginda dagoela. Oozitoak *in vivo* heltzean emaitzak askoz hobeak direla ikus daiteke, blastozistora enbrioi gehienak heltzen direlako baina, *in vitro* heldu diren oozitoetan, ernaldu diren zelulen beherakada eta blastozistoen kopuru urria nabarmenak dira, espero bezala (Epigg J.J. eta lank. 1992).

THC-rekin egindako inkubazioan ez zen aldaketa adierazgarririk ikusi oozito helduetan (MII), ernaldutako zigotoetan eta 2 zeluletako enbrioietan garraiatzailearekin inkubaturiko oozitoekin konparatzerakoan. Hala ere, THC-rekin (10^{-7} M) heldutako *wild type* saguetan blastozistora iritsi zirenen portzentajea bikoiztu zen, THC gabe inkubatutakoekin konparatuz gero (5.A irudia).

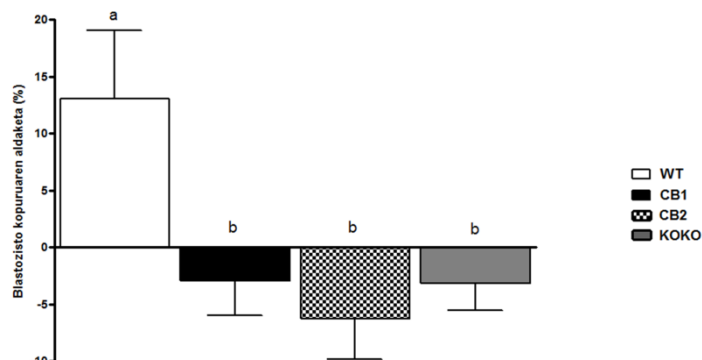
Jakiteko THC-ren eragina CB1 edo CB2 hartzaileen bidezkoa zen, hartzaile kannabinoideak falta zitzaizkien *knock out* saguen (CB1^{-/-}, CB2^{-/-} y CB1^{-/-}/CB2^{-/-}) oozitoak ere *in vitro* heldu genituen eta ondoren IVF teknika erabili genuen (*wild type* arren espermatozoideekin).

Ez zen hobekuntzarik ikusi blastozisto kopuruari dagokionez THC-rekin eta garraiatzailearekin trataturiko oozitoen artean edozein genotiporentzako (5B, C eta D irudiak). Hala ere, blastozistoen ehunekoen aldaketari erreparatuz gero kontrolaren eta tratamenduaren artean genotipo bakoitzarekiko, bai CB1 eta bai CB2 hartzaileen faltak blastozistoen beherakada eragin zuen (6. irudia). Modu honetan, frogatu ahal izan genuen THC-k bi hartzaile kannabinoideen bidez lan egiten duela, hartzaile haugariko bat edo biak falta direnean ez delako lortzen blastozisto kopurua emendatzea fitokannabinoidea gehituz kontrolarekin alderatuz.

5. irudia. a) *wild type*, b) *Cnr1*^{-/-}, c) *Cnr2*^{-/-} eta d) *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-} genotipoa duten saguen oozitoak *in vitro* heldu ondoren lortzen diren blastozisto kopurua. *In vitro* heldutako oozitoen kontrola THC gehitu gabe baina garraiatzailea (DMSO) gehituta egin da (zutabe zuria). THC 10^{-7} M-eko kontzentrazioarekin *in vitro* inkubatu diren oozitoak agertzen dira (zutabe beltza). n=9. Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a): p<0.001 izanik.



6. irudia. Blastozisto kopurua aldaketa kontrolaren eta tratamenduaren artean. Blastozistoen ehunekoan aldaketak genotipo desberdineko sagu oozitoak erabilita WT (zuria), Cnr1-/- (beltza), Cnr2-/- (puntuduna) eta Cnr1-/-/Cnr2-/- (grisa). Emaizak batez bestekoa eta batez besteko errore estandarrekin adierazita daude. n=9. Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a), (b): $p < 0.05$ izanik.



3.5. THC-ren efektua sagu prepubereen oozito heldugabeen *in vitro* heltze-prozesuan

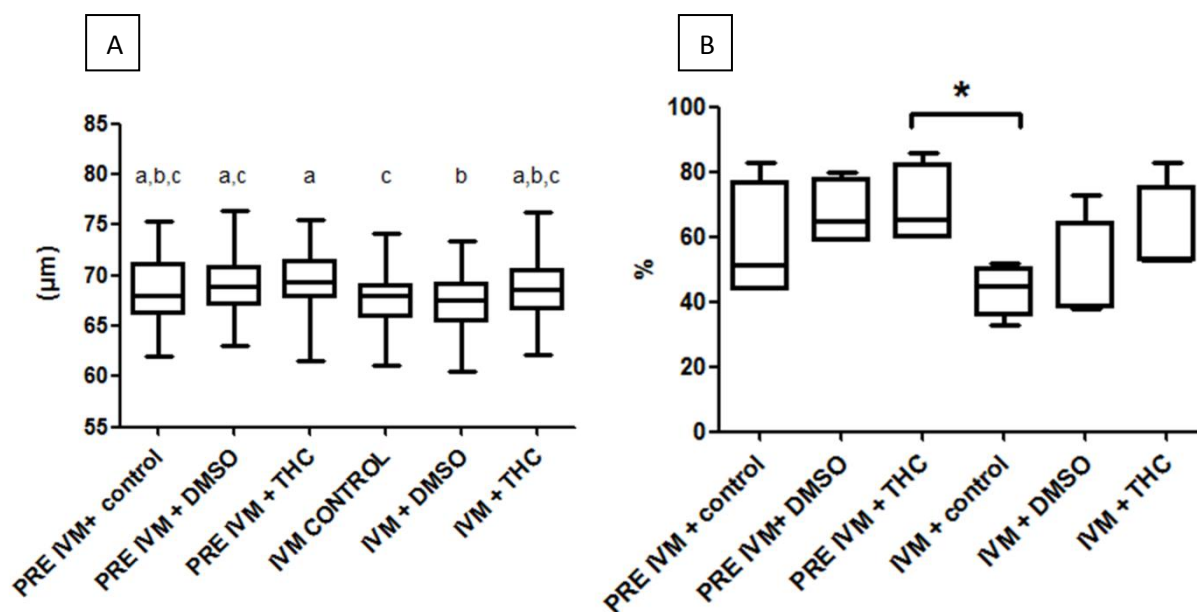
IVM programetan egindako azken behaketek erakutsi dute oozitoen ehuneko handi batek ez duela lortzen enbriogenesi normal bat aurrera eramateko gaitasuna edo garapen-kompetentzia (Sanchez F. eta lank., 2015) eta, horregatik, beharrezkoa ikusi da heltze-prozesuaren aurreko etapari ere arreta eskaintzea (Pre-IVM). Horretarako, kompetentzia sexuala garatu ez duten saguen oozito heldugabeak erabili ziren (29 eguneko saguak) heltze-prozesuaren aurreko etapa horretan azterketak egiteko. Oozitoaren heltze-prozesu egoki baten adierazleetariko batzuk dira oozitoaren diametroaren neurria eta korpuskulu polarren eratzea. Griffin eta lankideen ikerketen arabera (2006) sagu oozitoen diametroa batezbestez $72 \mu\text{m}$ -koa da Graaf folikulutik (edo folikulu antraletik) askatzerakoan obulazioan eta kontuan izan behar da sagu prepubereen oozitoak folikulu antral goiztiarretik eratorriak direla ($70 \mu\text{m}$, Griffin eta lank., 2006)).

Sagu prepubereen oozito heldugabeak tratamendu desberdinekin inkubatu ziren. Alde batetik, batzuk heltze-medioan jarri aurretik 48 orduz inkubatu ziren C-motako Natriuretic Peptidoaren (CNP) presentzian, oozitoak GV fasean geratu ahal izateko blokeatuta. Horrela, bai madurazio nuklearra bai zitoplasmatikoa sinkronizatzeko denbora eman ziezaion oozitoaren nukleo-gaitasuna eta garapen-kompetentzia (Noguiera D., eta lank. 2006, Vanhoutte L eta lank., 2007). Ondoren, Pre-IVM fasean inkubatu ziren oozito heldugabeak eta aurreko tratamendu hau jaso ez zuten oozito heldugabeak *in vitro* heltze-medioetan jarri ziren tratamendu desberdinekin: Kontrola (DMSO eta THC gabe), DMSO-rekin eta THC-rekin.

Emaizta egokienak bai oozitoaren diametroari zegokionez (4A irudia) bai korpuskulu polarren portzentajeari zegokionez ere (4B irudia) Pre-IVM etapa pasatu zuten oozitoek aurkezten zituzten eta gainera adierazgarria da 48 h ondoren THC-rekin heldu ziren oozitoek dituztela emaitza onenak Pre-IVM etapatik igaro ez diren oozitoekin alderatuta ($p < 0,05$), zeinetan oozitoaren diametroak honako hauek izan ziren: $68,387 \mu\text{m} \pm 0,359$; $68,94 \mu\text{m} \pm 0,33$; $69,33 \mu\text{m} \pm 0,40$; $67,51 \mu\text{m} \pm 0,365$; $67,29$

$\mu\text{m} \pm 0,350$; $68,65 \mu\text{m} \pm 0,340$ Pre-IVM kontrola, Pre-IVM DMSO, Pre-IVM THC, IVM kontrola, IVM DMSO, IVM THC-rako. (4A irudia). Korpuskulu polarren ehunekoak: %57,5; %67,25; %69,25; %43,75; %47,25; %60,5 Pre-IVM kontrola, Pre-IVM DMSO, Pre-IVM THC, IVM kontrola, IVM DMSO, IVM THC-rako. (4B irudia).

4. irudia. *Wild type*, genotipoa duten sagu prepubereen oozitoak *in vitro* heldu ondoren lortzen diren oozito helduen diametroa (A) eta korpuskulu polarren neurria (B). Tratamendu desberdinetan kultibatu dira; oozito batzuk Pre-IVM tratamenduan egon dira *in vitro* heldu aurretik eta ondoren DMSO edo THC 10^{-7} M-eko kontzentrazioarekin *in vitro* inkubatu dira. Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a): $p < 0.001$ izanik. (b) asteriskoarekin.

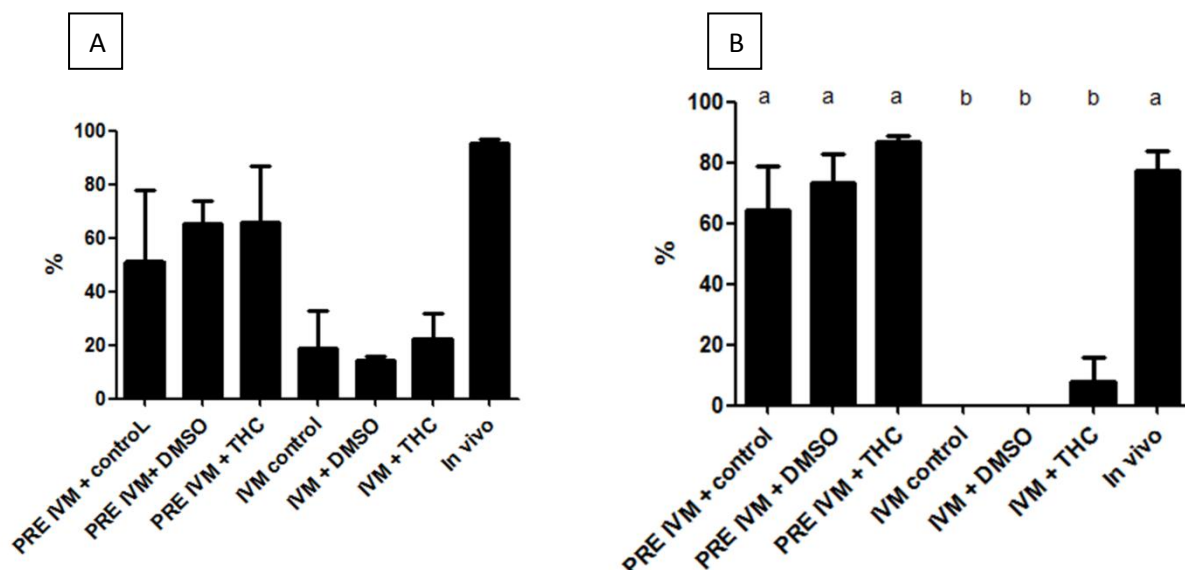


3.6. IVF geroko enbrioi kopuruan eragina sagu prepubereen oozitoak THC-ren presentzian *in vitro* heldu ondoren

Hurrengo helburua izan zen behatzea nolako garapen-kompetentzia lortzen zuten sagu prepubereen oozito heldugabeek ernalduak izateko. Kasu honetan ere, sagu prepubereen oozito heldugabeak erabili ziren (29 eguneko saguak) eta oozito horiek tratamendu desberdinetan inkubatu ziren. Aurrekoan bezala, batzuk Pre-IVM fasean inkubatu ziren 48 orduz eta ondoren, heltze-medioan jarri ziren DMSO gabe, DMSOrekin eta THCekin. Gainontzekoak zuzenean inkubatu ziren lehengo 3 tratamenduekin heltze-medio batean. Azkenik, oozito heldu horiek ernaldu ziren IVF teknika erabilita.

Aurreko esperimentuek erakutsi zuten bezala, garapen-kompetentzia altuena lortu zuten oozitoetatik era adierazgarrian lortu zen blastozisto kopuru altuena, ia *in vivo* tratamenduko blastozisto kopururaino helduz ($p < 0,01$). (5b irudia).

5. irudia. Sagu prepubereen oozitoak THC-ren presentzia (10^{-7} M) edo ausentzia *in vitro* heldu ondoren eta, IVF egin ondorengo enbrio-garapenaren etapa bakoitzeko kopurua: 2 zelulako enbrioia (A), blastozistoa (B). Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a): $p < 0.001$ izanik.



3.7. IVF geroko enbrioiaaren kalitatean eragina sagu prepubereen oozitoak THC-ren presentzia *in vitro* heldu ondoren.

Azken helburua enbrioien kalitateari erreparatzea izan zen. Horretarako, blastozistoen morfologia eduki genuen kontuan. Sagu prepubereen oozito heldugabeak tratamendu desberdinetan inkubatu ziren eta ondoren IVF teknika erabili zen aurreko atalean azaldu bezala.

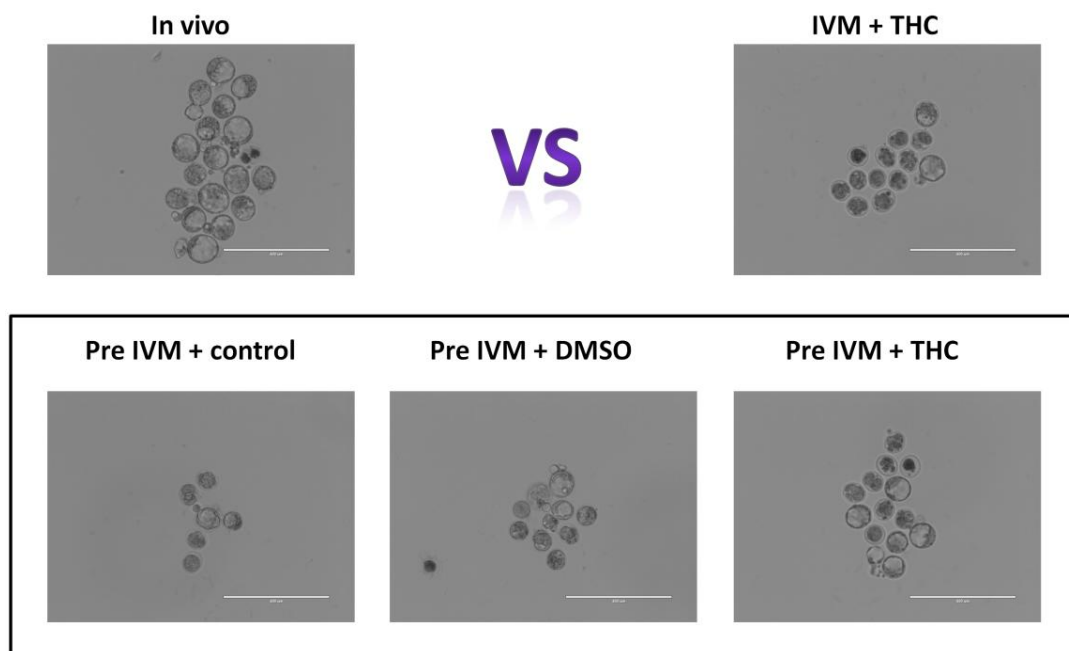
Pre-IVM kultibo fasean egon ziren zigotoetatik erdia baino gehiago heldu zen blastozisto etapara. Ordea, zuzenean heldu-medioan inkubatu zirenetatik, zigotetik blastozistora garatzea lortu zutenen tratamenduetatik bakararra mediora THC gehitu zitzaiona izan zen.

Morfologiari dagokionez, blastozisto egoeran, errez bereiztu daitezke sortu berri diren bi zelula mota: alde batetik, blastozistoa osatzen duten kanpoaldeko zelulak, trofoektodermo bezala ezagutzen direnak, eta bestetik, blastozistoen barruan dauden zelulak, blastozistoen polo batean barruko zelula-multzoa osatzen dutenak (*Inner cell mass*, ICM). ICM 3 mailatan bereiz daiteke kalitatearen arabera (Gardner eta Schoolcraft, 1999; Alpha Scientists in Reproductive Medicine eta ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011): maila oneneko ICM (1) hertsiki loturik dauden zelula askoz osatuta dago, erdi-mailako ICM (2) arinki loturik dauden zelula batzuek osatuta dago eta, maila txarreneko ICM (3) arinki elkartuak dauden zelula gutxi batzuek. Gainera, blastozistoen zelulen ratioa trofoektodermoa eta ICM-rentzako 2:1 izaten da (Kang eta Lank, 2013).

6. irudian ikusi daitekeenez, *in vivo* tratamenduarekin konparatuta, antz handiagoa dutenak orokorrean Pre-IVM tratamendua izan duten enbrioia dira. ICM-ko zelulak konpaktatuta ageri dira eta blastozistoen ertz batean kokatzen dira, ondo identifikatzen delarik. Hala ere, kontrola eta garraiatzailea gehitu zaien medioetan egon diren oozitoetatik heldu diren blastozistoen tamaina txikia

da eta trofoektodermoa eta ICM ez dira behar bezala bereizten. THC-rekin inkubatu direnetatik, aldiz, blastozistoez morfologia egokia erakuste dute, bai ICM eta trofoektodermoa aise desberdintzen direlako baita trofoektodermoak eta ICM-k 2:1 ratioa betetzen dutelako ere.

6. irudia. Sagu prepubereen oozitoak THC-ren presentzian (10^{-7} M) edo ausentzian *in vitro* heldu ondoren eta, IVF egin ondorengo enbrioien kalitatea.



4. Ondorioak

Emaitzek erakusten dute THC fitokannabinoideak sagu oozitoen heltze-prozesua modulatzeko duela eta, horren ondorioz, geroko ernalketan eta enbrioien garapena. Are gehiago, badirudi THC fitokannabinoideak baduela eragina, esaterako, heltze prozesuan bai CB1 hartzailearen lokalizazioan baita MAPK eta PI3K/AKT bidezidorretan parte hartzen duten ERK eta AKT proteinen fosforilazio patroiaren ere eta azkenik blastozisto kopuruaren emendioan. Gainera, CB1 eta CB2 hartzaile kannabinoideen gabeziak enbrioien garapenean negatiboki eragiten du. Amaitzeko, oraindik eta garapen maila baxuagoa duten oozitoak erabilita hormonarik jaso ez duten sagu prepubereetan ere emaitza hobeak lortu dira THC-ren presentzian heldu direnean.

5. Etorkizunerako planteatzeko den norabidea

Interesgarria litzateke kannabinoideen eragin terapeutikoa aztertzen jarraitzea, besteak beste, IVM medioetan osagai gisa erabilita. Gainera, kannabinoide sintetikoekin alderatuta landareetatik eratorritako THC fitokannabinoide naturala erabiltzeak abantaila gehiago eskainiko litzateke. Bestalde, nabarmentzekoa da oozitoen *in vitro* heltzeak ugalkortasun klinikara jo behar duen emakumeen bizikaltatea hobetuko lukeela askoz aukera onuragarriagoa, erosoagoa eta arrisku gutxiagokoa izango litzatekeelako, obarioen estimulaziorako beharrezkoak diren hormonak hartzea ekidindo litzatekeelako edo behintzat dosia murriztuko litzatekeelako (Söderström-Anttila, et al. 2005). Modu honetan,

ugalketan pausorik arriskutsuena dena saihestuko litzateke, hormona-hartzeak kalte handia eragiten duelako pazientearengan eta albo-ondorio larriak dakartzalako (Cousineau and Domar 2007). Are gehiago, hormonon estimulazioa kontraindikatu dagoen emakumeentzako haurdunaldia lortzeko aukera bakarra izan ahalko litzateke (Söderström-Anttila, et al. 2005). Gainera, beste zenbait pazi ziklo bakoitzeko kostu ekonomikoa ere murriztuko litzateke (Söderström-Anttila, et al. 2005).

6. Erreferentziak

- Agirregoitia, E, Ibarra-Lecue I, Totorikaguena L, Mendoza R, Expósito A, Matorras R, Urigüen L, eta Agirregoitia N. 2015. Dynamics of expression and localization of the cannabinoid system in granulosa cells during oocyte nuclear maturation. *Fertility Sterility* 104 753-760.
- Agirregoitia, E, Totorikaguena L, Exposito A, Mendoza R, Matorras R, eta Agirregoitia N. 2016. Dynamic of expression and localization of cannabinoid-degrading enzymes FAAH and MGLL in relation to CB1 during meiotic maturation of human oocytes. *Cell and Tissue Research*.
- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. 2011. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* ;26:1270-1283.
- Battista, N, Rapino C, Di Tommaso M, Bari M, Pasquariello N, eta Maccarrone M. 2008. Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Molecular and Celular Endocrinology* 286 S17-S23.
- Cecconi, S., Mauro, A., Cellini, V., and Patacchiola, F. 2012. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *The International. Journal of Developmental Biology*. Bid. 56, 809-817
- Dalton GD, Howlett AC. 2012. Cannabinoid CB1 receptors transactivate multiple receptor tyrosine kinases and regulate serine/threonine kinases to activate ERK in neuronal cells. *British Journal of Pharmacology*. (8):2497-511.
- Devane, WA, L Hanus, A Breuer, RG Pertwee, LA Stevenson, G Griffin, D Gibson, A Mandelbaum, A Etinger, eta R Mechoulam. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258 1946-1949.
- Elsohly MA, Slade D. 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Science*.;78(5):539-48. Review.
- Eppig J.J., Schroeder A.C. & O'Brien M.J. 1992. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95 (1), 119-27
- El-Jouni W., Haun S., Hodeify R., Hosein Walker A., Machaca K. 2007. Vesicular traffic at the cell membrane regulates oocyte meiotic arrest. *Development*; 134 (18):3307-15.
- El-Talatini MR, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC & Konje JC. 2009a. Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS ONE* 4 e4579.
- Gardner DK, Schoolcraft WB. 1999. Cultur and transfer of human blastocysts. *Current opinion in obstetrics and Gynecology*. Jun;11(3):307-11. Review.
- Griffin J, Emery BR., Huang I., Peterson C.M., Carrell D.T.,. 2006. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*. Mar 1;3:2.
- Kang M., Piliszek A, Artus J., Hadjantonakis AK.,. 2013. FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development* 140: 267-279.
- López-Cardona, M J Sánchez-Calabuig, P Beltran-Breña N Agirregoitia, D Rizos, E Agirregoitia and A Gutierrez-Adán. 2016. Exocannabinoids effect on in vitro bovine oocyte maturation via activation of AKT and ERK1/2. *Society for Reproduction and Fertility*
- Maccarrone, M. 2009. Endocannabinoids: friends and foes of reproduction. *Progress in lipid research* 48 344-354

- Mechoulam, R, S Ben-Shabat, L Hanus, M Ligumsky, NE Kaminski, AR Schatz, A Gopher, S Almog, BR Martin, and DR Compton. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology* 50 83-90.
- Mehlmann LM. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* , 130 (6):791-9.
- Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Cortvrindt R, Smits J.2006. Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biology of Reproduction*; 74:177–184.
- Peralta L, Agirreagoitia E, Mendoza R, Exposito A, Casis L, Matorras R eta Agirreagoitia N. 2011. Expression and localization of cannabinoid receptors in human immature oocytes and unfertilized metaphase-II oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 23 372–379 .
- Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida IA y FIV/ICSI 2014. www.registrosef.com
- Rodriguez, KF, and CE Farin. 2003. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction, Fertility and Development* 16 55-67.
- Sánchez F, Smits J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. Dec;1822(12):1896-912
- Sanchez F, Romero S, De Vos M, Verheyen G, Smits J. 2015. Human cumulusenclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity. *Human Reproduction*. 30:1396–1409.
- Schindler K. 2011..Protein kinases and protein phosphatases that regulate meiotic maturation in mouse oocytes. *Results and Problem in Cell Differentiation*; 53:309-41.
- Söderström-Anttila, V, S Mäkinen, T Tuuri, and A-M Suikkari. 2005. Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients. *Human Reproduction*. 20 1534-1540.
- Sun, Q-Y, and T Nagai. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development* 49 347-359.
- Vanhoutte L, De Sutter P, Nogueira D, Gerris J, Dhont M, Van der Elst J.2007. Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. *Human Reproduction*; 22:1239–1246.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau UPV/EHUko Medikuntza eta Erizaintzako Fakultateko Fisiologia Sailean eta Bruselako *Vrije Universiteit Brussel* unibertsitateko laborategian burutu da. Euskal Herriko Unibertsitateak emandako beka bati esker egiten ari den tesi batetik eratorritako aurretiazko emaitzak dira.

Ikertaldea hainbat alorreko ikertzaileek osatzen dute. Ikertaldea osatzen duen kideetarik bat Lide Totorikaguena doktoretza aurreko ikaslea da eta UPV/EHUko Medikuntza eta Erizaintza Fakultateko Fisiologia Saileko ikerketa-laborategi batean dabil 2012. urtetik aurrera. 2014. urtean Ikerketa Biomedikoa masterra amaitu eta hortik aurrera Ekaitz Agirreagoitia eta Naiara Agirreagoitia doktoreen zuzendaritzapean dihardu tesia egiten. Tesian zehar Bruselako *Vrije Universiteit Brussel* unibertsitateko laborategian egon da estantzia bat egiten, Follicular Biology Unit ikerketa taldearekin, hain zuzen. Lan honetan lagundu duten beste ikerlariak, besteak beste, Estibaliz Olabarrieta doktoregaia, Naiara Agirreagoitia Doktorea eta Ekaitz Agirreagoitia Doktorea dira.

mglu2 eta mGlu3 glutamatoaren hartzaile metabotropikoen kokapena CB1 hartzaile kannabinoidearekiko hipokanpoaren hilusean

Medrano-Peral, Aitor^{1,2}; Buceta, Ianire^{1,2}; Ramos-Uriarte, Almudena^{1,2}; Egaña-Huguet, Jon^{1,2}; Bonilla-Del Río, Itziar^{1,2}; Royo, Naiara^{1,2}; Rico-Barrio, Irantzu^{1,2}; Elezgarai, Izaskun^{1,2}; Puente, Nagore^{1,2}; Reguero, Leire^{1,2}; Achicallende, Svein^{1,2}; Terradillos, Itziar^{1,2}; Soria-Gómez, Edgar^{1,2}; Mendizabal, Juan^{1,2}; Gerrikagoitia, Inma^{1,2}; Meana, José Javier³, Gómez-Urquijo, Sonia^{1,2} eta Grandes, Pedro^{1,2}

¹*Neurozientzia Saila, Euskal Herriko Unibertsitateko Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea*

²*Achucarro Basque Center for Neuroscience, EHuko Zientzia Parkea*

³*Farmakologia Saila, Euskal Herriko Unibertsitateko Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea*
aitor.medrano.peral@gmail.com

Laburpena

Hipokanpoko horzdun zirkunboluzioko hilusean, CB1 hartzaile kannabinoide eta mGlu2 eta mGlu3 glutamatoaren hartzaile metabotropikoen arteko hurbiltasuna eta kolokalizazioaren berri eman izan da. mGlu2 edo mGlu3 hartzaileak selektiboki ezabatzeko manipulaturako saguen burmuinak erabiliz CB1arekiko aipaturako mGlu bakoitzaren erlazioa zehaztu ahal izan dugu. mGlu2 hartzailea prozesu neuronaletan ikusia izan zen, CB1-arekin kolokalizatu ahal zuen tokietan, mGlu3-a berriz, glia prozesuetan aurkitu zen eta, nahiz eta zenbait kasutan kolokalizazioa aurkeztu izan zuen, gehienetan CB1dun botoi sinaptikoekin harremana zuten sinapsien inguruko prozesuetan topatu genuen.

Hitz gakoak: Horzdun zirkunboluzioa, mikroskopia elektronikoa, sistema endokannabinoidea, immunohistokimika

Abstract

In the hilus of the dentate gyrus in the hippocampus, the proximity and co-localization of cannabinoid CB1 receptor to mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors has been previously reported. By using different brains of mice selectively targeted to delete mGlu2 or mGlu3 we have been able to discriminate the relation of each mGlu to CB1. While mGlu2 was seen in neuronal processes where it could co-localize with CB1, mGlu3 was found in glial processes and, although small degree of co-localization was also demonstrated, mGlu3 was usually found in processes enveloping synapses some of which included a CB1 positive synaptic button.

Keywords: Dentate gyrus, electron microscopy, endocannabinoid system, immunohistochemistry

1. Sarrera eta motibazioa

Neuronak kitzikagarritasuna zein inhibizioaren bidez komunikatzen dira burmuinean. Kitzikatze prozesua nagusia izaten da burmuin eremuetan, baina, informazioaren zehaztasuna mantentzeko, eta gehiegizko kitzikagarritasunak eragiten duen kaltea ekiditzeko, ehun nerbioetan, bai zelula zirkuitoetan bai molekula-mailan oinarritutako inhibizio eta kontrol mekanismo zehatz batzuk ikusten dira.

Neurohartzaile-molekula sistema batzuek mugatzen dute, edo oztopatu ere, kinadaren transmisioa edota neurona postsinaptikoaren kitzikatzea. Funtzio hau bete ahal izateko hartzaileak egon daitezke sinapsiaren osagai guztietan: neurona presinaptikoan, postsinaptikoa edota sinapsiaren funtzioan ere parte hartzen duen glia zeluletan ere; 2. taldeko glutamatoaren hartzaileak (Petrálie et al., 1996, Neki et al., 1996, Shigemoto et al., 1997), eta CB1 hartzaile kannabinoidea kasu (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018).

CB1 delako kannabinoide hartzailea sinapsiaren elementu presinaptikoetan agertzen da batez ere, elementu postsinaptikoak jariatutako endokanabinoideei erantzuteko. Glutamatoaren hartzaile metabotropikoek, aldiz, sinapsi kitzikatzailean bertan jariatutako glutamatoari erantzuten diote sinapsiaren indarra handitzeko edo gutxitzeko. Indartze ala indargabetze eragina glutamato-hartzaile mota eta hauen kokapenaren arabera aldatzen da, glutamato hartzaile metabotropikoaren nortasuna eta distribuzioaren garrantzia azpimarratuz.

Burmuinaren hipokanpoan zirkuitu kitzikatzaileak eta horien atzeraelikadura positiborako gaitasuna oroimen-sormenaren oinarri dira. Bertan glutamatoaren neurohartzaileek botoi sinaptikoan transmisioa modulatu parte hartzen dute (Altinbilek eta Manahan-Vaughan, 2009), baina, egoera patologikoetan, krisi epileptikoen oinarri den etengabeko kitzikatze mantendu eta nahaspilatua ager daiteke. Kitzikatze honek zelulen barnean kaltzio kontzentrazio kaltegarriak metatzea ahalbidetzen du, eta, eszitotoxiko deritzogun mekanismoaren bidez, lesio zelularra gertatzen da zelulen apoptosia eraginez (Ben-Ari, 2002; Zhang et al., 2015). Hipokanpoko hilus delako eremuan lehen aipatutako atzeraelikadura negatiboko zirkuitu horietako bat aurki dezakegu, zeinetan CB1 hartzailearekiko mGlu2 eta 3 hartzaileen hurbiltasuna eta baita kolokalizazioa ere deskribatu dugun (Medrano et al, 2017). Baina, mGlu2 eta mGlu3 hartzaile mota bakoitzaren lokalizazioa zein CB1arekin duen erlazioa gehiago zehaztu nahi izan dugu lan honetan hartzaile bakoitzaren funtzioa argitzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gure hipotesia hau da: hipokanpoaren beste eremuetako sistema erregulatzaileek hilusean eduki dezaketela erreplika, zuntz goroldiotsuetatik datorren informazioarekin batera, atzeraelikadura negatiboko sistema moduan jarduteko.

2.2 Helburuak

- Glutamatoaren mGlu2 eta mGlu3 hartzaile metabotropikoen lokalizazioa bereiztu hipokanpoaren hilusean.
- Glutamatoaren mGlu2 eta mGlu3 hartzaile metabotropiko bakoitzak CB1-arekiko duen erlazio espaziala zehaztu, maila zelular eta sinaptikoan, erresoluzio handiko mikroskopia elektronikoaren bidez.

3. Ikerketaren muina (Taulak, irudiak, formulak...)

Aurrekoa frogatzeko sagu hipokanpoetan mGlu2 eta mGlu3 eta CB1 hartzaileak markatu genituen, hartzaile hauen aurkako antigorputz espezifikoak erabiliz, aurremurgiltzedun immunohistokimika bikoitzaren bidez. Immunohistokimikoki oso antzekoak diren bi hartzaileak bereizi ahal izateko mGlu2 knock-out (mGlu2KO) eta mGlu3 knock-out (mGlu3KO) saguak erabili genituen. Ehuna mikroskopio elektronikoan aztertu zen, bi motatako hartzaile metabotropikoek CB1 hartzaile kannabinoidearekiko erlazioa argitzeko, hilus eremuan, bai maila zelular bai subzelularrean. Hilusa identifikatu genuen, hortz dun zirkunboluzioan, eta magnifikazio handiko argazkiak atera genituen.

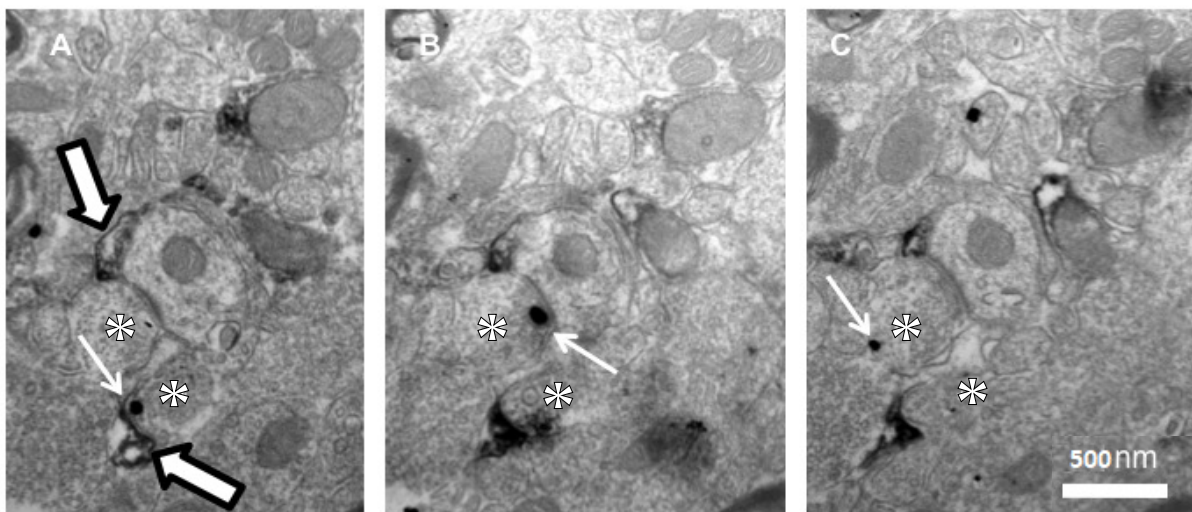
Magnifikazio handiko argazkietan diaminobenzidinaren (DAB) markaketa ikusten zen glutamatoaren mGlu2 eta mGlu3 hartzaileen presentzia adieraziz. Halaber, urre-partikulak ikusten ziren CB1 hartzaileak markatuz. Bi markaketen hurbiltasuna eta erlazio topografikoa ere egiaztatu zen hiluseko eremuan.

Ikerlan honetan bi hartzaile moten kokapena ezaugarritu genuen hipokanpoko hilusean. Gainera, mGlu2 eta mGlu3 eta CB1 hartzaile kannabinoidearen arteko interakzioa egiaztatu genuen, bai zelula glialetan, baita neuronetan ere.

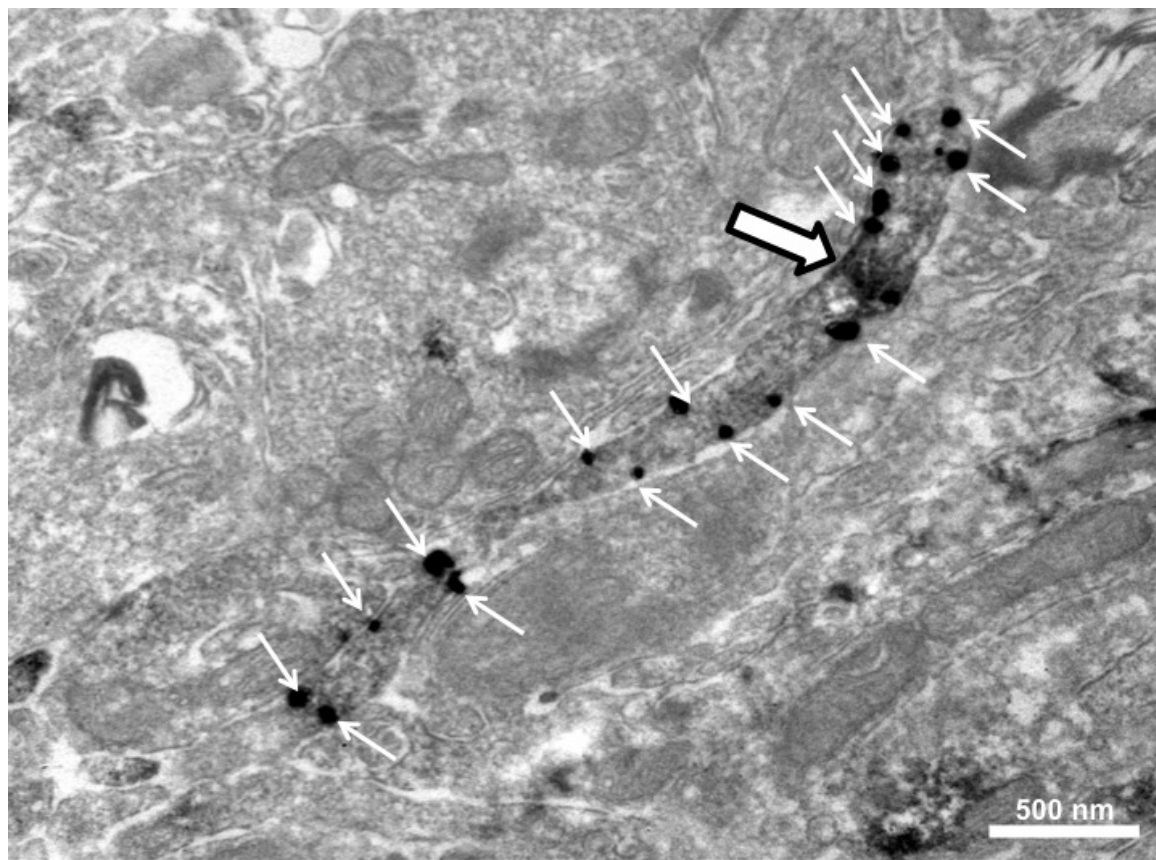
Alde batetik, mGlu2KO saguen hilusean, mGlu3 hartzailea glia prozesuen ezaugarriak zituzten egituretan ikusia izan zen eta, askotan, mGlu3-a zuten egiturak, CB1-z markatutako botoiekin kontaktuan ikusi genituen (1. Irudia). Bestetik, mGlu3KO saguen hilusean, mGlu2 hartzailea ikusi genuen neurona prozesuetan. Hauetan, CB1 hartzailea ere aurkitu genuen markaketa bikoitza agertuz (2. Irudia).

3.1. Irudiak

- 1. irudia.** Segidan hartutako hiru mozteren irudiak mGlu2KO sagu baten hilusean. mGlu3 markaketaren (adibidetzat gezi lodiak, A irudian) kokapena ikus daiteke CB1 hartzailerako urrez markaturiko (gezi meheak hiru irudietan) sinapsi-botoien alboan (asteriskoak).



2. **irudia.** Diaminobenzidina eta urre markaeta bikoitza mGlu2 eta CB1 hartzaileak markatuz mGlu3KO sagu baten hilusaren mozte batean. Bi hartzaileen markaketa duen axoi-ezaugarriaren egitura ikus daiteke. Gezi lodiak: DAB-a mGlu2 hartzailearen markaketan. Gezi meheak: nanogold urre partikulak CB1 hartzailearen markaketan.



4. Ondorioak

Magnifikazio handian ikusitakoan, bi hartzaile motak, bai glutamatergikoak eta bai kannabinoidea, harreman estuan ikusi ziren hilusean. mGlu2 hartzailea zenbait prozesu neuronalean topatu izan zen bai eta CB1 positibodun botoi sinaptikoen ondoan zeuden profilak markatzen. mGlu3 hartzailea egitura glialetan bakarrik ikusia izan zen, beste egitura presinaptiko edo postsinaptikoetan ez beste. Honez gain, CB1aren presentzia, beste garuneko egituretan deskribatua izan den bezela, botoi inhibitzaile eta, kontzentrazio txikiagoan, kitzikatzaileetan ikusi izan zen. CB1a zenbait prozesu glialetan ere frogatu ahal izan zen.

Bi markaketak konparatzean, mGlu3 positibodun prozesuak CB1-rako positiboak ziren botoiekin kontaktuan ikusi ziren maiz. Gainera, nahiz eta maiztasun gutxian, bi hartzaile moten arteko kolokalizazioa ikusi zen, gehienbat, sinapsi axo-espinotsuak inguratuz.

Horrela, mGlu2 eta mGlu3 eta CB1 hartzaileen arteko harremanak, bai neuronetan bai glia zeluletan ere, atzeraelikadura negatiboko mekanismo baten oinarri izan daitekeen interakzio berri bati zabaltzen dizkio ateak.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Planteatzen diren etorkizunerako urratsak hurrengoak izango dira. Alde batetik, lortutako emaitza morfologikoak estatistikoki neurtzea. Bestetik, elektrofisiologiaren bidez, erregulazioa, mekanismo auresinaptikoa, postsinaptikoa edo gliak bideratutakoa den ikustea.

6. Erreferentziak

- Altinbilek B eta Manahan-Vaughan D. (2009) A specific role for group II metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term depression and spatial memory. *Neuroscience*, 158, 149-158.
- Ben-Ari Y. (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3,728-739.
- Gutiérrez-Rodríguez A, Bonilla-Del Río I, Puente N, Gómez-Urquijo SM, Fontaine CJ, Egaña-Huguet J, Elezgarai I, Ruehle S, Lutz B, Robin LM, Soria-Gómez E, Bellocchio L, Padwal JD, van der Stelt M, Mendizabal-Zubiaga J, Reguero L, Ramos A, Gerrikagoitia I, Marsicano G, Grandes P. (2018) Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus. *Glia*. 66,1417-1431.
- Medrano A, Gómez SM, eta Grandes P. (2017) *Glutamatoaren eta kannabinoideen neurohartzaileak hipokanpoko hilusean*. IKERGATZTE. Iruña
- Neki A, Ohishi H, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S eta Mizuno N (1996) Pre- and postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the rat brain: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci. Lett.*, 202, 197-200.
- Petralia RS, Wang Y-X, Niedzielski AS eta Wenthold RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience*, 71, 949-976.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S eta Mizuno N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 17, 7503-7522.
- Zhang LN, Hao L, Wang HY, Su HN, Sun YJ, Yang XY, Che B, Xue J eta Gao ZB. (2015) Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 24,161-165.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiegu González-Maeso Doktoreari mGlu2KO saguak eskeini izanagaitik, abeltegiko langileei eta SGIker-eko profesionalei euren laguntzagaitik ikerketa prozesuan. Erakutsitako emaitzak zenbait kongresutan partzialki aurkeztuak izan dira.

Lan hau “*Relación topográfica entre la localización subcelular de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo 2 (mGlu2/3) y del receptor cannabinoide CB1 en la región del hilus del giro dentado del ratón*” izeneko tesi proiektuaren barnean garatu da Euskal Herriko Unibertsitatearen Neurozientzia Sailean eta Eusko Jaurlaritzako diru-laguntzaz (IT-764-13).

TRPV1 hartzaile gabeziak CB1 hartzailearen funtzioan eragina du hipokanpoko hortz bihurguneko bide zulatzaileko sinapsietan

Egaña-Huguet, Jon^{1,2}; Achicallende, Svein^{1,2}; Rico-Barrio, Irantzu^{1,2}; Buceta, Janire^{1,2};
Bonilla-Del Río, Itziar^{1,2}; Puente, Nagore^{1,2}; Gerrikagoitia, Inmaculada^{1,2};
Elezgarai, Izaskun^{1,2}; eta Grandes, Pedro^{1,2}

¹ Medikuntza eta Erizaintza fakultatea UPV/EHU, E-48940 Leioa, ²Achucarro Basque Center
for Neuroscience, EHU-ko Zientzia Parkea

jon.egana@ehu.eus

Laburpena

Potentzial aldakorrek lehen motako hartzaile vallinoideak (TRPV1) neurotransmisoreen jariapenean eta plastikotasun sinaptikoan eragiten du. Ikerketa honetan, erdialdeko bide zulatzailearen intentsitate baxuko kitzikapen estimuluak (10 Hz 10 min) jatorriz hartzaile honen gabezia duten saguetan (TRPV1-KO) jatorrizko animalietan agertzen den endokannabinoiden menpeko iraupen luzeko depresioa (eKB-eLTD) eKBen menpeko iraupen luzeko indartze batean bilakatzen da. Orokorrean, gure emaitzek adierazten dute TRPV1 hartzailearen gabeziak, EKSk bideratutako plastikotasun sinaptikoan egokitzapenezko aldaketak eragiten dituela.

Hitz gakoak: TRPV1-KO, endokannabinoidak, elektrofisiologia

Abstract

The transient receptor potential vanilloid (TRPV1) receptor modulates neurotransmitter release and synaptic plasticity in the brain. In this study, we have observed that low frequency stimulation (10 Hz 10 min) of the Medial Perforant path in TRPV1-KO shifted the eCB-eLTD observed at these synapses in wild type mice to a eCB-LTP. Overall, these results indicate that the absence of TRPV1 receptors triggers adaptive changes in synaptic plasticity that involve the eCB system.

Key word: TRPV1-KO, endocannabinoids, electrophysiology.

1. Sarrera eta motibazioa

Ugaztunen burmuinean gertatzen diren prozesuen artean garrantzitsuenetarako bat plastikotasun sinaptikoa da. Plastikotasuna, esperientzia batek sorturiko aktibitate neuronalak, gainerako zirkuitu neuronalen funtzioa aldatzeko duen gaitasunean datza, ondorioz, gure sentimenduak, pentsaerak eta portaera aldatuz. Aldaketa plastiko horien atzean zehazki, aurretik ezarrita dauden sinapsietan neurotransmisioaren intentsitatearen edo eraginkortasunaren aldaketak daude. Horrela, bide sinaptiko batzuk gehiago indartuko diren bitartean beste batzuetan neurotransmisioa jaitsaraziko da (Citri eta Malenka, 2008).

Plastikotasun sinaptikoak hainbat funtziotan parte hartzen duenez, ez da harritzekoa honen barne hainbat mota eta mekanismo egotea. Jakina da transmisio sinaptikoa sustatu edota gutxitu daitekeela aktibitate neuronalaren arabera, eta aldaketa hauek denbora jakin baterako mantentzen direla, denbora

hau segundoetatik orduetara edota betirako izan daitezkeelarik. Horrela, iraupen laburreko plastikotasun sinaptikoa eta iraupen luzeko plastikotasun sinaptikoa bereizten dira, eta hauen barne, iraupen laburreko indartzea edota depresioa eta iraupen luzeko indartzea (LTP) edo depresioa (LTD) batik bat (Komaki et al., 2013).

Deskribatu zen lehen plastikotasun mota hipokanpoan gertatzen den LTPa izan zen eta egitura honek memoriarekin duen lotura ezagututa plastikotasun prozesuek memorian duten garrantzia kritikoa zela iradoki zen (Squire et al., 2004), horregatik azken urteotan hainbat ikerketa egin dira hipokanpoko plastikotasuna aztertze aldera, bertan inplikaturiko mekanismoak deskribatzeko asmoz (Morris, 2006).

Endokannabinoide sistemak (EKS) hainbat prozesu fisiologikotan hartzen du parte eta bere funtzio nagusia neuromodulatzailerik bezala jokatzeko izanik, eragina du eraginkortasun sinaptikoan eta ondorioz, plastikotasun sinaptikoan. Funtzio hori betetzeko berezko hartzaileak dauzka, CB1 eta CB2 hartzaileak deritzenak, eta hauek aktibatzen dituzten berezko estekatzailerik diren endokannabinoideak (eKB), hauen artean nagusienak 2-AGa (2-arakidonoilglicerola) eta anandamida (arakidonoiletanolamida) (Howlett et al., 2002). Hala ere, eKBek plastikotasun sinaptikoan jotzen duten papera oso eztabaidatua izan da, izan ere, CB1 hartzailearen agonistak aplikatuz, kontzentrazioaren araberrako efektu bifasiko bat ikusi egin da (Abush eta Akirav, 2010).

Hartzaile klasiko horiez gain, EKSk beste hartzaile batzuetan eragina du ere, hauen artean TRPV1 hartzaileak. Hartzaile hau eKBengatik aktibatua izan daiteke eta eKBen sintesian eragina izan dezakeela ikusi da (Chávez et al., 2014). Jakina da hartzaile honek plastikotasun sinaptikoan parte hartzen duela, sinapsiko kaltzio kontzentrazioa aldatuz eta ondorioz neurotransmisoreen askapenean doitzuz (Chavez et al., 2010; Gibson et al., 2008). Duela gutxi deskribatu da hartzaile hau, hipokanpoko geruza molekularreko bide zulatzailean kokaturiko sinapsi kitzikatzailerik alde postsinaptikoan aurkitzen dela (Puente et al. 2014) eta gainera geruza horretan dauden sinapsi inhibitzaileen % 30 hartzaile honentzako immunopositiboak direla (Canduela et al. 2015). Bi hartzaile horien kokapena hipokanpoan eta beste hainbat egituratan frogatu bada ere (Cristino et al. 2006) neuronen jardueran eta plastikotasun sinaptikoan eragiten duten efektua kontrakoa dela iradokitzen da (Di Marzo et al., 2010).

2. Ikerketaren helburuak

Neurotransmisioaren eraginkortasunean TRPV1 hartzaileak duen garrantzia jakinik, hipokanpoko hortz bihurtzeko geruza molekularreko bide zulatzailean EKSk bideratutako plastikotasun sinaptikoa aztertzea erabaki dugu, eta gertatzen diren aldaketan erantzulea identifikatzen saiatu gara. Izan ere, eremu horretan estimulu baten ondorioz ematen den eKBek bideratutako LTDa, LTP baten bilakatzen da TRPV1-KO saguetan.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

Aurretik TRPV1-KO saguetan eginiko ikerketa batean aldaketak ikusi genituen EKSk sintesi eta degradazio entzimen adierazpenean eta baita CB1 hartzailearen banaketan ere (Egaña-Huguet et al., 2017). Aldaketa horietan sakondu nahi izan dugu dagokigun ikerketa honetan eta EKBSrekin erlazionatutako plastikotasun sinaptikoan ere aldaketa nabarmenak dituztela ikusi dugu.

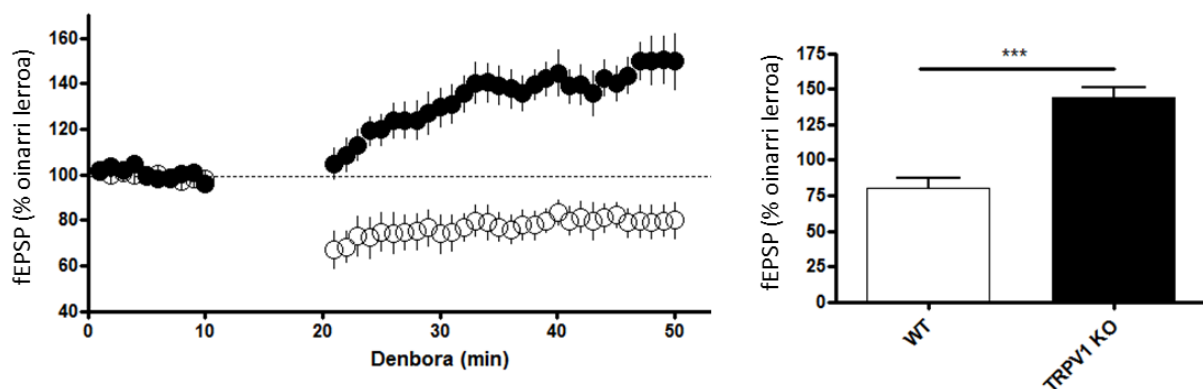
Ikerketa honetan teknika elektrofisiologiakoak erabili ditugu transmisio sinaptikoa aztertzeko, burmuin xerren zelulaz kanpoko elektrofisiologia hain zuzen, “ex vivo” moduan ere ezaguna. Honetan

behin animalia anestesiatuta dagoelarik burmuina atera, eta bizirik mantentzen duen eta oxigenatua dagoen disoluzio baten murgiltzen da eta bibratomoaren laguntzaz 300µm-ko xerretan ebakitzen da.

Ondoren xerra hauek elektrofisiologia-teknikak burutzeko prestatuta dagoen mikroskopia baten ganberatxoan jartzen dira. Intereseko eremuak aukeratu eta bi elektrodo sartzen dira, hauek batek estimulua bidaltzen du eta besteak estimulu horrekiko erantzuna jasotzen du. Burmuin xerrak bizirik mantentzeko egoera fisiologikoa ordezkatzeko duen eta oxigenatua dagoen disoluzio bat ponpatzen da zuzenean mikroskopia-ganberara. Horrez gain, disoluzio horretan gure ikerketarako interesgarriak diren farmakoak gehitzen dira burmuin xerratan efektu ezberdinak eragin ditzaten. Ikerketa honetan burututako esperimendu guztietan Pikrotoxina (PTX) deritzon farmako bat gehitu dugu transmisio inhibitzailea deuseztatzeko eta kitzikatzailea baino ez jasotzeko. Gainera efektu ezberdinak eragiteko EKSn eta TRPV1 hartzailean eragina duten beste hainbat farmako erabili ditugu. Hortaz, bi egoera ezberdinen aurrean (TRPV1 hartzaile gabezia eta egoera arrunta) burmuin eremu berberak estimulu berberaren aurrean duen jokaera edo erantzuna aztertzen da. Lehenik eta behin 10 minutuz laginak estimulu kontrol baten aurrean duen erantzuna aztertzen da, “oinarri-lerroa” moduan ezagutzen dena eta aldaketarekiko erreferentzia gisa erabiliko dena, ondoren kitzikapen estimulu bat aplikatzen da eta honek sare neuronalean eragiten duen erantzuna aztertzen da. Gure ikerketan, estimulu kontrol gisa 0.1 Hz-ko estimuluak erabili ditugu eta 10 minutu irauten duten 10 Hz-ko kitzikapen estimuluak. Ondoren laginak duen erantzuna 50 minutuz aztertu dugu. Horrela, hurrengo emaitzak jaso ditugularik.

Lehenik eta behin, TRPV-KO saguen hipokanpoko hortz bihurguneko bide zulatzailean, jatorrizko animalietan iraupen luzeko LTDa eragiten duen kitzikapen protokoloa aplikatzerakoan lortzen den erantzuna guztiz ezberdina izan da, izan ere, LTP bat pizten baita. Sagu arruntetan estimulu honen aurreko erantzuna 80.51 ± 6.339 -koa den bitartean, TRPV1-KO saguetan erantzuna 144.0 ± 7.152 -koa izan da (1.irudia). Ezberdintasuna estatistikoki esanguratsua da ($p < 0.0001$ ***).

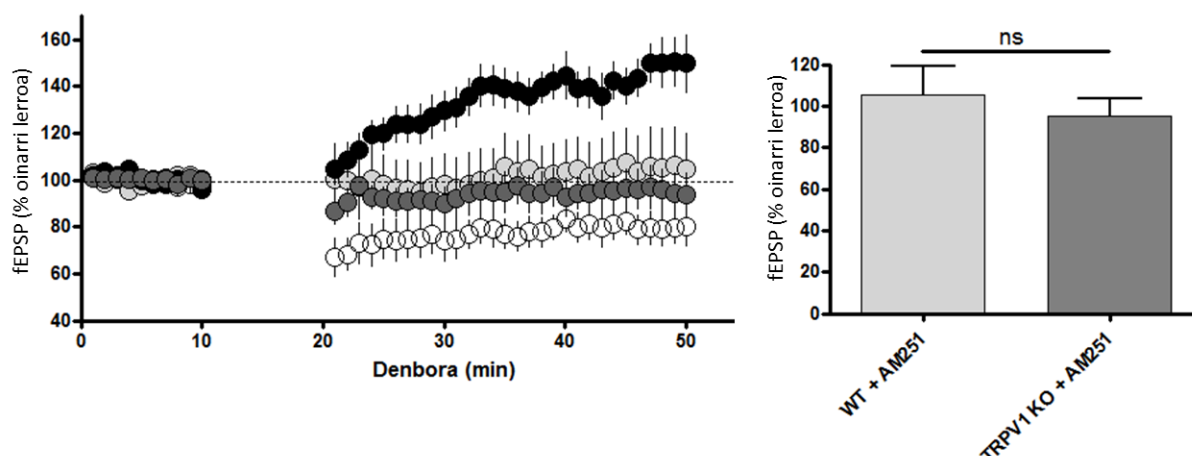
1. irudia. Plastikotasun sinaptikoaren azterketa. 10 minutuko 10 Hz-ko estimulua jaso ondoren jatorrizko saguen (zuriz) (n=10) eta TRPV1-KO saguen erantzuna (beltzez) (n=9) denboran zehar. Ondoan azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



Efektu honen erantzulea sistema endokannabinoida den edo ez ezagutzeko, EKSk hartzaile nagusia den CB1 hartzailearen farmako antagonista den AM251 gehitu dugu etengabe mikroskopia-ganbarara. Horrela, xerran hartzaile honen aktibazioa ekiditen da eta honek bideratzen dituen prozesuak blokeatu. Jatorrizko saguetan gertatzen den moduan, TRPV1-KO saguen erantzuna oinarri-lerroaren mailara bueltatzen da, kitzikapen estimuluaren eragina guztiz blokeatuz. Horrela, jatorrizko saguetan

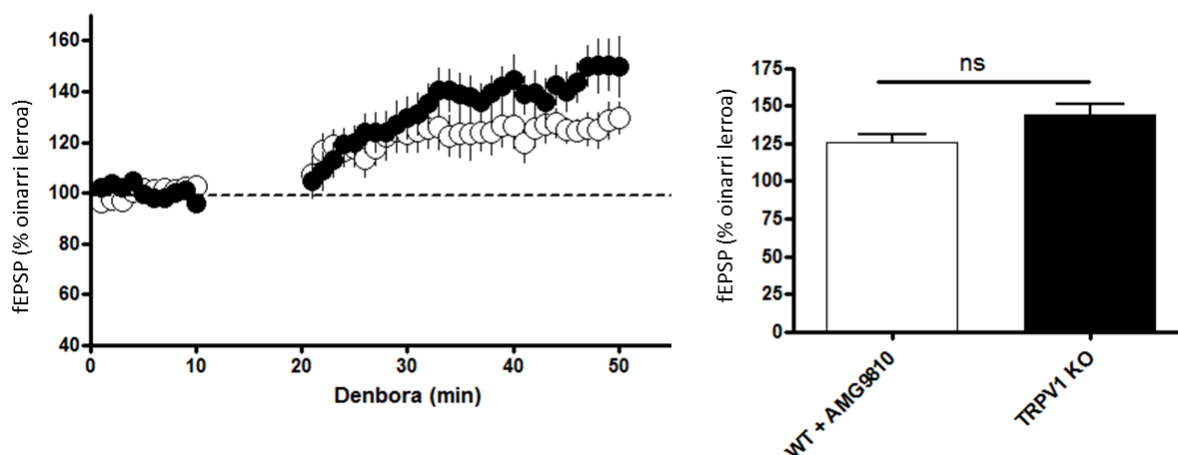
farmakoaren eragina oinarri-lerroarekiko 105.4 ± 13.89 -ra arte berreskuratu duen bitartean TRPV1-KO hau 95.12 ± 8.12 -ra arte jaitsarazi da (2.irudia). Ezberdintasun hau ez da estatistikoki esanguratsua ($p > 0.05$).

- 2. irudia. CB1 hartzailearen parte hartzea plastikotasun sinaptikoan.** AM251 farmakoa gehitu, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren jatorrizko saguen (gris argiz) ($n=10$) eta TRPV1-KO saguen erantzuna (gris ilunez) ($n=10$) denboran zehar. Ondoan azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



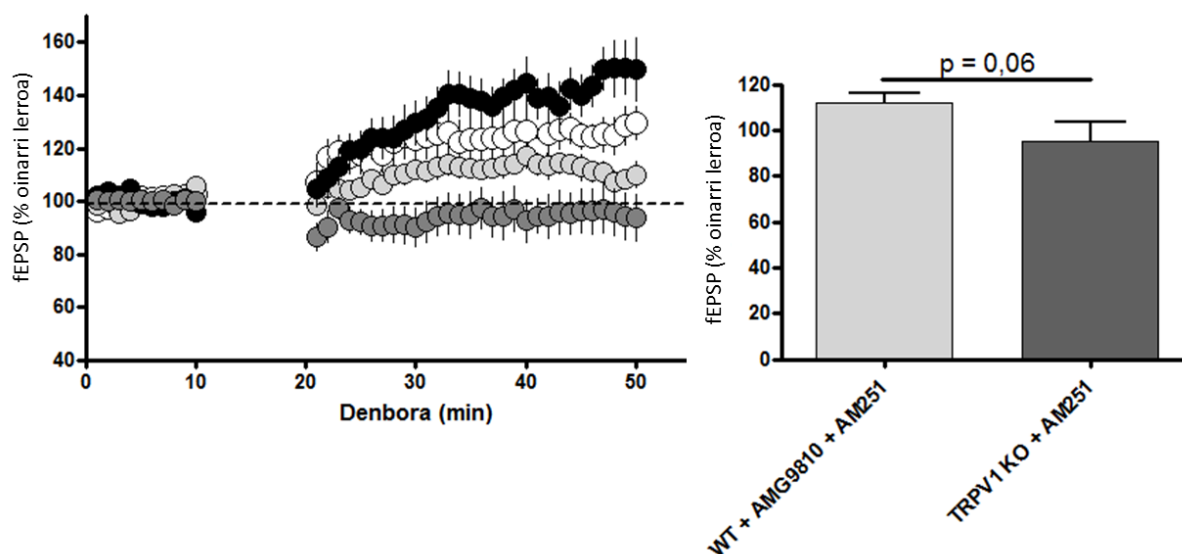
Behin efektu honetan CB1 hartzailearen parte hartzea frogatuta, aztertu nahi izan genuen TRPV1-KO saguetan gertatzen diren aldaketak gabezia horri soilik zegozkion ala animaliek garapenean zehar jasan dituzten egokitapenei erantzuten zioten. Hori ikertzeko jatorrizko saguen burmuin xerratan TRPV1 hartzailearen antagonista bat, AMG9810, gehitu genuen. Kasu honetan TRPV1 hartzailearen inhibizioak, egokitapenik gabeko EKSrengan eragiten duen erantzuna aztertu dugu. Horrela, jatorrizko saguetan TRPV1 hartzailea blokatzearen ondorioz, estimuluaren aurrean seinalea oinarri-lerroarekiko 125.4 ± 5.655 -ra arte igotzen da, LTP bat eraginez, hala ere, aurretik esan bezala TRPV1-KO saguetan oinarri-lerroarekiko 144.0 ± 7.152 -ra arte igoarazten du. Diferentzia hau ez da estatistikoki esanguratsua baina ezin da esan efektua berbera denik (3.irudia) ($p = 0.1035$).

- 3. irudia. Egokitapenezko aldaketen papera plastikotasun sinaptikoan.** AMG9810 farmakoa gehitu ondoren, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren, jatorrizko saguen (zuriz) ($n=5$) eta farmakorik gabeko TRPV1-KO saguen erantzuna (beltzez) ($n=9$) denboran zehar. Ondoan azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



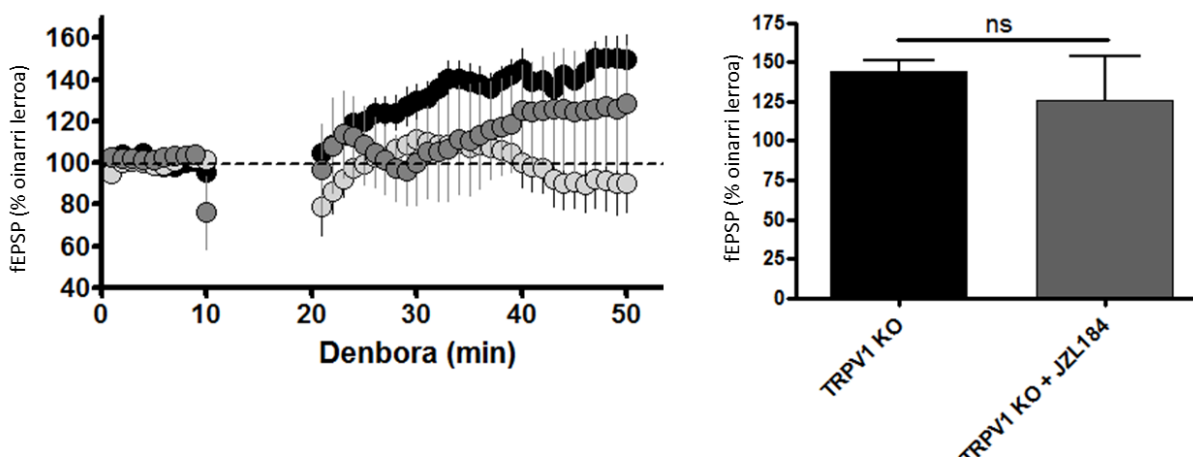
TRPV1 hartzailea farmakologikoki blokeatuta duten jatorrizko saguen burmuin xerretan aurretik aipatutako CB1 hartzailearen aurkako farmakoa, AM251-a, aplikatu dugu eta honek eragindako erantzunaren aldaketa ez da TRPV1-KO saguetan eman denaren berdina izan. Jatorrizko saguetan “oinarri-lerroarekiko” erantzuna estimulu arrotzaren aurrean 125.4 ± 5.655 -ra arte igo eta AM251 farmakoa aplikatu ondoren hau 112.1 ± 3.91 -ra arte jaitea bakarrik lortu dugu. TRPV1-KO saguetan berriz, estimuluaren ondoriozko erantzuna oinarri-lerroa-arekiko 144.0 ± 7.152 -ra arte igo du eta AM251 farmakoaren aplikazioaren ondoren hau $95,12 \pm 8,23$ -ra arte jaitsarazi du (4.irudia). Bi efektu hauen arteko ezberdintasuna ez da estatistikoki esanguratsua ($p = 0.06$).

- 4. irudia. CB1 hartzailearen antagonistaren efektua jatorrizko sagu eta TRPV1-KOetan:** AM251 farmakoa gehitu ondoren, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren jatorrizko saguen (gris argiz) (n=12) eta TRPV1-KO saguen erantzuna (gris ilunez) (n=10) denboran zehar. Ondoan azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



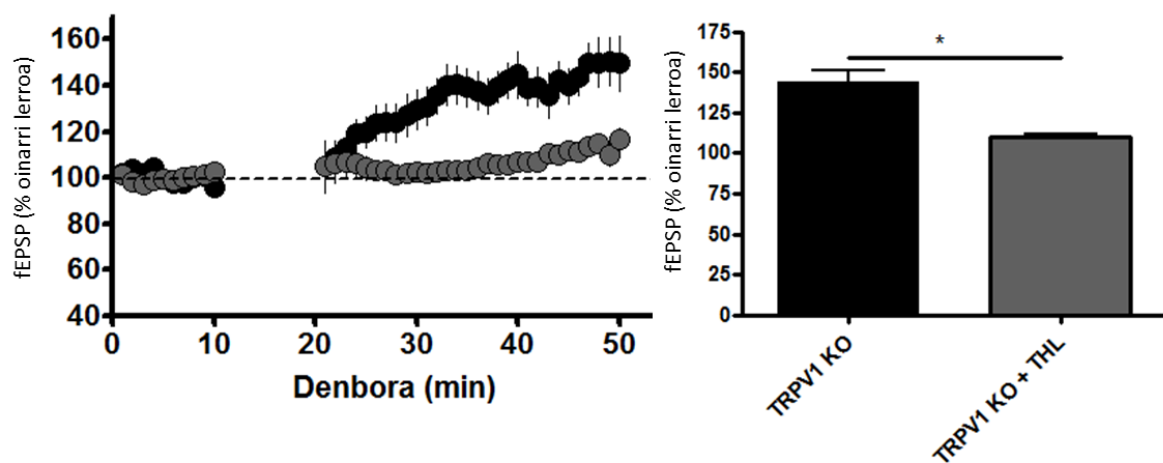
Horrez gain, LTParen erantzulea zehatzago identifikatzeko asmoz, bi endokannabinoiden nagusien kontzentrazioan eragiten duten farmakoak gehitu ditugu. Lehenik eta behin 2-AG endokannabinoidea (eKB) degradatzen duen MAGL entzima blokeatzen duen JZL184 farmakoa gehitu dugu. Estimuluaren ondoren seinalea 144.0 ± 7.152 -ra arte igotzen da eta aplikazioaren ondoren 126.0 ± 27.41 -ra arte jaitsiz, aldaketa hau ez da estatistikoki esanguratsua ($p > 0.05$). Jatorrizko saguetan berriz JZL184 farmakoaren ondorioz 2-AG eKBaren kontzentrazioa areagotuz epe luzeko depresioa deuseztatzen da aurreko ikerketetan izan ditugun emaitzak errepikatuz (5.irudia).

- 5. irudia. 2-AG eKBaren parte hartzea bere degradazio entziman eraginez.** JZL184 farmakoa gehitu ondoren, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren jatorrizko saguen erantzuna (gris argiz) (n=4), farmakoarekin TRPV1-KO saguena (gris ilunez) (n=4) eta farmakorik gabeko TRPV1-KO saguen erantzuna (beltzez) (n=9) denboran zehar. Ondoan azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



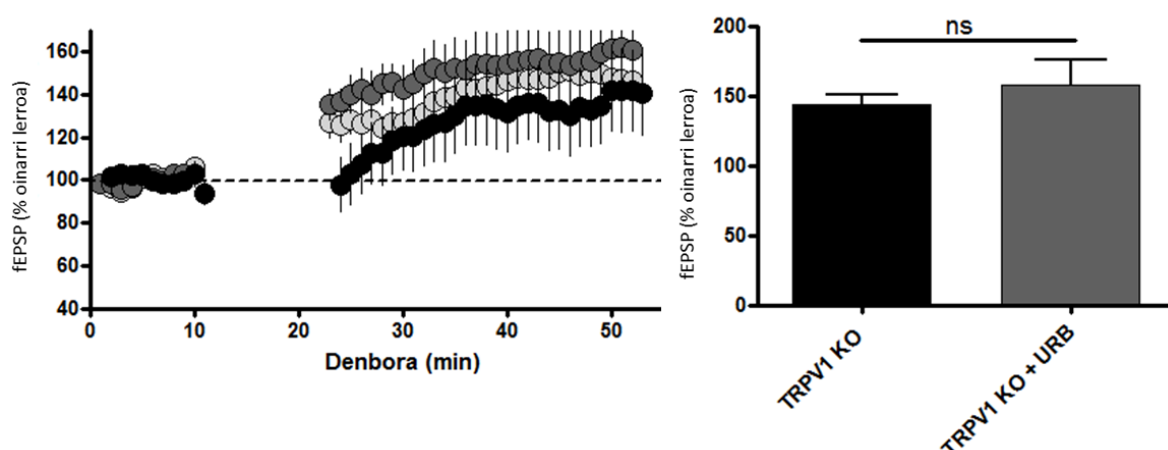
2-AGa eKBaren parte hartzea hobeto aztertzeko eKB hori sintetizatzen duen entzima blokeatzen duen farmakoa gehitu dugu, THL. Horren ondorioz 2-AGren kontzentrazio jaitsarazten da. Horrela estimuluaren ondoriozko erantzunean LTPa asko murrizten dela behatu dugu, ia desagertu arte. TRPV1-KO estimuluaren aurreko erantzuna oinarri-lerroarekiko 144.0 ± 7.152 -ra arte igoarazten den bitartean DAGL entzimaren blokeoa eragiten duen farmako honen ostean, “oinarri-lerroarekiko” 109.8 ± 1.868 -ra arte jaisten da (6. irudia). Ezberdintasun hau estatistikoki esanguratsua da ($p = 0.0102$).

- 6. irudia.** 2-AG eKBaren parte hartzearen azterketa bere sintesi entziman eraginez. THL farmakoa gehitu ondoren, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren, farmakoarekin TRPV1-KO saguen (gris ilunez) ($n=4$) eta farmakorik gabeko TRPV1-KO saguen erantzuna (beltzez) ($n=9$) denboran zehar. Ondoa azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



Azkenik, beste endokanabinoide nagusia den, anandamidaren degradazioa ekiditen duen URB farmakoa gehitu dugu. Modu horretan anandamidaren kontzentrazioa igoaraztea lortzen da. Jatorrizko saguetan farmako hau aplikatuz LTDa LTP batean bilakatzen dela behatu dugu. TRPV1-KO saguetan berriz, estimuluaren aurrean daukagun LTPa mantendu egiten da, seinalea “oinarri-lerroarekiko” 157.3 ± 17.95 -ra arte igotzen delarik (7. irudia). Ezberdintasun hau ez da estatistikoki esanguratsua ($p = 0.4158$).

- 7. irudia.** Anandamida eKBaren parte hartzearen azterketa degradazio entziman eraginez. URB farmakoa gehitu ondoren, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren, jatorrizko saguetan (gris argiz) ($n=4$), farmakoarekin TRPV1-KO saguena (gris ilunez) ($n=4$) eta farmakorik gabeko TRPV1-KO saguen erantzuna (beltzez) ($n=9$) denboran zehar. Ondoa azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



Oro har, emaitza hauek iradokitzen dute, TRPV1 hartzailearen jaiotzetiko gabeziak EKSn egokitzapenezko aldaketak eragiten dituela. Aldaketa horiek hipokanpoko hortz bihurguneko plastikotasun sinaptikoa zeharo moldatzen dute parte hartzen duten hartzaile eta eKBak berdina izan ere. Guzti horrek adierazten du EKSk osagaien arteko orekak, mailak eta kokapenak zeharo moldatu dezakela zirkuitu honen fisiologia.

4. Etorkizunerako planteatutako norabidea

TRPV1-KO animaliek jatorrizko animaliekin konparatuz epilepsia arinagoak jasaten dituztela ikusi dugu loki lobuluaren epilepsia sagu ereduan. Epilepsiarekiko erakusten duten erresistentzia hau deskribatu ditugun EKSk erakusten duen aldaketetan izan dezake sorburua. Loki lobuluaren epilepsia ereduan farmakologikoki EKSn eragiteak gaixotasunaren aurrean eragin ditzakeen onurak aztertuko ditugu. Horrekin batera, epilepsia EKSn eragiten dituen aldaketetan sakonduko dugu.

5. Eskerrak eta oharrak

Lan hau burutzeko hainbat erakunderen diru laguntzaz baliatu da. Eusko Jaurlaritza BCG IT764-13 laguntza; Espainiako Ministeritza SAF2015-65034-; UPV/EHU UFI11/41; Adikzio nahasmenduen saretik - Instituto de Salud Carlos III-RD12/0028/0004 eta JEH Euskal Herriko Unibertsitatearen kontratu dauka (PIF 15/255).

6. Erreferentziak

- Abush, H. eta Akirav, I. (2010). Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus*; 20: 1126–1138.
- Canduela, M. J. et al. (2015) Visualization by high-resolution immunoelectron microscopy of the transient receptor potential vallinoid-1 at inhibitory synapses of mouse dentate gyrus. *PLoS One*; Mar 16; 10 (3):e0119401.
- Chávez, A. E. (2010). TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat. Neurosci*; 13: 1511–1518.
- Chávez A. E. et al (2014) Compartment-Specific modulation of GABAergic synaptic transmission by TRPV1 channels in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*; 34 (50):16621-29.
- Citri, A. eta Malenka, R.C. (2008) Synaptic plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanism. *Neuropsychopharmacology Rev.*; 33: 18-41.
- Cristino, L. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*; 139: 1405–1415.
- Di Marzo, V. (2010). Anandamide serves two masters in the brain. *Nat. Neurosci*; 13:1446–1448.
- Egaña-Huguet, J. et al., (2017). TRPV1-KO saguek epilepsia krisi arinagoak jasatearen zergatiak bilatzen. II. *IkerGazte, Nazioarteko ikerketa euskaraz: 2. Liburuxka (Osasun zientz.)*; 80-87
- Gibson, H.E. et al. (2008). TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal inter-neurons. *Neuron*; 57: 746–759.
- Howlett, A. C. et al. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.*; 54(2): 161-202.
- Komaki, A. et al. (2014). Effects of exposure to an extremely low frequency electromagnetic field on hippocampal long-term potentiation in rat. *BrainRes*; 1564: 1–8.
- Morris R.G. (2006). Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci*; 23: 2829–2846.
- Puente, N. et al. (2014). The transient receptor potential vallinoid-1 is localized at excitatory synapses in the mouse dentate gyrus. *Brain Struct. Funct.* Man; 220(2): 12187-94.
- Squire L.R. et al. (2004). The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci*; 27: 279–306.

Multimedia jarduera sedentarioak eta Dieta Mediterraneoarekiko atxikiduraren arteko erlazioa Bilbo Handiko haur eta nerabeetan

Caballero Sánchez, Silvia¹; Jauregi, Amets¹; Ayesta, Irati¹; Fernández, Julia¹;
Gravina, Leyre¹ eta Hoyos Cillero, Itziar¹

¹Erizaintza Saila I. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea. Euskal Herriko Unibertsitatea
UPV/EHU
silvia.caballero@ehu.eus

Laburpena

Bilbo Handiko 515 haur eta nerabeen multimedia ohitura sedentarioak eta Dieta Mediterraneoarekiko (DM) atxikidura ezagutzeaz gain, bien arteko elkar-erlazioa aztertu zen. Multimedia jarduera sedentarioak (AAP-ren gomendioak kontuan hartuz) eta elikadura ohiturei buruzko galdeketa (Kidmed) bete zuten. Nerabeak haurrak baino sedentarioagoak ziren (telebista, $p<0,01$; ordenagailua, $p<0,001$) eta atxikidura okerrago zuten ($p<0,01$). Kontsolaren erabilera eta multimedia denbora totala AAP-ren gomendioen barruan zeudenean, atxikidura hobeagoa zen ($p<0,05$ eta $p<0,05$). Atxikidura ona edukitzea eta multimedia gailuetan denbora gutxiago igarotzea, obesitatea eta gainpisua saihesteko lagungarriak izan litezke. Osasun sustatzaileek elkarrekin lan egin beharko lukete, interbentzio eraginkorrak diseinatu eta Osasun Publikoko programak martxan jarri.

Hitz gakoak: haurrak, nerabeak, obesitatea, multimedia ohitura sedentarioak, Dieta Mediterraneo.

Abstract

Associations between screen-viewing behaviours and adherence to the Mediterranean Diet in 515 children and adolescents in the Gran Bilbao were analyzed. They completed a questionnaire about screen-viewing behaviours (in accordance with AAP guidelines) and dietary habits (Kidmed test). Adolescents were more sedentary than children (TV viewing, $p<0,01$; computer-playing, $p<0,001$) and had a worse adherence than children ($p<0,01$). Children who exceeded suggested AAP guidelines for computer playing and for daily overall media use had worse adherence ($p<0,05$ and $p<0,05$). Having a good adherence and spending less time on screen-viewing behaviours could help to prevent from childhood obesity and overweight. Health care professionals have significant role in their daily practice for designing effective interventions and Public Health programs.

Keywords: childhood obesity, adolescents, screen-viewing sedentary behaviours, Mediterranean Diet.

1. Sarrera eta Motibazioa

Azken hamarkada hauetan, haur eta nerabeen gehiegizko pisua eta obesitatea, Osasun Publikoko arazo larriak bilakatu dira gure ingurunean. Urteak pasa ahala, obesitatea pairatzeko arriskua handitzen da eta horregatik, gero eta pertsona obeso gehiago dago mundu osoan zehar. Obesitateak haurtzaroan zein helduaroan gaixotasunak eragiten ditu (gaixotasun kardiobaskularrak, diabetesa edo arazo psikosozialak) eta honen ondorioz, haur eta helduen bizi kalitatea asko murrizten da. Honek, Osasun Sisteman gastu ekonomiko eta sozial handia eragiten du. Ikertzaileek diotenez, haurtzarotik obesitatea saihesteko programa indartsuak sortzeko beharra dago (Calvert et al., 2018), bizi ohitura sedentarioak eta dieta desegokiak aldatu ahal izateko. Ekintza hauek martxan jartzeko, funtsezkoa da obesitatea eragiten duten faktoreak ondo ezagutzea. Faktore hauek ezagutuz, ikasleen bizi ohitura sedentarioak zein dieta desegokiak aldatzeko esku-hartzeak planifikatzea lortuko da.

2. Arloko egoera, eta helburuak

Gaur egun gehiegizko pisua duten haur eta nerabeen kopurua izugarri handitu da mundu osoan zehar, baita Mediterraneoko herrialdeetan ere. Adituen esanetan, azken lau hamarkadetan obesitatea pairatzen duten 5 eta 19 urte-arteko haurren kopurua 10 bider ugartu da nahiz eta herrialde batzuetan obesitate tasak jaitsi edo mantendu egin diren. Prebalentzia eta intzidentzia tasak oso desberdinak dira herrialdearen arabera (WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI), 2018). Adibidez, Europako obesitate tasarik altuenak Italia, Txipre, Espainia, Grezia, Malta edo San Marín kokatzen diren bitartean, baxuenak Frantzia, Noruega, Irlanda, Letonia edo Dinamarkan aurkitzen dira, non prebalentzia %10a baino baxuagoa den (European Commission & OECD, 2018; WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI), 2018). Espainian, Estatu mailan, gehiegizko pisua eta obesitatearen prebalentzia tasa %18 eta %41 bitartean dago, Autonomia Erkidegoen arteko desberdintasunak nabarmenak direlarik. Honela, Euskadin, obesitate tasa %34an kokatzen da, Estatu Batuetan, Kanadan edo Erresuma Batuan baino altuagoa izanik (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid, 2015).

Gehiegizko pisua zein obesitatea pairatzen duten hurrek, gaztaroan bezala, helduaroan ere pisu arazoak izateko probabilitate handiagoa izango dute (Simmonds et al., 2016; Llewellyn et al., 2016). Aldi berean, haurtzaroko gehiegizko pisu arazo hauek, helduaroan obesitatearekin lotutako gaixotasunak izateko arriskua ere handitzen dute, hala nola, gaixotasun kardiobaskularrak (Chung et al., 2018; Olson et al., 2018; Umer et al., 2017), diabetesa (Weiss et al., 2005), minbizia edo egoera antioxidatzaile txarra, artikulazio arazoak, lo arazoak, eta arazo psikosozialak, hala nola, autoestimua baxua, elikadura-desorekak, depresioa etab. (Kelsey et al., 2014; Nelson et al., 2006). Guzti honek, pertsonen bizi kalitatean eta gizarte mailako gastu publikoan eragin zuzena dauka. Hau dela eta, obesitatea, XX. mendeko epidemiarik garrantzitsuenetarikoa izendatu da, Osasun Publikoko erronka nagusietariko bat bihurtuz. Obesitatea, gorputzeko gehiegizko gantz metaketa edo anormala bezala ezagutzen da, eta gaixotasun global, epidemiko eta multi-faktorialtzat hartzen da. Gehiegizko gantz metaketaren arrisku faktoreen artean, bizi ohitura sedentarioak eta dieta desegokiak elkar erlazionatuta egon daitezkeen faktoreak direla proposatu izan da (Leech et al., 2014; Marshall et al., 2019).

Gainpisuaren arrazoen artean, gaur egungo ohitura sedentarioak aipatzea ezinbestekoa da. Adituek, telebista, ordenagailua edo bideo-kontsolaren aurrean egoteak sedentarismoa edo mugimendu falta sustatzen duela proposatu dute (Hardy et al., 2007; Nelson et al., 2006). Izan ere, haur eta nerabeek pantaila desberdinen erabilera eta Internet bidezko konexioetan, gailu finko eta mugikorretan ematen duten denbora kontuan hartuz, ezin daiteke ukatu multimedia jarduerak bere eguneroko bizitzaren parte garrantzitsua bilakatu direnik. Gaur egungo haur eta gazteak, telebistaz gain, teknologia berrien bitartez ere konektatuta daude kanpoko munduarekin. Hau da, pantailen aurrean lagunekin, familiarekin edo klaseko kideekin konektatuta egon daitezke lana, entretenimendu eta aisialdiaz gozatzeko beste era bat sortuz. Ezaguna da, haurtzaroan helduaroan baino multimedia kontsumo altuagoa izaten dela, baina nerabezaroan baino baxuagoa, bizitzako etapa honetan gorakadarik altuena topatuz (FEN (Fundación Española de la Nutrición), 2015). Osasunaren Munduko Erakundeak, 5 eta 17 urte arteko haur eta nerabeek garapen fisiko eta mental egokia izan dezaten, jarduera fisiko moderatua edo indartsua (gutxienez 60 minutu egunean) gomendatzen du (WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI), 2018). Hau ezaguna bada ere, Espainian, 9 eta 17 urte arteko haur eta nerabeen %55,4ak ez du gomendioa betetzen. Gehiegizko pisuak eta sedentarismoak haur eta nerabeen osasunean dituen ondorioak kontuan hartuz, Ameriketako Akademia Pediatrikoak (AAP), 2001 urtean gomendio batzuk argiratu zituen. Hauen artean, 5 eta 19 urte arteko haurrek egunean 2 ordu baino gehiago pantailen aurrean ez pasatzea (AAP, 2001). Hala ere, Espainiako haur eta nerabe gehienek ez dute gomendio hau betetzen (Mielgo-Ayuso et al., 2017), bereziki asteburuetan, beraien osasuna arriskuan jarritz.

Bestalde, elikadura eta dietetika adituek eta mundu osoko osasun agintariek elikadura osasuntsua eramateko beharra dagoela adierazten dute (Saunders eta Vallance, 2017). Kilokaloria altuko edo nutrienterik gabeko elikagaiak eta edariak eskuratzeko erraztasunak “inguru obesogenikoa” eragiten du, bereziki nerabeen kasuan (Calvert et al., 2018; Marshall et al., 2019; WHO European Childhood

Obesity Surveillance Initiative (COSI), 2018). Gehiegizko pisua eta obesitatea saihesteko, egunero osasungarri gosaltzea, frutak eta barazkiak jatea, zein, elikagai ez osasuntsuak murriztea (otartekoak, dieta azkarra, haragiki prozesatuak eta azukrez betetako edariak) oso garrantzitsua da. Dieta Mediterraneoan, dieta orekatutzat hartzen da, nutritiboa, osasungarria, erabilgarria, onargarria, eskuragarria, eroso eta bidezkoa delako. Horregatik hartzen da jarraitu beharreko eredutzat. Hala ere, giza aldaketak direla eta, ohiko Dieta Mediterraneoaren ordean, kilokaloria altuko dietak eta elikadura ohitura desorekatuak ari dira nabarmentzen (Ruiz et al., 2015). Aldaketa guzti hauek, haur eta nerabeen dietetan, gantz eta azukrea gehitu, eta zerealak, barazkiak, frutak, zuntza eta karbohidrato konplexuen kopurua murrizten dute. Haur, nerabe eta etorkizuneko helduengan pisu-arazoak eraginez.

Elikadura aldaketek eta aisialdiko jardura fisikoaren murrizketak osasun arriskuak eragin ditzakete. Lan honen asmoa, Bilbo Handiko haur eta nerabeen multimedia bizi ohitura sedentarioak eta Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura ezagutzeaz gain, bien arteko elkar-erlazioaren azterketa egitea zen. Behin, faktore hauek eta beraien arteko erlazioak ezagututa, ohitura ez osasuntsuak aldatzeko ekintzak eta interbentzioak diseinatu ahal izateko.

2.1. Helburuak

- 1) Bilbo Handiko haur eta nerabeen multimedia bizi ohitura sedentarioak deskribatzea.
- 2) Bilbo Handiko haur eta nerabeen Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura maila ezagutzea.
- 3) Multimedia bizi ohitura sedentarioak eta Dieta Mediterraneoarekiko atxikiduraren arteko erlazioa aztertu eta adinaren arabera ezberdintasunak deskribatzea.

3. Ikerketaren muina

3.1. Materiala eta metodoak

Ikerketa honetan, Bilbo Handiko Lehen Hezkuntza (LH) eta Derrigorrezko Bigarren Hezkuntzako (DBH) 515 ikasleek, 265 haur (11 eta 12 urte) eta 250 nerabek (14 eta 15 urte) parte hartu zuten. Ikastetxe parte hartzaileek ezaugarri sozio-ekonomiko desberdinak zituzten Bilboko Behatoki Sozio-ekonomikoaren datuen arabera (Ayuntamiento de Bilbao, 2009). Ikerketa, Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Gizakiekin lotutako Ikerketarako Etika Batzordeak (GIEB) onartu zuen eta datuak 2010-2011 ikasturte bitartean jaso ziren.

Ikasleek multimedia ekintza sedentarioei eta elikadura ohiturei buruzko galdeketa bat bete zuten, klaseko orduetan eta ikerketa taldeko kideen laguntza izanik. Galdetegian, telebista, ordenagailua eta bideo-jokoetan jolasten zuten denbora adierazi zuten, eta datuak, Amerikako Akademia Pediatriko (AAP) gomendioen arabera sailkatu ziren (< 2 ordu edo ≥ 2 ordu, astean zehar eta asteburuetan) (AAP, 2001). Horretaz gain, gailu bakoitzeko eguneko media eta gailu guztien batez besteko media totala kalkulatu ziren. Ikertzaileek, ikasleak pisatu eta neurtu zituzten, eta bere Gorputz Masa Indizea (GMI) kalkulatu zuten, geroago *International Obesity Task Force*-aren (IOTF) 4 kategoria ezberdinetan sailkatzeko (osasungarria, gainpisua, obesitatea eta pisu-gutxiegitasuna) (Cole, 2000). Gurasoek beste galdetegi bat bete zuten ezaugarri soziodemografikoak (generoa, adina, familia egitura, seme-alaben kopurua, ikasketa maila), inguruneak (gailu elektronikoaren kopurua) eta soziokulturalak (gailu elektronikoak erabiltzeko arauak) adieraziz. Horretaz gain, gurasoek ere, beraien pisu eta altueraren datuak eman zituzten eta bere GMI kalkulatu zen, Osasunaren Munduko Erakundearen ildoak jarraituz (OMS, 2000).

Beste alde batetik, ikasleen Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura neurtzeko, Kidmed izeneko galdeketa fidagarria burutu zen (Serra-Majem et al., 2004). Galdetegi honetan, elikadurari buruzko 16 item-galdera agertzen ziren. Galderen erantzun posibleak egia edo gezurra ziren eta hauetako 12 item-ek konnotazio positiboa zuten (adibidez, oliba-olioa etxean erabiltzea; +1 puntu) eta 4 itemek konnotazio negatiboa (adibidez, ez gosaltzea; -1 puntu). Lortutako puntuazio totalaren arabera (0 eta 12 artean) Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura hiru kategorietan sailkatu zen (atxikidura altua 8 eta 12 puntuen artean, ertaina 4 eta 7 puntuen artean, eta baxua 0 eta 3 puntuen artean). Zenbat eta puntuazio altuagoa lortu, orduan eta Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura hobeagoa zen. Datuak

IBMSPSS (v.23) programa informatiko estatistikoarekin analizatu ziren. Adin-tarte ezberdinetako media konparaketak, t-Student probaren bitartez lortu ziren, eta aldagai kategorikoetako analisiak khi-karratuarekin egin ziren, esangura estatistikoa $p \leq 0,05$ zelarik.

3.2. Emaitzak

3.2.1. Datu deskriptiboak

Ikerketan 11-12 urteko 265 haur (%55,1 neskak eta %44,9 mutilak) eta 14-15 urteko 250 nerabek (%52,8 neskak eta %47,2 mutilak) parte hartu zuten. Ikasleen ezaugarri soziodemografikoak, multimedia jarduera sedentarioak eta Dieta Mediterraneoarekiko atxikiduraren datuak, 1. Taulan agertzen dira adinaren arabera sailkatuak. Bertan, adin taldeen artean, genero eta gorputz masa indizean ezberdintasunik ez zegoela ikusi zen. Hala ere, Lehen Hezkuntzan zeuden umeen gurasoek, Derrigorrezko Bigarren Hezkuntzan zeuden gurasoek baino ikasketa maila altuagoa zutela deskribatu zen ($p < 0,01$).

1. taula. Haur eta nerabeen datu soziodemografikoak, multimedia jarduera sedentarioak eta Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura adinaren arabera

		LEHEN HEZKUNTZA N = 265 (%51,5)	BIGARREN HEZKUNTZA N = 250 (%48,5)	
EZAUGARRI SOZIODEMOGRAFIKOAK		n (%)	n (%)	p
Adina (μ) ± (DS)		11,35 ± 0,02	14,46 ± 4,66	
Generoa n (%)	Neskak	146 (%55,1)	132 (%52,8)	0,60
	Mutilak	119 (%44,9)	118 (%47,2)	
Umeen Gorputz Masaren Indizea (GMI) n (%)	Pisu osasungarria	184 (%70,5)	184 (%74,5)	0,43
	Gainpisua	63 (%24,1)	56 (%22,7)	
	Obesitatea	8 (%03,1)	5 (%02,0)	
	Pisu-gutxiegitasuna	6 (%02,3)	2 (%00,8)	
Familia egitura monoparentala n (%)	Bai	42 (%16,7)	41 (%17,0)	0,93
	Ez	209 (%83,3)	200 (%83,0)	
Anai-arreben presentzia n (%)	Bai	53 (%20,5)	47 (%19,2)	0,70
	Ez	205 (%79,5)	198 (%80,8)	
Gurasoen ikasketa maila n (%)	2. hezkuntza	47 (%18,9)	74 (%30,6)	<0,01
	Batxilergoa	76 (%30,5)	71 (%29,3)	
	Goi-mailakoa	126 (%50,6)	97 (%40,1)	
Eskolaren maila sozio-ekonomikoa n (%)	Altua	111 (%41,9)	86 (%34,4)	0,19
	Ertaina	83 (%31,3)	84 (%33,6)	
	Baxua	71 (%26,8)	80 (%32,0)	
MULTIMEDIA JARDUERA SEDENTARIOAK				
Telebista ikusi n (%)	< 2 ordu/egun	127 (%48,8)	89 (%35,9)	<0,01
	≥ 2 ordu/egun	133 (%51,2)	159 (%64,1)	
Ordenagailuan jolastu n (%)	< 2 ordu/egun	215 (%83,0)	114 (%46,3)	<0,001
	≥ 2 ordu/egun	44 (%17,0)	132 (%53,7)	
Bideo-jokoetara jolastu n (%)	< 2 ordu/egun	212 (%81,5)	198 (%80,5)	0,76
	≥ 2 ordu/egun	48 (%18,5)	48 (%19,5)	
Multimedia denbora total n (%)	< 2 ordu/egun	42 (%16,3)	11 (%04,5)	<0,001
	≥ 2 ordu/egun	214 (%83,7)	233 (%95,5)	
DIETA MEDITERRANEOAREKIKO ATXIKIDURA				
Kidmed Indizea n (%)	Pobrea	16 (%06,3)	30 (%12,3)	<0,01
	Ertaina	120 (%46,9)	127 (%52,0)	
	Ona	120 (%46,9)	87 (%35,7)	

Multimedia jarduera sedentarioei zegokienez, adierazitako bi adin tarteen artean ezberdintasunak aurkitu ziren, telebista eta ordenagailuen erabileran, eta denbora totalan, hain zuzen ere. Telebista ikusten igarotako denboraren kasuan, AAP-ren gomendioak betetzen ez zutenen ehunekoa, %51,2a zen haurretan eta %64,1a nerabeetan ($p<0,01$). Gainera, azpimarratzekoa da Derrigorrezko Bigarren Hezkuntzako ikasleen kasuan, telebista egunean bi ordu baino gehiago ikusten zuten ikasleen kopurua ia bikoitza zela, bi ordu baino gutxiago ikusten zutenekin alderatuz (%35,9a eta %64,1a hurrenez hurren). Ordenagailuaren erabileraren ordu kopuruaren kasuan, AAP-ren gomendioak betetzen ez zituzten haurren ehunekoa %17koa izan eta nerabeetan %53,7a ($p<0,001$). Azkenik, multimedia gailuetan pasatutako denbora totalari zegokionez, bi adin tarteen artean ere ezberdintasunak aurkitu ziren ($p<0,001$); AAP-ren gomendioak betetzen ez zutenen ehunekoa, haurretan %83,7a eta nerabeetan %95,5ekoa zelarik. Bestetik, Dieta Mediterraneoarekiko atxikidurari zegokionez ere, haur eta nerabeen artean ezberdintasunak aurkitu ziren ($p<0,01$). Honela, haurretan atxikidura ona zutenen ehunekoa %46,9koa izan zen eta nerabeetan, aldiz, %35,7koa.

3.2.2. Multimedia jarduera sedentarioak eta Kidmed Indizearen arteko erlazioa

Ondoren azaltzen den 2. Taulan, multimedia jarduera sedentarioak eta Kidmed Indizearen arteko erlazioa adinaren arabera deskribatzen da. Telebista eta ordenagailuaren aurrean igarotako orduen kasuetan ez zen erlazorik aurkitu haur eta nerabeen artean. Hala ere, joera bat deskribatu zen. Zenbat eta ordu gehiago eman bi gailuetan, Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura okerragoa zen. Bideo-kontsolen kasuan, haurretan ezberdintasun estatistikoak aurkitu ziren egunean bi ordu baino gutxiago eta bi ordu baino gehiago ematen zutenen artean ($p<0,05$). Honela, egunean bideo-jokoetan jolasten bi ordu baino gutxiago ematen zutenen artean, gehienek (%87,9a) Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura ona zuten. Nerabeen kasuan, bideo kontsolarari zegokionez, joera bera topatu zen nahiz eta ez zen ezberdintasun estatistikorik deskribatu. Multimedia gailuetan pasatutako denbora totalari zegokionez, haurren kasuan ere egunean bi ordu baino gutxiago eta bi ordu baino gehiago erabiltzen zutenen artean erlazioa deskribatu zen ($p<0,05$). Modu honetan, denbora multimedia totalan egunean bi ordu baino gutxiago ematen zutenen %20,9ak Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura ona zuten (%20,9a). Nerabeen kasuan, joera bera topatu zen, nahiz eta ez zen ezberdintasun estatistikorik aurkitu.

2. taula. Multimedia jarduera sedentarioak eta Kidmed Indizearen arteko erlazioak adinaren arabera

		Lehen Hezkuntza N = 265 (%51,5) n (%)			Bigarren Hezkuntza N = 250 (%48,5) n (%)		
		Telebista < 2 ordu/egun	Telebista ≥ 2 ordu/egun	p	Telebista < 2 ordu/egun	Telebista ≥ 2 ordu/egun	p
Kidmed n (%)	Pobrea	5 (%31,3)	11 (%68,8)	0,17	9 (%30,0)	21 (%70,0)	0,31
	Ertaina	55 (%46,2)	64 (%53,8)		41 (%32,3)	86 (%67,7)	
	Ona	63 (%53,8)	54 (%46,2)		36 (%41,4)	51 (%58,6)	
		Ordenagailua < 2 ordu/egun	Ordenagailua ≥ 2 ordu/egun		Ordenagailua < 2 ordu/egun	Ordenagailua ≥ 2 ordu/egun	
Kidmed n (%)	Pobrea	12 (%75,0)	4 (%25,0)	0,25	9 (%30,0)	21 (%70,0)	0,08
	Ertaina	96 (%80,0)	24 (%20,0)		57 (%45,2)	69 (%54,8)	
	Ona	100 (%87,0)	15 (%13,0)		46 (%53,5)	40 (%46,5)	
		Kontsola < 2 ordu/egun	Kontsola ≥ 2 ordu/egun		Kontsola < 2 ordu/egun	Kontsola ≥ 2 ordu/egun	
Kidmed n (%)	Pobrea	10 (%62,5)	6 (%37,5)	<0,05	21 (%70,0)	9 (%30,0)	0,14
	Ertaina	93 (%77,5)	27 (%22,5)		106 (%84,8)	19 (%15,2)	
	Ona	102 (%87,9)	14 (%12,1)		68 (%78,2)	19 (%21,8)	
		Multim. totala < 2 ordu/egun	Multim. totala ≥ 2 ordu/egun		Multim. totala < 2 ordu/egun	Multim. totala ≥ 2 ordu/egun	
Kidmed n (%)	Pobrea	0 (%0)	16 (%100)	<0,05	2 (%06,7)	28 (%93,3)	0,75
	Ertaina	15 (%12,6)	104 (%87,4)		5 (%04,0)	119 (%96,0)	
	Ona	24 (%20,9)	91 (%79,1)		3 (%03,5)	83 (%96,5)	

3.3. Eztabaida

3.3.1. Ikerketaren emaitza nagusiak

Ikerketa honetan, aztertutako bi adin taldeetan, ikasleek multimedia ekintza sedentarioetan ematen zuten denbora totalan eta gailu desberdinen erabileran ezberdintasunak deskribatu ziren. Orokorrean, nerabeek gazteek baino gutxiago betetzen zituzten multimedia denbora totalarentzako AAP-ren gomendioak. Telebista gehiegi ikusteaz gain, ordenagailu eta bideo-kontsolan jolasten ere gero eta denbora gehiago ematen zuten. Dirudienez, nagusitu ahala ikasleak gero eta sedentarioagoak bilakatzen ziren eta aldi berean, ordenagailua eta bideo-kontsolaren erabilerak goraka zihoazen.

Dieta Mediterraneoarekiko atxikiduran ere ezberdintasunak deskribatu ziren adinaren arabera. Lehen Hezkuntzan Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura txarra zutenak %6,3a ziren eta Derrigorrezko Bigarren Hezkuntzan ehunkoa bikoitza zen (%12,3a). Hau da, haur gazteek, nerabeek baino elikadura ohitura osasungarriagoak aurkeztu zituzten. Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura eta multimedia jarduera sedentarioen arteko erlazioari zegokionez, bazirudien zenbat eta denbora gehiago eman ekintza sedentarioetan, elikadura ohitura ez osasungarriarekin erlazionatzen zela haur gazteetan. Izan ere, egunero, batez beste, bi ordu baino gehiago kontsoletara jotzen ematen zuten haurrek, Kidmed Indize okerragoa zuten. Eta era berean, multimedia denbora totalari zegokionez, egunero, bataz beste, bi ordu baino gehiago jarduera sedentario totalan ematen zuten haurrek ere, Dieta Mediterraneo okerrago jarraitzen zuten.

3.3.2. Gai honi buruz ezagutzen dena

Espainiako haur eta nerabe gehienek ez dituzte AAP-ren gomendioak betetzen (Mielgo-Ayuso et al., 2017), bereziki asteburuetan. Aurreko ikerketek erakutsi dutenaren arabera, nerabeek haurrek baino denbora gehiago ematen dute multimedia ekintza sedentarioetan (Marques et al., 2018; Mielgo-Ayuso et al., 2017). Gure ikerketan ere, bi urteko tartea duten gazteen kasuan, nerabeak sedentarioago bihurtzen zirela deskribatu zen.

Dieta Mediterraneoarekiko atxikidurari dagokionez, duela gutxi argitaratutako berrikuspen sistematiko baten arabera, Kidmed Indizean eragina duten faktoreen artean adina zegoen (Iaccarino et al., 2017). Gure emaitzetan, Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura hobe zutenak Lehen Hezkuntzako haurrak ziren. Beraz, denbora pasa ahala, dieta ohitura osasungarriak okertu egiten dira. Bestetik, multimedia jarduera sedentarioak eta Dieta Mediterraneoarekiko atxikiduraren arteko erlazioari dagokionez, aurreko ikerketek ere guk deskribatutako asoziazio adierazgarriak erakutsi dituzte (Iaccarino et al., 2017). Honela, gure emaitzen arabera, egunean bi ordu baino gehiago multimedia gailuetan pasatzen zuten haurrek gazteek baino Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura txarragoa zuten; eta era berean, egunean bideo-jokoetan bi ordu baino gehiago jolasten zutenek ere Kidmed Indize okerragoa zuten. Hortaz, multimedia ohitura sedentarioak eta dieta ez osasuntsuak eskutik zihoazela ematen zuen, beste autore batzuek lehenago ere baieztatu zuten bezala (Hobbs et al., 2015). Autoreen esanetan, erlazio honetako zioak ez zeuden oso argi eta honen inguruan gehiago ikertzeko beharra zegoela azpimarratu zuten..., baina fruitua eta barazkiak gutxiago jaten zuten ikasleek, eta Kilokaloria altuko edo nutrienterik gabeko elikagaiak eta edariak hartzen zituztenak, sedentarioagoak zirela ematen zen.

Azkenik, ikerketan ikusitakoarekin, Euskadin gehiago ikertu beharko litzateke gai honen inguruan. Datu eguneratuak eta lagin handiagoak izateko eta emaitzak Espainiako datuekin konparatu ahal izateko.

3.3.3. Ikerketa honen ekarpena

Ikerketa honen helburua, Bilbo Handiko haur eta nerabeen ohitura sedentarioak eta elikadura ohiturak ezagutu eta bi faktore hauen arteko erlazioak aztertzea zen, adinaren arabera. Bi urteetan zehar multimedia denbora eta dieta nola aldatzen diren aztertuz, eta faktore hauen arteko erlazioak ezagutuz, etorkizunean neurri egokiak planifikatu ahal izango dira gazteen osasuna sustatu ahal izateko. Espainian, ikerketa gutxi egin dira gazteen jarduera ohitura sedentarioak eta elikadura ohiturak bi adin tarte hauen arabera konparatzen dituztenak, eta Euskadin ez da horrelako ikerketarik

ezagutzen. Era berean, Euskadin gutxi izan dira, haur eta nerabeen Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura aztertu izan dituzten ikerketak. Hau kontuan hartuta, lan honen ekarpena funtsezkoa da, Osasun Publikoko arazo larri hau agerian jartzen duelako.

Ikerketa honetako ohitura sedentarioen emaitzak bat datoz aurretik maila internazionalen argitaratutako ikerketen datuekin. Honela, ikasleak zenbat eta adinez nagusiagoak izan, hainbat eta denbora gehiago ematen dute multimedia ekintza sedentarioetan. Hala ere, beste ikerketetan ez bezala, gailuen artean ezberdintasun nabariak ikusi dira adinaren arabera. Izan ere, gure ikerketak, ekintza multimedia mota ezberdinak aztertu ditu (telebista ikusi, ordenagailuan jolastu, bideo-kontsoletan jolastu eta ekintza sedentario denbora totala). Aurreko ikerketa gehienak, telebista ikustean zentratu egin dira batez ere, ekintza sedentario nagusia izan delako orain arte. Gure ikerketak, ekarpen garrantzitsua egiten du zentzu honetan, ekintza multimedia mota ezberdinak aztertu dituelako. Modu honetan, gazteen multimedia gailuen erabilera lehentasunak edo gustuak adinaren arabera aldatzen direla badirudi eta honekin batera, ekintza sedentario motak ere bai. Hau dela eta, adinaren arabera pantaila desberdinen erabilera aztertzen dituzten ikerketa gehiago egitea funtsezkoa da, haur eta nerabeen errealtatea hobeto ulertu ahal izateko.

Azkenik, ikerketa honetan, denbora pasa ahala Bilbo Handiko ikasleen Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura okertu egiten dela deskribatu da. Bestetik, haurtzarotik Dieta Mediterraneoarekiko atxikidurak, multimedia jarduera sedentarioekin (batez ere kontsolarekin eta ekintza sedentario denbora totalarekin) erlazioa duela ere deskribatu izan da. Beraz, gure haurren eta nerabeen osasuna sustatu edo errekonferatu nahi bada, lehengo urteetatik hasita Lehen Hezkuntzan Osasun Publikoko ekintzak beharrezkoak direla kontuan izan behar da.

3.3.4. Mugak

Ikerketa honek, hainbat muga aurkezten ditu. Alde batetik aipatu beharreko muga bat ikerketaren diseinua da, zeharkakoa izanik ezin daitekeelako kausa-asoziazio erlazio zuzena dagoenik baieztatu. Bestetik, galdeketeekin erlazioatuta, Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura eta multimedia ohitura sedentarioei buruzko datuak, galdeketa auto-administratuen bitartez bildu ziren. Galdeketa hauek, ikasle gazteen kasuan batez ere, betetzeko zailak izan daitezkeela kontuan izan behar da, oroimenak edota ulermenak eragina izan dezaketelako.

3.4. Ondorioak

Euskadiko haur eta nerabeen gainpisuaren tasak Estatukoak baino baxuagoak badira ere, oso kezagarriak dira. Haurtzarotik nerabezarora arte (bakarrik bi urtetan, 11-12 urtetik 14-15 urtetara arte) multimedia jarduera sedentarioetan emandako denbora asko handitzen da, eta aldi berean, Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura ere okerragoa da. Bi faktore hauen arteko erlazioa estua ikusi ez arren, Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura ona duten haurrek bideo-joko eta ekintza sedentario totalen denbora gutxiago ematen dute. Badirudi Dieta Mediterraneoarekiko atxikidura ona izateak eta multimedia gailutan denbora gutxiago igarotzeak, gehiegizko pisua saihesteko lagungarriak izan litezkeela. Etorkizuneko norabideei begiratuz, aurkitu dugun erlazio hau arakatzen duten ikerketa prospektiboak eta haur eta nerabeentzako ikerketa gehiago egitea beharrezkoa izango da. Eta arlo guztietako osasun sustatzaileek (erizainok, irakasleak, familiak, ikertzaileak, udalak, gobernauak...) elkarrekin lan egin beharko lukete, ekintza eta interbentzioa eraginkorrak diseinatzeko eta Osasun Publikoko programak martxan jarri.

4. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Azken urteotan, obesitatea, bai haurtzaroan bai nerabezarora, munduko Osasun Publikoko arazorik larrienetarikoa bat bilakatu dela kontuan hartuta, haur eta nerabeen gaixotasun kroniko aurreikusitako edo ager daitezkeen arazo psikosozialak saihesteko, arlo desberdinetatik, osasuna sustatzeko ekintzak burutu behar dira. Ekintza hauek aurrera eramateko, ikastetxeak dira, leku aproposenak. Hala ere, gaur egun, Estatuan zein Euskadin ikastetxe gutxi dute Eskolako Erizainaren lanpostua. Osasun sustatzaile hau eskola guztietan izatea ezinbestekoa da, ikasleekin harreman estua mantentzen duelako eta bizi ohitura kaltegarriak zuzen aldatzen lagundu dezakeelako. Gaur egun,

gazteen osasuna zaintzeko neurri ezberdinak martxan jarri badira ere, esaterako *katering*, elikadura hobetzea edota eskolan kirola praktikatzeko denbora handitzea, badirudi oraindik asko dagoela egiteke. Honela, ekintza sedentarioak murriztu eta elikadura ohitura osasungarriak sustatzeko gizarteko agente ezberdinen, Eskolako Erizainen eta familien arteko lan bateratua ezinbestekoa da obesitatearen prebentziorako.

5. Bibliografia

- American academy of pediatrics. (2001). Committee on public education. Children, adolescents, and television. *Pediatrics*, 107(2), 437–441.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid, 2016. (2015). Estudio ALADINO 2015: Estudio de Vigilancia del Crecimiento, Alimentación, Actividad física Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid, 2016. (2015). Estudio ALADINO 2015: Estudio de. Retrieved from http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/seccion/estrategia_naos.htm
- Ayuntamiento de Bilbao. (2009). Lan Ekintza. Observatorio socioeconómico.
- Calvert, S., Dempsey, R., & Povey, R. (2018). Delivering in-school interventions to improve dietary behaviours amongst 11- to 16-year-olds: A systematic review. *Obesity Reviews*, In Press(July), 1–11. <http://doi.org/10.1111/obr.12797>
- Chung, S. T., Onuzuruike, A. U., & Magge, S. N. (2018). Cardiometabolic risk in obese children. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1411(1), 166–183. <http://doi.org/10.1111/nyas.13602>
- Cole, T. J. (2000). Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *Bmj*, 320(7244), 1240–1240. <http://doi.org/10.1136/bmj.320.7244.1240>
- European Commission, & OECD. (2018). *Health at a Glance: Europe 2018 STATE OF HEALTH IN THE EU CYCLE*. http://doi.org/10.1787/health_glance_eur-2018-en
- FEN (Fundación Española de la Nutrición). (2015). Sedentarismo en niños y adolescentes españoles : resultados del estudio científico ANIBES Sedentarismo en niños y adolescentes españoles : resultados del estudio científico ANIBES. *BMC Public Health*, 5. Retrieved from http://www.fen.org.es/anibes/archivos/documentos/ANIBES_numero_13.pdf
- Hardy, L. L., Bass, S. L., & Booth, M. L. (2007). Changes in sedentary behavior among adolescent girls: a 2.5-year prospective cohort study. *Journal of Adolescent Health*, 40(2), 158–165.
- Hobbs, M., Pearson, N., Foster, P. J., & Biddle, S. J. H. (2015). Sedentary behaviour and diet across the lifespan: An updated systematic review. *British Journal of Sports Medicine*, 49(18), 1179–1188. <http://doi.org/10.1136/bjsports-2014-093754>
- Iaccarino Idelson, P., Scalfi, L., & Valerio, G. (2017). Adherence to the Mediterranean Diet in children and adolescents: A systematic review. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 27(4), 283–299. <http://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.01.002>
- Kelsey, M. M., Zaepfel, A., Bjornstad, P., & Nadeau, K. J. (2014). Age-Related Consequences of Childhood Obesity. *Gerontology*, 60(3), 222–228. <http://doi.org/10.1159/000356023>
- Leech, R. M., McNaughton, S. A., & Timperio, A. (2014). The clustering of diet, physical activity and sedentary behavior in children and adolescents: A review. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 11(1), 1–9. <http://doi.org/10.1186/1479-5868-11-4>
- Llewellyn, A., Simmonds, M., Owen, C. G., & Woolcott, N. (2016). Childhood obesity as a predictor of morbidity in adulthood: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 17(1), 56–67. <http://doi.org/10.1111/obr.12316>
- Marques, A., Loureiro, N., Avelar-Rosa, B., Naia, A., & Matos, M. G. de. (2018). Adolescents' healthy lifestyle. *Jornal de Pediatria*, (xx). <http://doi.org/10.1016/j.jpmed.2018.09.002>
- Marshall, T. A., Curtis, A. M., Cavanaugh, J. E., Warren, J. J., & Levy, S. M. (2019). Child and Adolescent Sugar-Sweetened Beverage Intakes Are Longitudinally Associated with Higher Body Mass Index z Scores in a Birth Cohort Followed 17 Years. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. <http://doi.org/10.1016/j.jand.2018.11.003>
- Mielgo-Ayuso, J., Aparicio-Ugarriza, R., Castillo, A., Ruiz, E., Avila, J. M., Aranceta-Bartrina, J., ... González-Gross, M. (2017). Sedentary behavior among Spanish children and adolescents: findings from the ANIBES study. *BMC Public Health*, 17(1), 1–9. <http://doi.org/10.1186/s12889-017-4026-0>
- Nelson, M. C., Neumark-Stzainer, D., Hannan, P. J., Sirard, J. R., & Story, M. (2006). Longitudinal and secular trends in physical activity and sedentary behavior during adolescence. *Pediatrics*, 118(6), e1627–e1634.
- Olson, M., Chambers, M., & Shaibi, G. (2018). Pediatric Markers of Adult Cardiovascular Disease. *Current Pediatric Reviews*, 13(4), 255–259.

- <http://doi.org/10.2174/1573396314666180117092010>
- Organization, W. H. (2000). *Obesity: preventing and managing the global epidemic*. World Health Organization.
- Ruiz, E., Ávila, J. M., Valero, T., Pozo, S. Del, Rodriguez, P., Aranceta-Bartrina, J., ... Varela-Moreiras, G. (2015). Energy intake, profile, and dietary sources in the spanish population: Findings of the ANIBES study. *Nutrients*, 7(6), 4739–4762. <http://doi.org/10.3390/nu7064739>
- Saunders, T. J., & Vallance, J. K. (2017). Screen Time and Health Indicators Among Children and Youth: Current Evidence, Limitations and Future Directions. *Applied Health Economics and Health Policy*, 15(3), 323–331. <http://doi.org/10.1007/s40258-016-0289-3>
- Serra-Majem, L., Ribas, L., Ngo, J., Ortega, R. M., García, A., Pérez-Rodrigo, C., & Aranceta, J. (2004). Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. Development of KIDMED, Mediterranean Diet Quality Index in children and adolescents. *Public Health Nutrition*, 7(07), 931–935. <http://doi.org/10.1079/PHN2004556>
- Simmonds, M., Llewellyn, A., Owen, C. G., & Woolacott, N. (2016). Predicting adult obesity from childhood obesity: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 17(2), 95–107. <http://doi.org/10.1111/obr.12334>
- Singh, A. S., Mulder, C., Twisk, J. W. R., Van Mechelen, W., & Chinapaw, M. J. M. (2008). Tracking of childhood overweight into adulthood: A systematic review of the literature. *Obesity Reviews*, 9(5), 474–488. <http://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2008.00475.x>
- Umer, A., Kelley, G. A., Cottrell, L. E., Giacobbi, P., Innes, K. E., & Lilly, C. L. (2017). Childhood obesity and adult cardiovascular disease risk factors: A systematic review with meta-analysis. *BMC Public Health*, 17(1), 1–24. <http://doi.org/10.1186/s12889-017-4691-z>
- Weiss, R., Caprio, S., Trombetta, M., Taksali, S. E., Tamborlane, W. V, & Bonadonna, R. (2005). - Cell Function Across the Spectrum of Glucose Tolerance in Obese Youth, 54(6), 1735–1743. <http://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1735>
- WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI). (2018). Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI) Factsheet. Highlights 2015-17 (2018). Retrieved from <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/publications/2018/childhood-obesity-surveillance-initiative-cosi-factsheet.-highlights-2015-17-2018>

6. Eskerrak

Eskerrak eman nahi nituzke batez ere Itziar Hoyos laguna eta tesi zuzendariari, bere pazientziagatik eta irakatsi didan guztiagatik, etorkizunean eta tesian oso baliagarria izango baitzaidalako.

Bestetik, “*Work Lunch*” taldeko kideei: nire laguna Leyreri, Ametsi, Juleri eta Iratiri, gainean egoteagatik, bere konfiantza eskaintzeagatik eta elkarrekin lan egiteko aukera emateagatik. Eskerrik asko, neskak!

AHK2: Duchenne gihar-distrofian potentzial terapeutikoa duen kalstabina modulatzailerria

Lasa Fernandez, Haizpea^{1,2,3}; González Lafuente, Laura⁴; Navarro García, Jose Alberto⁴; Lasa Elgarresta, Jaione^{1,2}; Irastorza, Aitziber⁵; Miranda, Jose Ignacio⁵; Aizpurua, Jesus Maria⁵; López de Munain, Adolfo^{1,2,3,6}; Ruiz Hurtado, Gema⁴ eta Vallejo Illarramendi, Ainara^{1,2,7}

¹ Neurozientzia Saila, Biodonostia Osasun Ikerketa Institutua, Donostia; ² CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III, Madril; ³ Neurozientzia Saila, EHU, Leioa; ⁴ Cardioresnal translational laboratory, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madril; ⁵ Kimika Fakultatea, EHU, Donostia; ⁶ Neurologia Saila, Donostiako Ospitalea, Donostia; ⁷ Pediatria Saila, EHU, Donostia

haizpea.lasa@ehu.eus

Laburpena

Duchenne gihar-distrofia (DMD) ikertzeko erabiltzen diren mdx saguak 12 astez tratatu dira AHK2 izeneko molekula berriarekin eta konposatu honek bihotzean duen eragina aztertu da. Batetik, elektrokardiogramak egin zaizkie saguei eta, bestetik, bihotzeko zelulak isolatu eta kardiomyozito hauetan kaltzioarekin lotutako hainbat ezaugarri aztertu dira mikroskopia konfokalean. Lan honetan AHK2-ak nitrosilazio zein fosforilazioak eraldatutako rianodina-hartzaileen funtzioa berrezartzen duela ikusi da, kaltzio txinparta edo spark-en jaitsiera esanguratsua eragiten baitu. Gainera, tratamenduak bihotzaren funtzioa hobetzen duela dirudi, elektrokardiograma bidez sagu gaixoen QTc tarteak, bihotzak birpolarizatzeko behar duen denbora, laburtzen duela ikusi baita.

Hitz gakoak: Duchenne gihar-distrofia, bihotza, mdx, kaltzioa, rianodina-hartzailea, kalstabina.

Abstract

Mdx mice, the most used animal model to research Duchenne muscular dystrophy, were treated for 12 weeks with the novel compound AHK to focus on its effect in the heart. With this aim, heart functionality was analyzed by electrocardiography and, also, cardiomyocytes were isolated from treated mice in order to study the effect on calcium handling by confocal microscopy. In this work it has been shown that AHK2 can modulate the function of the nitrosylated and phosphorylated ryanodine receptor, since it reduces the calcium spark frequency significantly. Moreover, it seems that the treatment improves heart function, decreasing QTc length, time to repolarize during a heartbeat.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, heart, mdx, calcium, ryanodine receptor, calstabin.

1. Sarrera eta momentuko egoera

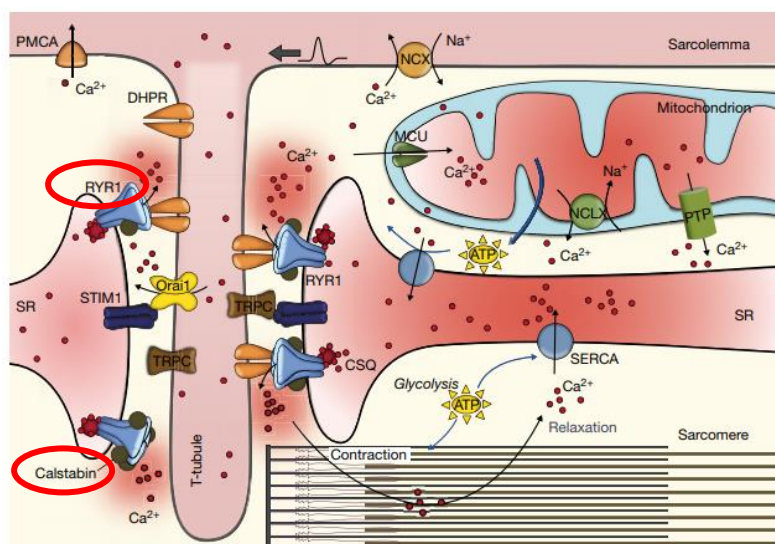
Duchenne gihar-distrofia (DMD) haurtzaroan gehien diagnostikatzen den distrofia muskular mota da eta, batez beste, 3500 mutiletik batek pairatuko du, X kromosoman dagoen distrofina geneko mutazio ezberdinak izanik gaixotasun honen erantzuleak. Distrofina proteina funtzionalik ez izateak giharren mekanismoan eragiten du. Izan ere, proteina honek funtzio estrukturala du, aktina filamentuak zelulaz kanpoko mintzarekin lotuz, gihar-zuntzen arteko loturak egonkortzen ditu. Beraz, distrofinarik gabe fibrosia emango da, hots, giharreko zelulak hil eta ehun konektibo zein gantzatsuak hartuko du euren tokia, giharraren funtzioa galduz (World Duchenne Organization, 2019).

Gaur egun sendabiderik ez duen distrofia-mota honetan, sintomak pixkanaka azaleratzen dira bi eta sei urteren artean, eta, endekatze-prozesu progresiboaren ondorioz nerabegarorako gorpildun aulkiaren premia dute. Gaixotasun honen ezaugarri nagusia gihar eskeletikoko atrofia

den arren, bihotzean ere arazoak dituzte eta gehienetan arnas-aparatuko huts batek eragiten du gaixoen heriotza 20-30 urteren artean, diafragma oso kaltetuta dutelako.

Ikerketa lerro nagusiak DMD gaixoen organismoan, gene-terapia bidez, distrofina genearen kopia zuzen bat txertatzera bideratuta daude. Dena den, terapia zehatz bat diseinatu beharko litzateke mutazio bakoitzeko. Beste estrategia bat distrofinaren gabeziak sortzen dituen kalteei aurre egitea da. Besteak beste, DMD gaixotasunean kaltzioaren kanalak diren rianodina-hartzaileek (RyR) fosforilazioak eta nitrosilazioak dituztela deskribatuta dago, distrofina ezak sortutako ROS eta NOS erradikal askeen eraginez (Bellinger et al., 2009). Eraldaketa hauek RyR-aren konformazio estrukturala aldatzen dute (Nikolaienko et al., 2018) eta, ondorioz, kalstabina, kaltzio-kanalak konformazio itxian mantentzeaz arduratzen den proteina, ezin da hartzailera behar bezala lotu. Honela, kaltzioa kontrolik gabe eta modu esporadikoan irteten da erretikulu sarkoplasmatikotik. RyR kanalek ezinbesteko funtzioa dute giharren uzkurdu-erlaxazio prozesuan, seinale elektrokimikoa iristean kaltzioa askatzen baitute sarkolemara eta ioi honek miosina-aktina bidezko uzkurdu aktibatzen du (Vallejo-Illarramendi et al., 2014).

1. irudia. Kaltzioaren seinalizazio-dinamika gihar-zuntzetan (Vallejo-Illarramendi et al., 2014).



Duchenne gihar-distrofia RyR kanala farmako bidez modulatzeko lehen ahaleginak Marks-en taldeak egin ditu, S107 eta ARM210 molekulekin, eta, emaitza esanguratsuak eskuratu dituzten arren (Bellinger et al., 2009; Capogrosso et al. 2018), toxikotasun arazoak direla medio, ez da fase klinikora pasatu. Honen harira, Aizpurua doktoreak gidaturiko EHUKo Kimika Saileko Katalisi jasangarria unitateak RyR itu duen AHK2 izeneko molekula sortu du. Zehazki AHK2 molekula kalstabina proteina modulatzeko diseinatu da eta honek, besteak beste, itzulpen ondorengo aldaketak dituzten RyR kanalak konformazio itxian mantentzen ditu.

2. Ikerketaren helburuak

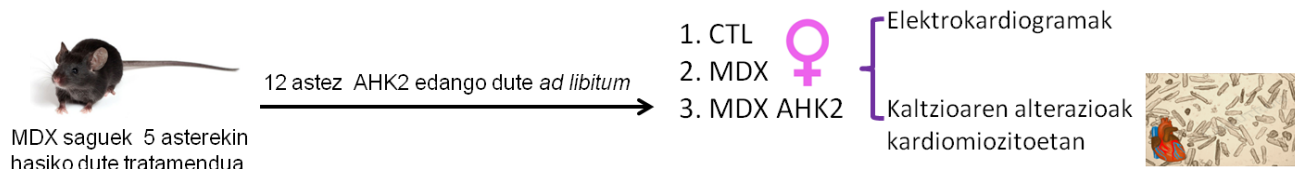
Ikerketa lan honetan AHK2 molekular DMD gaixoen bihotzetan kaltetuta dauden hainbat aldagai hobetzen dituen aztertu da. Horretarako, 12 asteko tratamenduak egin dira hilabete bateko mdx saguetan, Duchenne gihar-distrofia ikertzeko gehien erabiltzen den animalia-ereduan alegia. Bi izan dira helburu nagusiak:

- 1) *In vivo* eginiko elektrokardiogramen bidez bihotzaren funtzionamendua aztertu da.
- 2) *In vitro*, mikroskopia konfokala eta estimulazio elektrikoa erabiliz, saguen bihotzeko zelulak, kardiomiotoak, isolatu eta kaltzioarekin lotutako fisiologia ikertu da.

3. Ikerketaren muina

Bihotzaren funtzioa ikertzeko lau hilabeteko mdx sagu emeak, distrofina genean mutazioa dutenak, eta kontrolak (ctl) erabili dira hiru taldeetan banatuta. AHK2-a edarian jarri zaie, 30mg/kg-eguneko dosian.

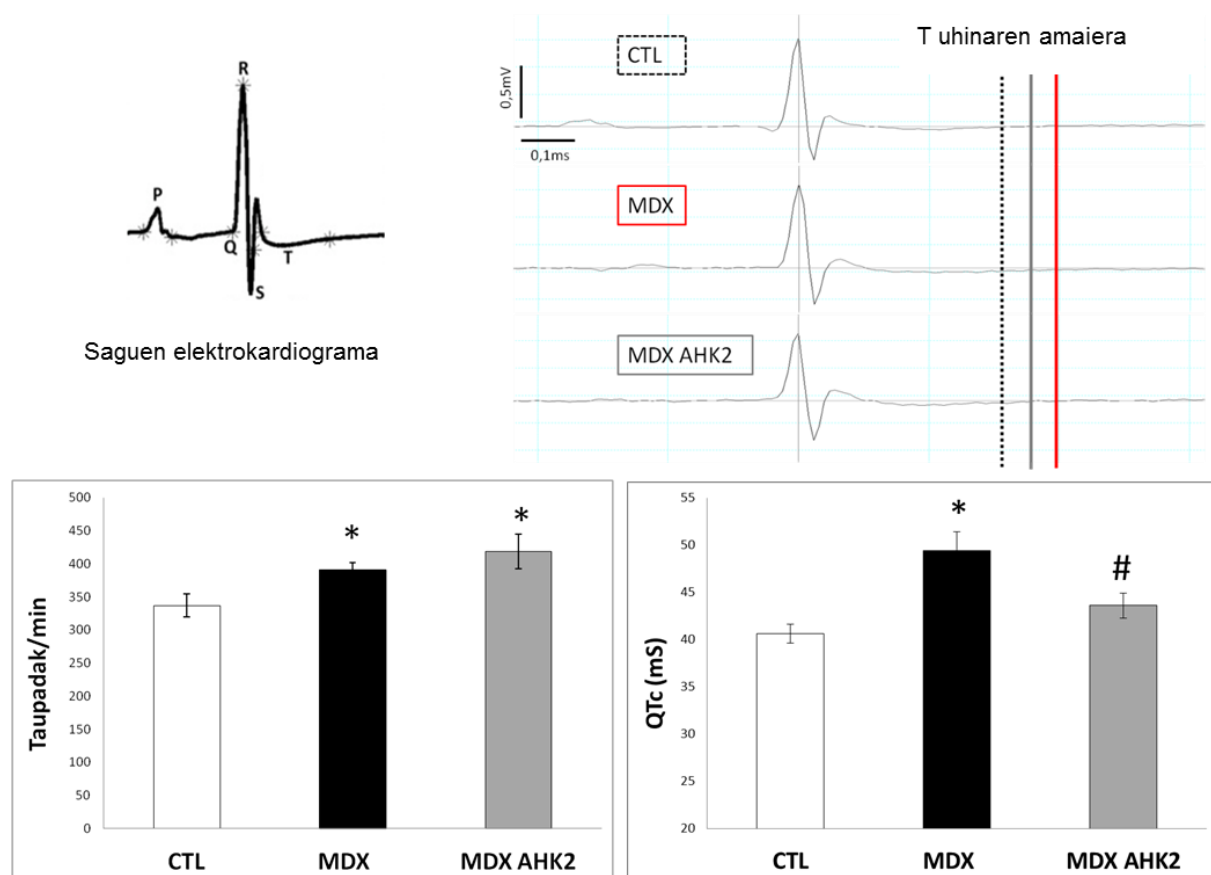
2.irudia. Ikerketaren diseinua.



3.1. Elektrokardiogramak

Bihotzaren funtzioa *in vivo* ikertzeko elektrokardiogramak (EKG) egin dira. Horretarako, saguak %1.5 isoflurano gasarekin anestesiatu ondoren, buruz behera jarri dira sentsoare metalikoan 37°C-tara berotuta dagoen animalia txikien fisiologia monitorizatzeko sistemako plataforman (Harvard Apparatus, Holliston, MA, AEB) eta hankak gel eroalearekin estali dira konexio elektriko egokia ziurtatzeko (Navarro et al., 2019). EKG erregistroak LabChart 7.0.-ko fitxategi bitarretara bihurtu eta software hau erabiliz sagu bakoitzeko aurreneko 5 minutuetako emaitzak aztertu dira (ADInstruments, Sydney, Australia).

3.irudia. Elektrokardiogrametako emaitzak.



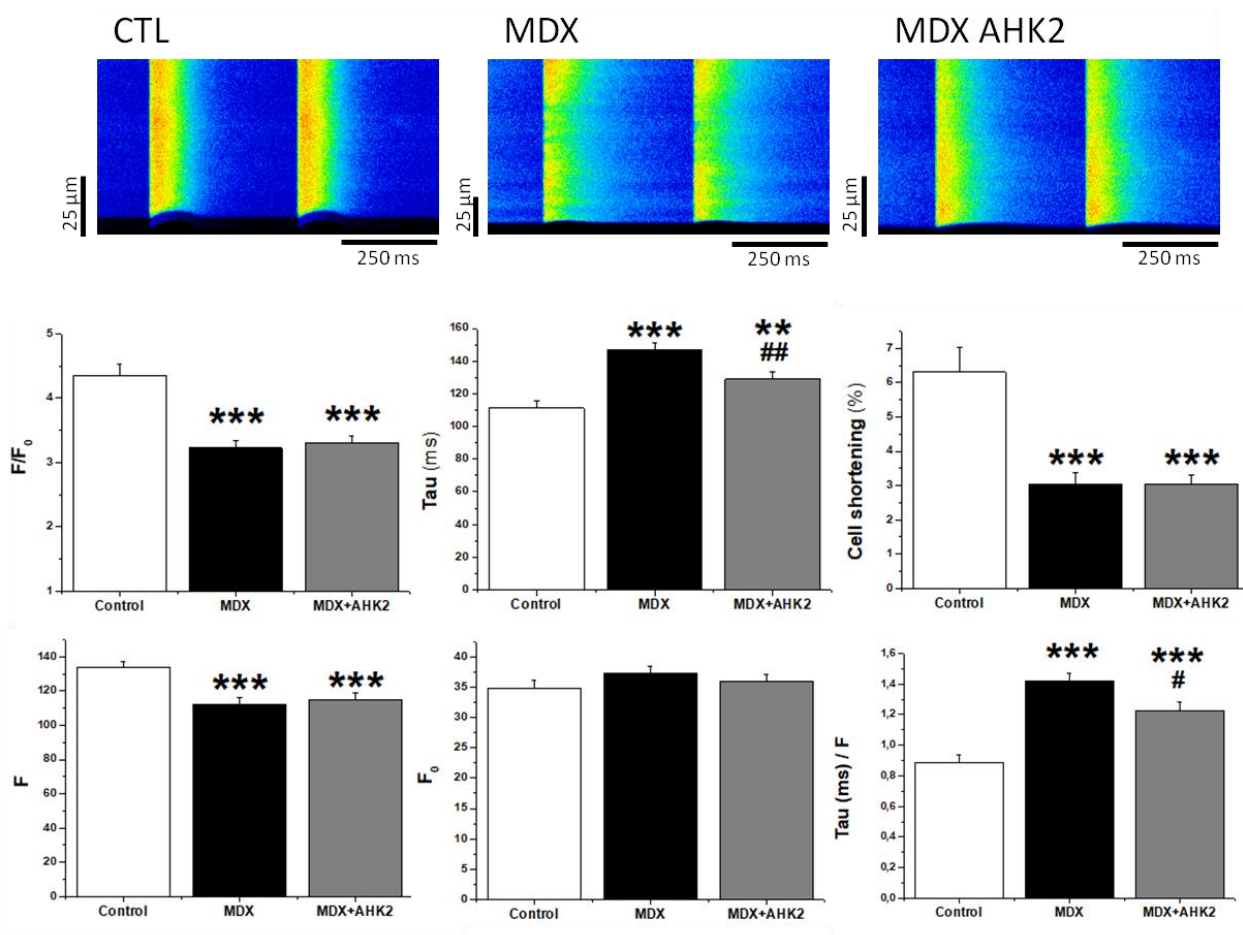
Bihotz-taupaden frekuentzia altuagoa da mdx saguetan eta QTc tarte, taupada baten ondoren bihotzak birpolarizatzeko behar duen denbora, luzeagoa da (3. irudia), aurrez deskribatu zuten bezala (Fauconnier, 2010). Tratamenduak bihotz-taupaden frekuentzia aldatzen ez badu ere, QTc tarte laburtzen du.

3.2. Kaltzioaren alterazioak kardiomiozitoetan

Saguak pentobarbitala (100mg/kg i.p.) injektatuta anestesiatu dira eta jarraian heparina xiringatu zaie (4 UI/g i.p.). Bihotza atera eta, berehala, aorta kanulatu da; ondoren, Langendorff bidez kolagenasa II-arekin (Worthington, Lakewood, NJ, AEB) bentrikulua perfunditu eta kardiomiozitoak isolatu dira Shioyak argitaratutako protokoloa jarraituz (Shioya, 2007). Kaltzioaren alterazioak aztertzeko kardiomiozitoak mintza iragazten duen zunda fluoreszentearekin, Fluo-3AM (5mmol/L), kargatu dira (Navarro et al., 2019). Mikroskopia konfokalean (Meta Zeiss LSM 710, 40x) eskuratu dira irudiak eta IDL softwarea erabili da kuantifikazioarako (Research System Inc., Boulder, CO, AEB).

Batetik, kaltzioaren trantsitorio zitosolikoak aztertu dira sistolean, kardiomiozitoak bi elektrodoekin 2 Hz-ra estimulatuta. Estimulazio bidez uzkurdua eragiten da (cell shortening), eta, honela, erretikulu sarkoplasmatikotik kaltzioa atera eta sartzen duten kanalen egoera, RyR eta SERCA hurrenez hurren, zein den jakin daiteke. Fluoreszentziaren balio maximoa (F) fluoreszentzia basalarekin (F₀) normalizatu da ratioa lortzeko (F/F₀), eta erorketaren denbora (Tau) kaltzioaren jaitsieraren malda da.

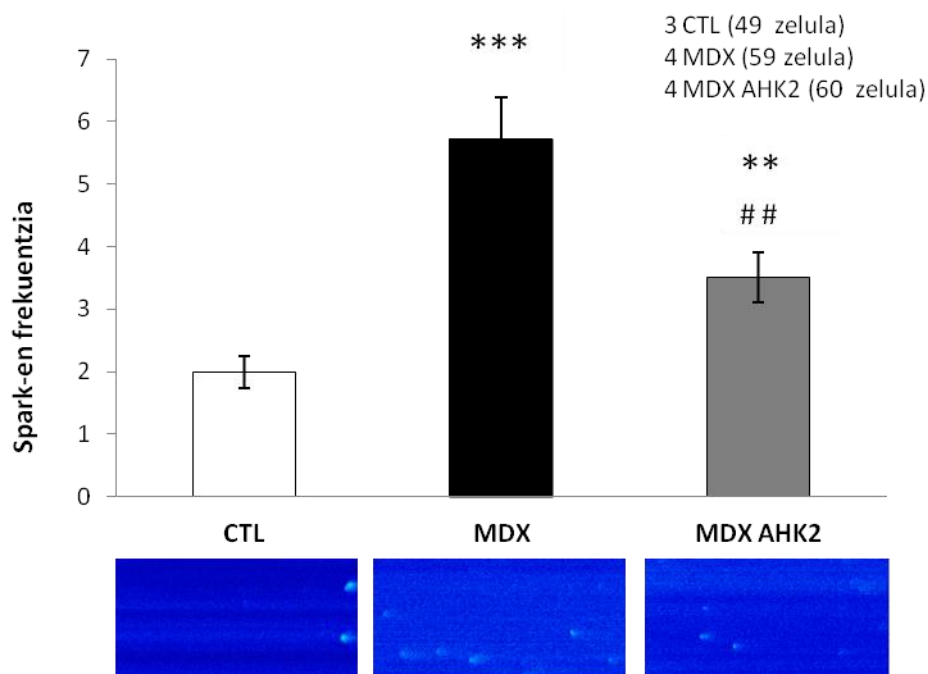
4. irudia. Kaltzioaren mugimendu zitosolikoak sistolean, hots, kardiomiozitoak estimulazio elektrikoan.



Mdx saguen kardiomiozitoek kaltzio gutxiago askatzen dute erretikulutik (F/F₀), eta AHK2 molekulak ez du eraginik ioi honen liberazioan estimulu elektriko baten ondoren (4. irudia). Dena den, tratamenduak sagu gaixoen zelulek handituta duten Tau kurba txikiagotzen du, hau da, SERCA bidezko kaltzioaren birjasotzean eragin zuzena du AHK2-ak.

Bestetik, spark edo kaltzio-irteera espontaneoak grabatu dira. Diastolean ateratzen diren kaltzio-txinparta hauen erantzuleak gaizki itxitako RyR kanalak dira, eta hau da, hain justu, AHK molekularen jomuga.

5. irudia. Kaltzio spark-en frekuentzia diastolean, hots, kardiomiozitoak estimatu gabe.



Espero bezala, mdx saguen kardiomiozitoek kaltzio-txinparta (spark) gehiago dituzte (5. irudia), RyR kanala ez baitago ondo itxita fosforilazioak eta nitrosilazioak direla eta. Gainera, AHK2-ak eragin zuzena duela ikusi da RyR kanala ixten, izan ere tratatutako zelulek spark gutxiago dituzte, %59,4ko berreskuratzearekin (Gillis eta Carlson, 2008).

Ematzen estatistika-analisiak Origin softwarea erabiliz egin dira, 2 faktoreko ANOVA eta analisi unibariatuarekin; honela, $p < 0,05$ esangura-maila ezarri da, * vs CTL, # vs MDX.

4. Ondorioak

Ikerketa honetan, AHK2-aren mekanismoa kalstabinari batu eta rianodina-hartzaileak modulatzeko dela baieztatu da, spark edo kaltzio irteera espontaneoak kontrolatzen baititu. Farmako bezala funtzionatu dezaken molekula honen itua baieztatzearekin batera, bihotzaren funtzioa hobetzen duela dirudi, gaixoetan luzeagoa den bihotzaren birpolarizazio denbora jaisten du eta.

Honela, AHK2-ak Duchenne gihar-distrofian potentzial terapeutikoa izan dezake tratamendu konbinatorio gisa erabilia. Esan bezala, molekula honek ez du distrofinaren gabezia ordezkatuko, baina gabezia honek sortutako hainbat kalte hobetu ditzakeela uste da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

AHK2 molekulak bere ituan duen eragin zuzena aztertu ondoren, gaur egun gehien erabiltzen diren farmakoekin terapia konbinatu bat egitea litzateke hurrengo urratsa. Terapia hau mdx saguetan probatzeaz gain, Duchenne gihar-distrofia ikertzeko erabili ohi diren beste animalia-ereduekin lan egitea ere ezinbestekoa da entsegu-klinikoekin hasteko.

6. Erreferentziak

- Bellinger, A. M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., ... Marks, A. R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nature Medicine*, 15(3), 325–330. <https://doi.org/10.1038/nm.1916>
- Capogrosso, R. F., Mantuano, P., Uaesoontrachoon, K., Cozzoli, A., Giustino, A., Dow, T., ... De Luca, A. (2018). Ryanodine channel complex stabilizer compound S48168/ARM210 as a disease modifier in dystrophin-deficient mdx mice: Proof-of-concept study and independent validation of efficacy. *FASEB Journal*, 32(2), 1025–1043. <https://doi.org/10.1096/fj.201700182RRR>
- Fauconnier, J., Thireau, J., Reiken, S., Cassan, C., Richard, S., Matecki, S., ... Lacampagne, A. (2010). Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(4), 1559–1564. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908540107>
- Gillis, J., & Carlson, G. (2008). TREAT-NMD protocol: The recovery score to evaluate therapy efficiency in NMD: a common, quantitative and comparative scoring system., (Id), 1–6.
- Navarro-García, J.A., Delgado C., Fernández-Velasco M., Val-Blasco A., Rodríguez-Sánchez E., Aceves-Ripoll J., ... Ruilope, L. M. and Ruiz-Hurtado G. (2019). Fibroblast growth factor-23 promotes rhythm alterations and contractile dysfunction in adult ventricular cardiomyocytes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1–12. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy392>
- Nikolaienko, R., Bovo, E. and Zima, A. V. (2018). Redox Dependent Modifications of Ryanodine Receptor: Basic Mechanisms and Implications in Heart Diseases. *Frontiers in Physiology*, 9(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01775>
- Shioya, T. (2007). A Simple Technique for Isolating Healthy Heart Cells from Mouse Models. *The Journal of Physiological Sciences*, 57(6), 327–335. <https://doi.org/10.2170/physiolsci.RP010107>
- Vallejo-Illarramendi, A., Toral-Ojeda, I., Aldanondo, G. and López de Munain, A. (2014). Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 16(October), e16. <https://doi.org/10.1017/erm.2014.17>
- World Duchenne Organization (2019). [<https://worldduchenne.org/>]

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Euskal Herriko Unibertsitateko Euskara Errektoreordetzako Ikertzaileak Prestatzeko Doktoretza-aurreko bekari (2015eko deialdia) eta unibertsitate bereko mugikortasun laguntzari esker burutu da Madrileko Hospital 12 de Octubre-ko Gema Ruiz Hurtadoren laborategian.

Hantura periferikoa depresio eta antsietate sintomekin batera bularreko minbizia gaingaitutako emakumeetan

Labaka, Ainitze¹; Arregi, Amaia¹; Vegas, Oscar¹; Garmendia, Larraitx¹;
Camba, Joana² eta Perez-Tejada, Joana^{1,2}

¹Oinarritzko prozesu psikologikoak eta haien garapena saila. Psikologia Fakultatea
UPV/EHU.

²Onkologikoa Fundazioa.
ainitze.labaca@ehu.eus

Laburpena

Bularreko minbizia gaingaitutako emakumeen antsietate eta depresio prebalentzia biztanleria orokorrarena baino handiagoa da. Nahasmendu horietan eta minbiziaren fisiopatologian zenbait faktore komun aurki daitezke; hantura zitokinak eta kortisola. Ikerketa honen helburua bularreko minbizia gaingaitutako emakumeetan depresio eta antsietate sintomen eta hantura aldagaien arteko erlazioa aztertzea da. Kortisol maila handiagoak aurkitu ditugu antsietate eta depresio sintomak dituzten emakumeetan. Gainera, TNF- α maila altuak aurkitu ditugu depresioa duten emakumeetan.

Hitz gakoak: bularreko minbizia, kortisola, depresioa, antsietatea, hantura zitokinak.

Abstract

The diagnosis of anxiety and depression is higher in breast cancer survivors than in general population. Proinflammatory cytokines and cortisol are involved in both cancer physiopathology and affective disorders physiopathology. Thus, we aim to investigate the relationship between depressive and anxiety symptoms and inflammatory biomarkers in breast cancer survivors. The results showed that women with anxiety disorders had increased cortisol level. In addition, elevated TNF- α levels were found in subjects with depression.

Keywords: breast cancer, cortisol, depression, anxiety, proinflammatory cytokine

1. Sarrera eta motibazioa

Minbiziari aurre egitea ez da nolanahiko erronka, eta osasun aurrerakuntzei esker biziraupen ratioek gora egin duten honetan, osasun esku-hartzeek bizirik irtetetik haratago jarri dute ikusmira. Garrantzitsua da minbizia gaingaitu duten pertsonen bizi kalitatea bermatu eta minbiziaren berragertzea prebenitzea.

Emakumezkoetan gehien diagnostikatzen den minbizia bularrekoa da eta erronka handia suposatzen du. Osasun egoeran ez ezik, maila profesionalan, gorputz-irudian eta harreman sozial eta familiarrekoetan eragin handia du (Evans et al., 2011; Kim et al., 2013; Phillips-Salimi eta Andrykowski, 2013; Romito et al., 2012). Horrelako egoera mehatxagarri baten aurrean egokitze ezintasunari eta ondoriozko aktibazio psikofisiologiko desegoki kronikoari distresa deritzo. Distresa estres negatiboa da beraz, eta oso ohikoa da bizi zikloko trantsizio faseetan. “National Comprehensive Cancer Network”-en arabera, minbiziaren diagnostiko eta tratamendua hastearen zein amaitzearen kalte-ondorio zuzena da distresa (Holland et al., 2018), eta morbi-mortalitatean eragiten du, baita bizi kalitatean ere (Adler eta Page, 2008). Halaber, depresioa bezalako nahasmenduen agerpena errazten du (Stanton eta Bower, 2015; Stanton, et al., 2006).

Zentzu horretan, antsietate eta depresio sintomen prebalentzia biztanleria orokorrean baino askoz handiago da bularreko minbizia gaingaitutako emakumeetan (Burgess et al., 2005; Stanton, 2006). Nahasmendu horiek bizi kalitate eta osasun egoera eskasagoa izatea eragiten dute. Hori gutxi balitz, depresioak bizi-itxaropena murriztu eta kantzerraren progresioa eta berragertzea erraztu ditzake (Smith, 2015).

Hortaz, minbiziak eta nahaste emozionalek lotura estua dute. Gainera, markatzaile biologiko komunak dituztela ikusi da. Batetik, minbiziari aurre egiteko, organismoak immunitate-sistema aktibatu eta hanturazko zitokinak jariatzen ditu. Depresioa eta antsietatea duten pazienteetan ere hantura zitokina maila areagotua aurkitu ohi da (Furtado eta Katzman, 2015a). Bestetik, minbizia kasuetan nahiz nahasmendu emozionaletan, kortisolak, estresaren hormonak alegia, gora egiten duela ikusi da (Furtado eta Katzman, 2015b; Smith, 2015).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Psikoneuroimmunologia garunaren, jokabidearen eta immunitate sistemaren arteko harremana aztertzen duen esparrua da, eta faktore psikosozialek, jokabide-mekanismo eta mekanismo biologikoekin nola interakzionatzen duten aztertzen du osasun-gaixotasun orekaren testuinguruan (Zachariae, 2009). Izan ere, garunak immunitate prozesua erregulatzen du, eta atzera berriz, immunitate sistemak funtzio neuronal eta endokrinoak erregulatu ditzake, jokabideari ere eraginez. Testuinguru horretan, hantura zitokina deritzen molekula proteiko mezulariek berebiziko garrantzia dute, sistema ezberdinen arteko bitartekari baitira (Raison et al., 2006).

Diziplina hori oinarritzat hartuz, bularreko minbizia gaingitutako emakumeek duten depresio prebalentzia handiagoa ulertzeko gakoa jokabidearen, hantura zitokinen eta kortisolaren elkarrekintzan egon daiteke, literatura zientifikoan zera ageri baita:

- Depresioaren hantura hipotesiaren arabera, estresak 6 Interleukina (IL-6) eta Tumorearen Nekrosi Faktorea (TNF- α) jariatzea eragin dezake. Hauek berriz, kortisol maila areagotzea. Egoera honek luze iraunez gero, estres erantzuna kontrolatzen duen hipotalamo-pituitaria-adrenal (HPA) ardatza desdoitu egiten da eta ezin ditu kortisol mailak bere onera ekarri. Gainera, periferian askatutako zitokinek garuneko hesi hematoentzefalikoa zeharka dezakete, garunean hartzaile espezifikoak lotu, amplifikatu eta funtzio neuronala erasan dezakete, jokabideari eta aldarte egoerari eraginez (Raison et al., 2006).
- Bularreko minbizia gaingitutako emakumetan kortisol, IL-6 eta TNF- α maila handiak aurkitu dira (Kesler et al., 2013; Lengacher et al., 2019).
- Hantura-prozesuak barne-hartzen dituzten gaitzetan, depresio-nahasmenduen intzidentzia handiagoa dela ikusi da (Stanton eta Bower, 2015), bularreko minbizia tarteko (Burgess et al., 2005).

Bularreko minbizia gaingitu duten emakumeen osasun egoeraren inguruko ikerketak egin badira ere, lan gutxi aztertu dituzte aldagai fisiologiko eta psikologikoak batera, eta are gutxiago haien arteko lotura. Hori dela eta, ikerketa honen helburua bularreko minbizia gaingitutako emakumeen depresio eta antsietate maila aztertzea, eta berauek hantura zitokina periferikoekin eta kortisol mailarekin duten erlazioa ikertzea da. Horretarako, honako helburu zehatz hauek landuko dira:

1. Bularreko minbizia gaingitutako emakumeen depresio eta antsietate maila behatzea.
2. Plasmako TNF- α , IL-6 eta kortisol mailak neurtzea.
3. Aldagai fisiologikoak depresio eta antsietate sintomen arabera konparatzea.

3. Ikerketaren muina

Ikerketa aurrera eramateko, honako esperimentu hau gauzatu zen:

Parte hartzaileak: Onkologikoa Fundazioko onkologo eta erizainen laguntzari esker, bularreko minbizia gaingitutako 80 emakume bolondres aurkeztu ziren ikerketan parte hartzeko. Inklusio irizpideak honakoak izan ziren: (1) adina 30-70 urte, (2) minbiziaren tratamendu-fase guztiak bete izana (kirurgia, kimioterapia, eta erradioterapia), eta (3) tratamendua amaitu zenetik gehienez bost urte eta gutxienez urtebete igaro izana. Esklusio irizpideak: (a) metastasia izatea eta (b) hantura eragin dezakeen egoera klinikoa pairatzea. Inklusio kriterioa betetzen zuten emakumeei odol analisi bat ateratzeko eta elkarriketa psikologiko bat egiteko deitu genien. Edozein datu bildu aurretik, baimen informatuak jaso ziren. UPV/EHUko Etika Batzordearen onespina jaso zuen proiektuak. Jarraitutako prozedurak ere legedia nazionala bete zuen.

Aldagai psikologiko eta fisiologikoak: Antsietate eta depresio maila “Hospital Anxiety and Depression Scale” (HADS) (Zigmond eta Snaith, 1983) intrumentuaren bidez ebaluatu zen. HADS eskala ospitaleratuta egon diren pertsonen distres psikologikoa neurtzeko erabiltzen da. Test hau likert motako zazpi galderaz osatutako bi azpieskalatan banatzen da: antsietate azpieskala eta depresio azpieskala. Cronbach-en alfa koefizientea 0.840ekoa eta 0.780ekoa izan zen azpieskala bakoitzarentzat, hurrenez hurren. Odol lagina hodietan jaso zuten erizainek (Vacutainer SST II Advance), seruma bereizteko hodiak zentrifugatu eta -80°Cra biltegitatu zen. IL-6 eta TNF- α kontzentrazioak Elisa kit-a (R&D Systems, EEBB) eta ELx 800 plater-irakurgailua (BioTek, EEBB)

erabilita neurtu ziren. IL-6 eta TNF- α immunosaiakuntzen sentikortasuna 0.039 eta 0.106 pg/m-koa izan zen hurrenez hurren. Analisi estatistiko guztiak SPSS 24.0 erabiliz burutu ziren.

Emaitzak

Parte-hartzaileen ezaugarri demografikoak eta estatistiko deskribatzaileak I. taulan ageri dira.

I. taula. Laginaren ezaugarriak.



Aldagaiak (n = 80)	Batezbesteko $\pm$ SD
Adina	56.3 $\pm$ 8.57
Tratamendua amaitu ondorengo denbora (hilabetetan)	22.4 $\pm$ 13.3
Ezkontza-estatusa	
Ezkontgabea/ezkontdua/dibortziatua/alarguna (%)	6.25/77.5/12.5/3.75
Heziketa maila	
Bigarren hezkuntza/hirugarren hezkuntza edo gehiago (%)	70/30
Depresio sintomak	
Normala/klinikoki esanguratsua (%)	67.5/32.5
Antsietate sintomak	
Normala/klinikoki esanguratsua (%)	68.7/31.3

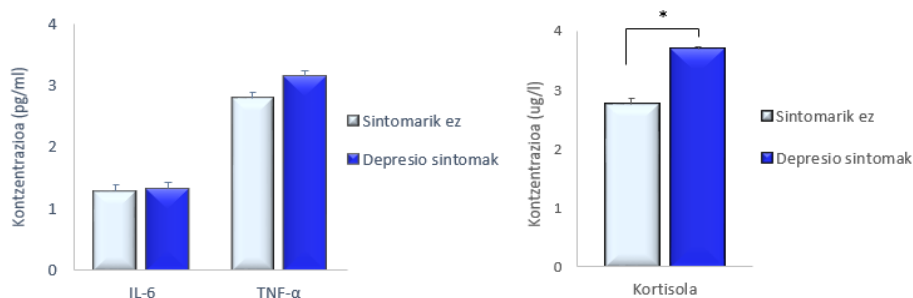
Aldagai garrantzitsuenen arteko korrelazioak II. taulan zehaztu dira.

II. taula. HADS azpieskalen eta aldagai biologikoen arteko korrelazioak. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

	TNF- α	Kortisola	Antsietatea	Depresioa
IL-6	,446**	-0,140	-,235*	-0,006
TNF- α		0,035	-0,155	0,092
Kortisola			,215*	,226*
Antsietatea				,690**

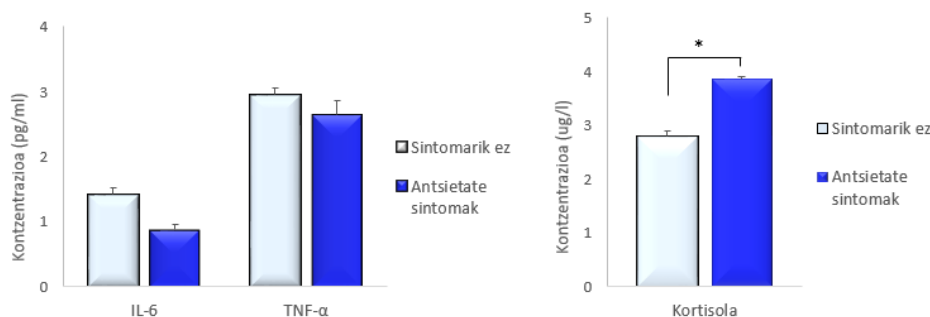
HADS eskalan depresioa eta depresio eza agertutako emakumeen neurketa biologikoak alderatzean, depresio sintomak zituzten emakumeek kortisol maila altuagoak zituztela aurkitu genuen ($F(1,78) = 5.512$; $p = 0.02$). Era berean, depresio sintoma esanguratsuak zituzten emakumeetan TNF- α maila handiagoak izateko joera nabarmendu zen ($F(1,78) = 3.304$; $p = 0.07$). Ez zen bi taldeen arteko ezberdintasun esanguratsurik aurkitu IL-6 maileri dagokienean ($F(1,78) = .249$; $p = 0.62$) (1. irudia).

- 1. irudia.** Batz besteko IL-6, TNF- α eta kortisol kontzentrazioa ($\pm$ batz bestekoaren errore estandarra, BEE) sintoma depresiboaren arabera. * $p < 0.05$



Antsietateari dagokionean, antsietate maila klinikoak zituzten emakumeek kortisol areagotua erakutsi zuten maila normala zuten emakumeekin erkatuz gero ($F(1,78) = 5.546$; $p = 0.021$). $TNF-\alpha$ ($F(1,78) = 1.187$; $p = 0.28$) eta IL-6 kontzentrazioen harira, ez zen antsietatearen arabera ezberdintasun esanguratsurik aurkitu. Hala ere, azken zitokinaren maila baxuagoak izateko joera erakutsi zuen antsietate sintomadun taldeak ($F(1,78) = 3.250$; $p = 0.075$), esperotako norantzaren aurka (2.irudia).

- irudia.** IL-6, $TNF-\alpha$ eta kortisolaren batz besteko kontzentrazioa ($\pm$ BEE) antsietate sintomen arabera. * $p < 0.05$.



4. Ondorioak

Korrelazioen emaitzekin hasiz, azpimarratzekoa da, depresioaren hantura hipotesia indartuz (Raison et al., 2006), $TNF-\alpha$ eta kortisol mailek harreman positiboa erakutsi dutela depresioaren larritasunarekin. Aurreikusi zitekeen moduan, depresioa eta antsietatearen arteko harreman positiboa ere agertu da korrelazioa egitean. Biak ere nahasmendu afektiboak dira, eta bien arteko muga finkatzea zaila izaten da askotan. Gainera, emakumezkoetan bereziki, sintomatologia depresiboa eta antsiosoa batera ager daitezke (Keers eta Aitchison, 2010). Bi zitokinen arteko korrelazioa ere gauza arrunta da, hantura zitokina ezberdinek jariatze patroia berberak jarraitzen baitituzte. IL-6 eta antsietatearen arteko korrelazioa ez zen ordea esperotakoa, antsietatea estresari –eta hipotesiaren arabera hanturari- lotutako nahasmendua baita.

Grafikoei helduz, bularreko minbizia gaiditutako emakumeen artean, depresioa eta antsietatea dutenek kortisol maila handiagoak dituzte, estres erantzuna erregulatzeaz arduratzen den HPA ardatzaren funtzionamendu egokia eten den seinale, eta emakumeak bizitako egoera gaiditu eta egunerokotasunera egokitze izan dezaketen zailtasunaren seinale. Izan ere, estres iturri izan daitezkeen kezka psikosozial garrantzitsuak hauteman dira populazio honetan: ugalkortasunaren, harreman sexualen, lanaren eta bikote eta familiarteko harremanen inguruan batik bat (Crowley et al., 2016). Depresio sintoma klinikoak zituzten emakumeetan aurkitutako $TNF-\alpha$ maila handiak bat datoz aurretiko beste ikerlan batzuekin (Kesler et al., 2013; Lengacher et al., 2019), baita depresioaren hantura hipotesiarekin ere (Raison et al., 2006). Aipatzekoa da, hantura zitokina eta kortisol maila handiak hainbat osasun arazo agertzeko aukera handiagoa izatearekin lotu direla; gaixotasun kardiobaskularrak, osteoporosia, eta artritis esaterako (Currier eta Nemeroff, 2014). Baliteke beraz, kortisola eta $TNF-\alpha$ zitokina subjektu zaurgarriak identifikatu eta jarraipen eta prebentzio esku-hartzeak egiteko irizpide baliagarriak izatea. Hori gutxi balitz, hantura kronikoa eta HPA ardatzaren desregulazioa tumore zelulen proliferazioarekin, minbizia berragertzearekin eta hilkortasun tasa handiagoarekin lotu da (Currier eta Nemeroff, 2014). Edonola ere, aurrera begira, interesgarria litzake hantura zitokinak ez ezik, zitokina antiinflamatorioak ere neurtzea. Izan ere, azken ikerketen arabera, zitokina pro- eta anti-inflamatorioen arteko orekak norbanakoaren hantura egoeraren informazio zehatzagoa ematen digu, bien arteko desoreka baten edo bestearen maila altuak baino arriskutsuagoa delarik (Capuron eta Miller, 2011; Labaka et al., 2017). Antsietatea zuten parte hartzaileetan aurkitutako IL-6 maila baxuen kasuan ere, baliteke zitokina anti-inflamatorioak ere kontzentrazio txikian izatea, eta honela IL-6aren eragina orekatua hala negatiboa izatea.

Minbizia gainditutako pertsonen egoera emozionalaren azpian datzaten faktore psikobiologikoen ezagutza sakonagoak zainketa integratu eta pertsonalagoak eskaintzea ahalbideetuko liguke, bizi kalitatea hobetu eta osasun arazoak ekidite aldera.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa lerro berean jaso ditugun beste datu batzuen arabera, bularreko minbizia gainditutako emakumeetan, TNF- α maila altuak eta babes sozial eskasa aldi berean ematen direnean, distres psikologikoa handiagoa da (argitaratzeke). Emaizta horiek, lan honetan aurkeztutakoekin batera, zera adierazten dute: TNF- α eta kortisol maila altuak nahasmendu afektiboak izateko arrisku handiagoarekin lotzen badira ere, babes sozialak eta erronkari aurre egiteko baliabideak izateak antsietate edo depresio sintomen agerpena modulatu dezakeela.

Hori dela eta, Elkar Laguntza izeneko proiektua abian jarri dugu Onkologikoa Fundazioan. Bertan, minbizia diagnostikatu berri zaien pazienteei antzeko ezaugarriak dituen kide bolondres bat esleitzen zaio, minbizia gainditu zuena eta erabat osatuta dagoena, jarraipen hitzorduen bidez babes soziala eskaintzeko, harik eta diagnostikatu diren paziente berriek prozesu osoa amaitzen duten arte. Urteetako jarraipena eginda aztertu ahal izango dugu proiektu honek pazienteen osasun emaitza eta aldagai biologiko eta psikologikoetan onurarik dakarren, baita minbizia gainditu osteko bizi kalitatea hobetzen lagun dezakeen ere.

6. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzaren talde kontsolidatuentzako IT-757-13 laguntzari esker gauzatu da.

7. Erreferentziak

- Adler, N., & Page, A. (2008). *Cancer care for the whole patient: meeting psychosocial health needs*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Burgess, C., Cornelius, V., Love, S., Graham, J., Richards, M., & Ramirez, A. (2005). Depression and anxiety in women with early breast cancer: five year observational cohort study. *British Medical Journal*, 330(7493), 702. <http://doi.org/10.1136/bmj.38343.670868.D3>
- Capuron, L., & Miller, A. H. (2011). Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 130(2), 226–38. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.014>
- Crowley, S. A., Foley, S. M., Wittmann, D., Jagielski, C. H., Dunn, R. L., Clark, P. M., ... Janz, N. K. (2016). Sexual Health Concerns Among Cancer Survivors: Testing a Novel Information-Need Measure Among Breast and Prostate Cancer Patients. *Journal of Cancer Education*, 31(3), 588–594. <http://doi.org/10.1007/s13187-015-0865-5>
- Currier, M. B., & Nemeroff, C. B. (2014). Depression as a risk factor for cancer: from pathophysiological advances to treatment implications. *Annual Review of Medicine*, 65, 203–21. <http://doi.org/10.1146/annurev-med-061212-171507>
- Evans, J., Atherton, I., Dibben, C., & Hubbard, G. (2011). The health and well-being of people with a previous diagnosis of cancer : a record-linkage study in Scotland. *Journal of Public Health and Epidemiology*, 3(10), 429–732.
- Furtado, M., & Katzman, M. a. (2015a). Examining the role of neuroinflammation in major depression. *Psychiatry Research*, 229(1–2), 27–36. <http://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.06.009>
- Furtado, M., & Katzman, M. a. (2015b). Neuroinflammatory pathways in anxiety, posttraumatic stress, and obsessive compulsive disorders. *Psychiatry Research*, 229(1–2), 37–48. <http://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.05.036>
- Holland, J., Jacobsen, P., Andersen, B., Braun, I., Breitbart, W., Brewer, B., ... Handzo, G. (2018). NCCN clinical practice guidelines in oncology: distress management, v2.2018.
- Keers, R., & Aitchison, K. J. (2010). Gender differences in antidepressant drug response. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, 22(5), 485–500. <http://doi.org/10.3109/09540261.2010.496448>
- Kesler, S., Janelins, M., Koovakkattu, D., Palesh, O., Mustian, K., Morrow, G., & Dhabhar, F. S.

- (2013). Reduced hippocampal volume and verbal memory performance associated with interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in chemotherapy-treated breast cancer survivors. *Brain, Behavior, and Immunity*, 30, S109–S116. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.05.017>
- Kim, K. H., Cho, Y. Y., Shin, D. W., Lee, J. H., Ko, Y.-J., & Park, S. M. (2013). Comparison of physical and mental health status between cancer survivors and the general population: a Korean population-based survey (KNHANES II-IV). *Supportive Care in Cancer*, 21(12), 3471–3481. <http://doi.org/10.1007/s00520-013-1939-8>
- Labaka, A., Gómez-Lázaro, E., Vegas, O., Pérez-Tejada, J., Arregi, A., & Garmendia, L. (2017). Reduced hippocampal IL-10 expression, altered monoaminergic activity and anxiety and depressive-like behavior in female mice subjected to chronic social instability stress. *Behavioural Brain Research*, 335(August), 8–18. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.002>
- Lengacher, C. A., Reich, R. R., Paterson, C. L., Shelton, M., Shivers, S., Ramesar, S., ... Park, J. Y. (2019). A Large Randomized Trial: Effects of Mindfulness-Based Stress Reduction (MBSR) for Breast Cancer (BC) Survivors on Salivary Cortisol and IL-6. *Biological Research For Nursing*, 21(1), 39–49. <http://doi.org/10.1177/1099800418789777>
- Phillips-Salimi, C. R., & Andrykowski, M. A. (2013). Physical and mental health status of female adolescent/young adult survivors of breast and gynecological cancer: a national, population-based, case-control study. *Supportive Care in Cancer*, 21(6), 1597–1604. <http://doi.org/10.1007/s00520-012-1701-7>
- Raison, C. L., Capuron, L., & Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology*, 27(1), 24–31. <http://doi.org/10.1016/j.it.2005.11.006>
- Rodriguez, M. N., & Ruiz, M. A. (2008). Atenuación de la asimetría y de la curtosis de las puntuaciones observadas mediante transformaciones de variables: Incidencia sobre la estructura factorial. *Psicología*, 29, 205–227.
- Romito, F., Cormio, C., Giotta, F., Colucci, G., & Mattioli, V. (2012). Quality of life, fatigue and depression in Italian long-term breast cancer survivors. *Supportive Care in Cancer*, 20(11), 2941–2948. <http://doi.org/10.1007/s00520-012-1424-9>
- Smith, H. R. (2015). Depression in cancer patients: Pathogenesis, implications and treatment (Review). *Oncology Letters*, 9(4), 1509–1514. <http://doi.org/10.3892/ol.2015.2944>
- Stanton, A. L. (2006). Psychosocial Concerns and Interventions for Cancer Survivors. *J Clin Oncol*, 24, 5132–5137. <http://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.8775>
- Stanton, A. L., & Bower, J. E. (2015). Psychological adjustment in breast cancer survivors. In P. A. Ganz (Ed.), *Improving outcomes for breast cancer survivors: Perspectives on research challenges and opportunities* (Springer, pp. 231–242). Cham. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-16366-6>
- Stanton, A. L., & Bower, J. E. (2015). Psychological adjustment in breast cancer survivors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 862, 231–242. http://doi.org/10.1007/978-3-319-16366-6_15
- Stanton, A. L., Bower, J. E., & Low, C. A. (2006). Post-traumatic growth after cancer. In L. G. Calhoun & R. G. Tedeschi (Eds.), *Handbook of post-traumatic growth: Research and practice* (pp. 138–175). Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum Associates.
- Zigmond, A. S., & Snaith, R. P. (1983). The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 67(6), 361–370.

CRISPR/Cas9 metodologiaren optimizazioa geneen inaktibaziorako

García-Santisteban, Iraia; Alcorta-Sevillano, Natividad eta Zubiaga, Ana María

Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia
Fakultatea, Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)
iraia.garcia@ehu.eus

Laburpena

Gene baten funtzioa ezagutzeko, ikertzaileek lehenbizi bere adierazpena isildu ohi dute, ondoren isilarazpenaren ondorio funtzionalak zeintzuk diren aztertuz. Geneen adierazpena isiltzeko moduen artean, CRISPR/Cas9n oinarritutako teknologia berritzaileak abantaila ugari aurkeztu ditu, gene jakin bat adierazten ez duten zelulak (zelula *knockout* edo KO direlakoak) modu azkar eta eraginkor batean sortzea baimentzen baitu. Lan honetan, *E2F2* genea eredu moduan hartuta, CRISPR/Cas9 bidez zelula KOak sortzeko protokoloa laborategian martxan jartzea lortu dugu.

Hitz gakoak: CRISPR/Cas9, *knockout*, *E2F2*, geneen inaktibazioa.

Abstract

To pinpoint the function of a gene, researchers first silence its expression, and then study the functional consequences of the silencing. Among the ways to silence gene expression, techniques based on CRISPR/Cas9 technology show multiple advantages, as they allow the generation of cell lines that do not express a certain gene (namely knockout or KO) in a fast and effective manner. In this work, using E2F2 gene as a proof-of-concept, we have successfully optimized a protocol to generate KO cell lines using CRISPR/Cas9 in a research laboratory.

Keywords: CRISPR/Cas9, knockout, E2F2, gene inactivation.

1. Sarrera eta motibazioa

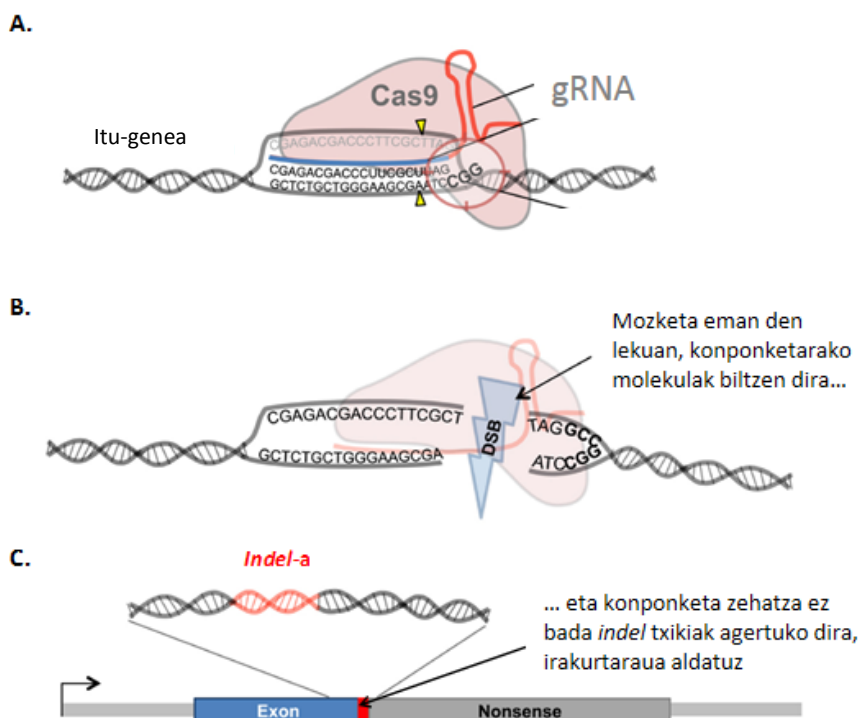
Osasun zientzien arloan, giza genomaren sekuentziazioa izan da egin den ekarpen garrantzitsuenetarikoa, 3.000 milioi base-pareko DNA sekuentziaren segida ezagutzea lortu izan zelarik (Liu et al., 2002; McPherson et al., 2001). Ia 20 urte geroago, zientzialariak oraindik ari dira milaka generen funtzioa zein den aurkitu nahian. Normalean, gene baten funtzioa ezagutzeko, lehenbizi bere adierazpena murriztu edo ezabatu egiten da, eta gero horren ondorio funtzionalak zeintzuk diren ikertu (Alberts et al., 2002).

Gene baten adierazpena murrizteko *RNAren interferentziaren bidezko isilarazpena (RNAi)* erabil daiteke: RNA molekula batek isilarazi nahi den geneak (itu-geneak) kodetzen duen mRNA molekula degradatzen du, bere adierazpenaren murrizpena sorraraziz (Fire et al., 1998). RNAi teknika oso erabilgarria den arren, zenbait muga aurkeztu ditu: isilarazpena iragankorra da (egun batzuren buruan geneak bere ohiko adierazpen-maila berreskuratzen du), normalean ez da genearen isilarazpen osoa lortzen (RNA interferenteak ez dituelako zelulan dauden mRNA molekula guztiak degradatzen), eta maiz interesekoak ez diren geneak isilarazten dira (RNA interferentea itua antzekoak diren bestelako mRNA molekulak lotu daitekeelako eta euren degradazioa bultzatu) (Sledz eta Williams, 2005).

Muga hauek gainditzeko asmoz, ikertzaileek geneen adierazpena guztiz ezabatzeke teknika berriak garatu dituzte, ezagunena *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Protein-9 nuclease* (CRISPR/Cas9) izenekoa delarik. CRISPR/Cas9 sistemak arkeo eta bakterioek defentsarako duten immunitate-sistema adaptatiboan dauka bere jatorria, Francisco Mojica deskribatu zuen moduan (Mojica et al., 2005). CRISPR/Cas9 sistemak genomak editatzeko duen ahalmen itzela frogatu zuten lehenak Emmanuelle Charpentier eta Jennifer Doudna izan ziren (Jinek et al., 2012). Prozesua bi etapatan banatzen da (1. irudia). Lehenbizi, RNA gidari bat (gRNA), itu-genearen eremu batekiko osagarria dena, Cas9 proteinarekin lotzen da (1A irudia); Cas9 proteinak, guraize batzuen moduan, DNA itua moztuko du gRNA lotu zaion lekuan bertan (1B irudia). Sortutako bi muturrak berriro lotzeko, zelulak berehala jarriko ditu martxan DNA konponketa mekanismo desberdinak. Kasu batzutan konponketa prozesua ez da guztiz zehatza izaten, mozketa lekuan *indel* bezala ezagutzen diren

txertaketa edo delezio txikiak sortzen direlarik. *Indel*ak geneen eskualde kodetzailean agertzekotan, irakurketa araua aldatu eta STOP kodoi goiztiarren agerpena eman dezakete, ondorioz proteinaren ekoizpena etenda geratuko delarik (1C irudia). Ikus daitekenez, teknika hau oso baliagarria da *knockout* (KO) deituriko lerro zelularrak sortzeko, zeinean gene baten adierazpena guztiz desagertarazten den (Doetschman eta Georgieva, 2017).

1. irudia. CRISPR/Cas9 bidezko edizio genikoa. A. RNA gidari (gRNA) molekularak Cas9 proteina gidatutako du itu-genearen toki jakin batera (gRNArekiko osagarria dena, hain zuzen). B. Cas9 proteinak DNA moztuko du leku hartan DBSak edo harizpi bikoitzeko mozketak sortuz (ingeleseko *Double Strand Break*), eta berehala zelulak konponketarako mekanismoak jarriko ditu martxan DNaren bi muturrak berriro elkartzeko. C. Kasu batzuetan konponketa ez da zehatza izango, txertaketa edo delezio txikiak (*indel*-ak) agertuko direlarik; hau eskualde kodetzailean gertatzen denean, genearen irakurtaraua alda daiteke STOP kodoi goiztiarrak sortuz (*nonsense* hitzak zentzurik gabeko proteina esan nahi du), eta gene horren *knockout*-a eratuz (Behrmann et al., 2017)-tik moldatuta.



KOen sorrerarako CRISPR/Cas9an oinarritutako teknika munduko ikerkuntza-laborategi askotan erabiltzen bada ere, prozedura honek badauka bere konplexutasuna. Hori saiesteko, azken urteotan protokolo ugari garatu dira KOen sorrera ahalik eta modu errez eta sinpleenean burutu ahal izateko¹: gRNAk diseinatzeko programak, hauek klonatzeko bektore ugari, eta sortutako lerro zelularrak hautatu eta balioztatzeko teknika desberdinak, besteak beste sortu dira. Metodologia optimizatua egon arren, badira zenbait pauso zailak edota neketsuak direnak. Aipagarrienetakoa, KOak diren zelulak identifikatzea izaten da. Izan ere, edizio genikoa soilik gertatzen da zelulen proportzio batean, eta editaturiko zelulen bilaketa zehatza diseinatu behar izaten da. Prozesu honi balioztapen pausua deitzen zaio, eta normalean laborategiek asteak edota hilabeteak behar izaten dituzte benetako KOak diren zelulak identifikatzeko. Arazo hau saihesteko, duela urte gutxi, ikerketa laborategi batzuek KO diren lerro zelularrak kultiboan hautatzeko eta hauek balioztatzeko protokolo bereziak garatu dituzte, prozeduraren efizientzia handituz eta KOa lortzeko beharrezko denbora murriztuz (Blomen et al., 2015; Haarhuis et al., 2017; Lackner et al., 2015) Protokolo hauetako bat laborategian martxan jartzeak asko lagunduko luke edozein generako KO diren lerro zelularrak modu sinple eta eraginkor batean lortzen.

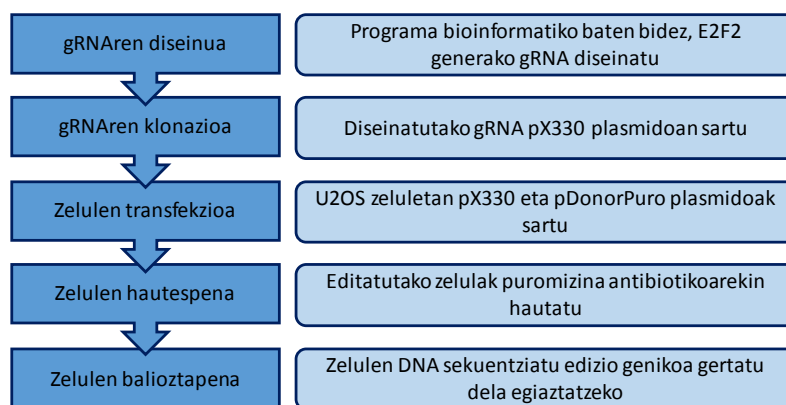
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburu nagusia CRISPR/Cas9 metodologian oinarritutako protokolo berri bat laborategian inplementatzea izan da, gene jakin baterako KO diren lerro zelularrak modu sinple eta azkar batean lortzeko. Horretarako, *E2F2* genea hartu da eredu moduan, gene honen adierazpena oztopatuta duen U2OS lerro zelularra sortzeko, Lackner eta kolaboratzaileek garatutako metodologian oinarrituta (Lackner et al., 2015).

3. Ikerketaren muina

E2F2 genea adierazten ez duen U2OS lerro zelularra sortzeko 2. irudian adierazitako lan-fluxua jarraitu genuen.

2. irudia. *E2F2* genea adierazten ez duen lerro zelularra sortzeko jarraitutako prozedura orokorra.



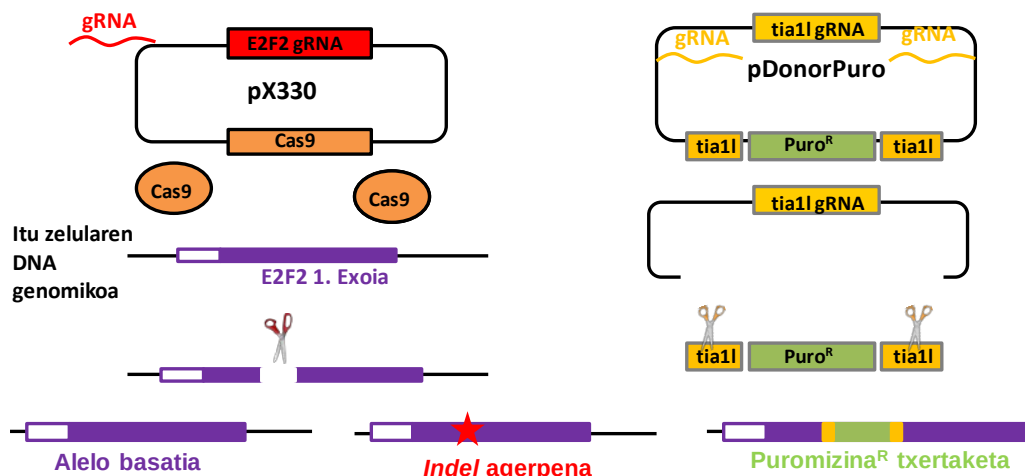
*E2F2*rako gRNA molekulen diseinua *Benchling* programa bioinformatikoarekin burutu zen. Diseinatutako gRNA 1. exoian kokatzen den sekuentzia batekiko osagarria da. Modu honetan, mozketa gertatuko den lekuan STOP kodoi goiztiarrak sortzen badira, proteinaren sekuentziaren lehenengo zatian gertatuko da, eta ondorioz ez da proteinarik itzuliko.

Diseinatutako gRNA pX330 plasmidoan (Addgene) sartu genuen BbsI murrizketa-lekuen artean, Ran eta kolaboratzaileek deskribatu zuten protokoloa jarraituz (Ran et al., 2013). Plasmido honek, gRNA kodetzez aparte, Cas9 ere adierazten du, sarreran esan bezala, DNA mozteko guraize batzuen moduan jarduten duen proteina delarik. Aipatu beharra dago, plasmido honek ez daukala zelula eukariotoetan hautespenik burutzeko erresistentzia-generik, eta horregatik, pDonorPuro plasmidoarekin batera sartu behar dela zeluletan. pDonorPuro plasmidoak puromizinarekiko erresistentzia-genea (Puro^R) darama, bi *tia1l* ezagupen-eskualdez mugatuta (giza zeluletan agertzen ez diren sekuentzia batzuk dira); era berean, pDonorPuro plasmidoak *tia1l* sekuentzia hauek ezagutzen dituen gRNA ere kodetzen du (3. Irudia, goiko atala).

Plasmido bi hauek, hots, *E2F2*rako gRNA daraman pX330, eta pDonorPuro, U2OS zeluletan sartu ziren. pX330 plasmidoak kodetzen duen Cas9 proteina U2OS zeluletan adierazten denean, bi gRNA desberdinekin lotu daiteke: *tia1l* gRNArekin lotzean, Cas9k pDonorPuro plasmidoko *tia1l* sekuentziak moztu eta puromizinarekiko erresistentzia-genea askatuko du; *E2F2*rako gRNArekin lotzean, bestalde, Cas9k *E2F2* genearen lehenengo exoia moztuko du. Zelulak, berehala, DNA konpontzeko mekanismoak jarriko ditu martxan, hiru ondorio posible egongo direlarik (3. irudia). Kasu batzutan DNaren bi muturrak berriro elkartuko dira, *E2F2* basatia berreskuratuz; beste kasu batzutan konponketa prozesuan *indel* txikiak agertuko dira, *E2F2* genearen irakurtarua aldatuz, eta STOP kodoi goiztiarrak sorraraziz; azkenik, kasu gutxi batzutan, mozketa gertatu den lekuan pDonorPuro plasmidotik askatutako puromizinarekiko erresistentzia-genea txerta daiteke *E2F2* genean, zelulari antibiotiko horrekiko erresistentzia emanez. Gainera, Puro^R genearen txertaketak beste eragin garrantzitsu bat ere badauka, *E2F2* genearen adierazpenaren inaktibazioa hain zuzen ere (3. irudia). Honi esker, zelulak puromizina antibiotikoarekin tratatzean, bakarrik biziraungo dute antibiotikoarekiko erresistenteak direnak

eta aldi berean *E2F2* genea inaktibatuta daukatenak. Honek ondorengo balioztapen prozesua asko errazten du, badakigulako behintzat *E2F2* generako kopietako bat inaktibatuta dagoela biziraungo duten zeluletan.

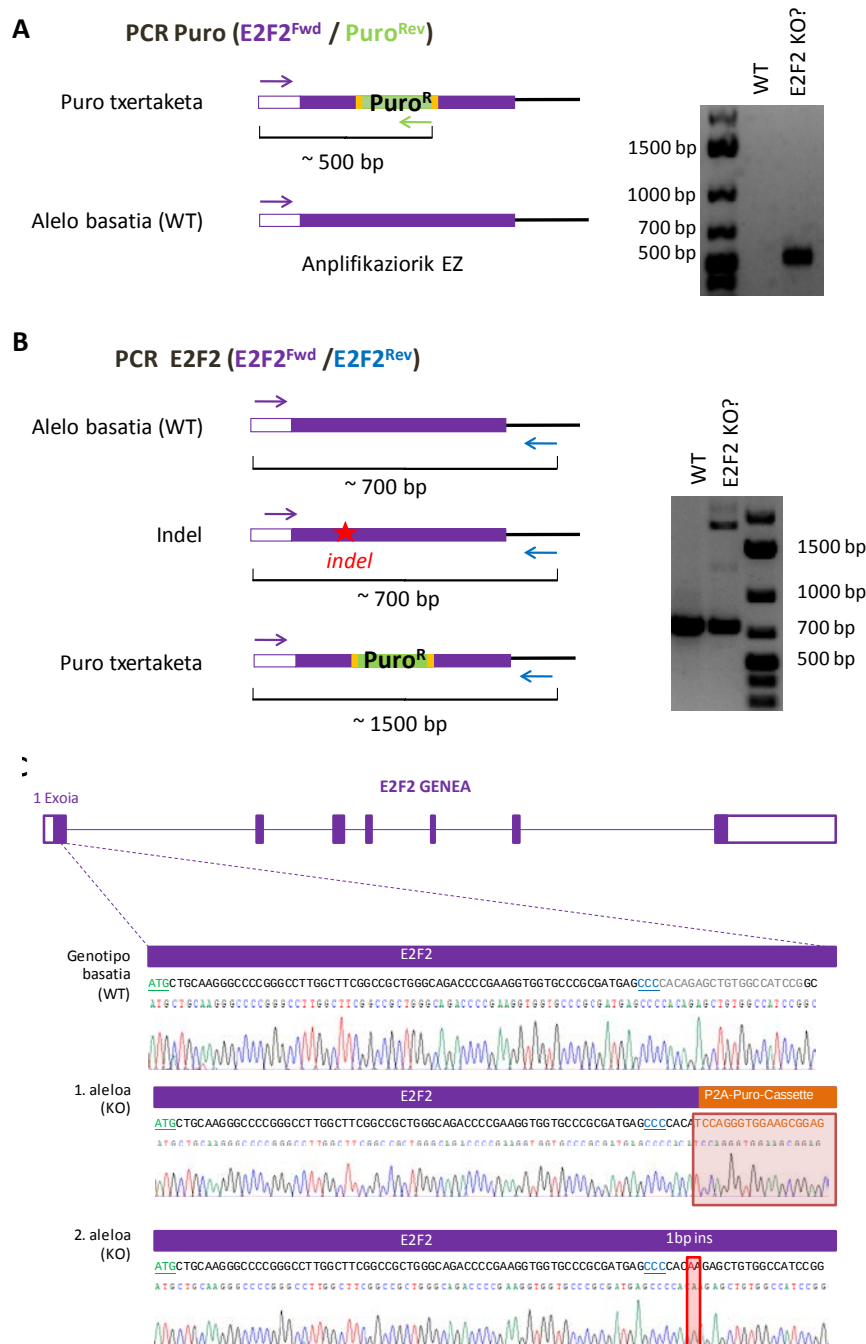
3. irudia. *E2F2* genea adierazten ez duten zelulak lortzeko jarraitutako estrategia. U2OS zeluletan pX330-*E2F2* gRNA (ezkerraldean) eta pDonorPuro (eskumaldean) plasmidoak sartu ziren. pX330 plasmidoak kodetutako Cas9 proteina *E2F2* eta *tia1l* sekuentziak ezagutzen dituen gRNA molekularekin elkartu, eta zelularen genomako *E2F2* geneko 1. exoia eta pDonorPuro plasmidoko *tia1l* sekuentziak moztuko ditu, hurrenez hurren. Azken kasu honetan puromizina erresistentzia kasetea (Puro^R) askatuko da. Zelulak berehala konponketa mekanismoak aktibatuko ditu, hiru ondorio posibleekin: berriro gene basatia berreskuratzea, *indel* baten agerpena ematea edo puromizina kasetearen txertaketa ematea.



Prozedura hau jarraituz, zenbait lerro zelular lortu genituen puromizinarekiko erresistenteak zirenak. Ondoren, *E2F2* genea benetan eraldatuta zegoenaren egiaztapena DNA mailan egin zen. Erabilitako U2OS zelulak diploideak izanik, gene bakoitzerako bi alelo edo kopia dituztela kontutan hartu behar dugu. Honek esan nahi du balioztapenean bi aleloen genotipoak aztertu behar ditugula, bi anplifikazio edo PCR (polimerasaren erreakzio kateatua) analisi bidez hain zuzen ere. PCRTako batean (PCR Puro, 4A Irudia), aurreranzko hasle bat diseinatu zen *E2F2* geneko 1. introia ezagutuko duena, eta atzeranzko hasle bat puromizina genearekiko osagarria. U2OS zelula basatien eta lortutako lerro zelular baten DNA genomikoa txantilo moduan hartuta PCR bat burutu genuen aipatutako hasle bikotearekin. Espero genuen moduan, zelula basatietan ez genuen anplifikaziorik detektatu. Aldiz, CRISPR/Cas9 bidez eraldatutako zeluletan 500 base-pareko produktu (banda) bat ikusi genuen. Honek esan nahi du sortutako lerro zelularrak, kopietako batean behintzat, puromizina genea txertatuta daukala *E2F2* genearen baitan. Modu paraleloan beste PCR bat burutu genuen (PCR *E2F2*, 4B Irudia), lehen diseinatutako aurreranzko haslea, *E2F2* genearen 2. introia ezagutuko duen atzeranzko hasle batekin konbinatuz. Kasu honetan, U2OS zelula basatien DNA genomikoa anplifikatzean 700 base-pareko banda bat detektatu genuen, esperotako moduan. Eraldatutako lerro zelularrean, ordea, bi banda ikusi genituen, bakoitza *E2F2*rako kopia edo alelo batetatik eratorria. Seguruenik 1.500 base-pare inguruan agertzen dena lehen behatutako puromizina txertaketa daukan kopiari dagokio; alabaina, 700 base-pareko altueran dagoen bandaren kasuan ezin ditugu kopia basatia eta editatutakoa bereizi. Arrazoi honengatik, bi banda hauek eta basatia purifikatu, eta sekuentziatu genituen.

4C Irudian sekuentziazioaren emaitzak ageri dira. Lortutako sekuentzia basatia beste bi bandei zegozkien sekuentziekin konparatu genuen. Kopietako batean Puro^R genearen txertaketa ikusi genuen, egiaztatuz PCRan ikusitakoa. Beste kopian, ordea, adenina nukleotidoaren txertaketa behatu genuen, genearen edizioa gertatu dela egiaztatuz. Nukleotido bakarraren txertaketa denez, honek irakurtarauaren aldaketa eta STOP kodoi goiztiar baten agerpena ekarriko du. Beraz, sortutako lerro zelularra *E2F2*rako KO homozigotoa dela ondoriozta dezakegu, kopietako batean Puro^R genea eta bestean *indela* aurkeztzen dituelarik (*E2F2*^{Puro/Indel} genotipoa).

4. irudia. E2F2 generako zelula KOen balioztapena DNA genomiko mailan. A. Puromizina kasetearen integrazioa gertatu dela egiaztatzeko E2F2rako aurreranzko (Fwd) eta puromizinarako atzeranzko (Rev) hasle bikote bat diseinatu ($E2F2^{Fwd}/Puro^{Rev}$), eta PCR erreakzio bat burutu zen zelula basatien (WT) eta balioztatu beharreko lerro zelularren ($E2F2$ KO?) DNA genomikoarekin. WT zeluletan anplifikaziorik behatu ez zen bitartean, sortutako lerro zelularrean 500 base pareko (bp) banda ikusi zen, puromizinarekin txertaketa egiaztatuz. B. DNA genomiko berberak hartuta, beste PCR bat burutu zen aurreranzko (Fwd) hasle berdina eta E2F2rako atzeranzko (Rev) hasle bat erabilita ($E2F2^{Fwd}/E2F2^{Rev}$). WT zeluletan 700 bp-ko produktua behatu zen bitartean, sortutako lerro zelularrean produktu honetaz aparte, 1500 bp inguruko beste bat ikusi genuen. C. Azkeneko bi PCR produktuen nukleotido segida ezagutzeko Sanger sekuentziazkoa burutu genuen. WT zelulen DNArekin konparatuta, sortutako lerro zelularreko kopietako batean puromizinarekin txertaketa (P2A-Puro-Cassette), eta bestean nukleotido bateko txertaketa (1 bp ins) gertatu direla ikus dezakegu.



4. Ondorioak

Geneen funtzioak aztertzeke erabiltzen den metodo azkar eta erraz bat RNAi bidezko teknikan oinarritzen da. Teknika hau oso erabilgarria suertatu den arren, ez du geneen inaktibazio totala baimentzen. Aldiz CRISPR/Cas9 teknikan oinarritzen den edizio genikoak muga hauek gainditzen ditu, gene jakinen adierazpena guztiz deuseztatuta duten lerro zelularrak modu erraz eta eraginkor batean sortzea ahalbidetzen baitu. Lan honetan, CRISPR/Cas9n oinarritutako metodo bat erabiliz, E2F2 generako zelula KOak modu oso efizientean sortzea lortu dugu. Gainera, CRISPR/Cas9 metodoaren bidez edizio genikoa burutzeke baldintzak optimizatu ditugu, hala nola, gRNA diseinatzeke programa bioinformatiko egokia bilatuz, zelula eraldatuen hautespena aurrera eramateke modu eraginkorra finkatuz eta sortutako lerro zelularra balioztatzeke tekniketako bat aurkeztuz. Optimizatutako protokoloarekin, laborategian edozein genetarako lerro zelular KOak CRISPR/Cas9 teknikaren bidez eratzeke estrategia martxan jartzea lortu dugu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ondorengo ikerketa baterako, DNA mailan ikusitako aldaketa, RNA eta proteina mailan balioztatzea gustatuko litzaiguke, PCR kuantitatiboa eta western plapaketa teknikak erabiliz. Behin balioztapena eginda, zelulen karakterizazioa burutzeke gustatuko litzaiguke, DNA mailan burututako aldaketaren ondorio funtzionalak zeintzuk diren aztertzeke. Azkenik, E2F familiako transkripzio faktoreak ziklo zelularren erregulazioan parte hartzen dutenez, familia bereko beste kide batzuen KOak sorraraztea erabilgarria izango litzateke.

6. Erreferentziak

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., W. P. (2002). Studying Gene Expression and Function. In *Molecular Biology of the Cell* (p. 712). Garland Science.
- Behrmann, L., McComb, S., Aguadé-Gorgorió, J., Huang, Y., Hermann, M., Pelczar, P., ... Bornhauser, B. (2017). Efficient Generation of Multi-gene Knockout Cell Lines and Patient-derived Xenografts Using Multi-colored Lenti-CRISPR-Cas9. *Bio-Protocol*, 7(7).
- Blomen, V. A., Majek, P., Jae, L. T., Bigenzahn, J. W., Nieuwenhuis, J., Staring, J., ... Brummelkamp, T. R. (2015). Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science*, 350(6264), 1092–1096.
- Doetschman, T., & Georgieva, T. (2017). Gene Editing with CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease. *Circulation Research*.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A., Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Letters*, 391, 806–811.
- Haarhuis, J. H. I., van der Weide, R. H., Blomen, V. A., Yáñez-Cuna, J. O., Amendola, M., van Ruiten, M. S., ... Rowland, B. D. (2017). The Cohesin Release Factor WAPL Restricts Chromatin Loop Extension. *Cell*, 169(4), 693–707.e14.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.
- Lackner, D. H., Carré, A., Guzzardo, P. M., Banning, C., Mangena, R., Henley, T., ... Bürckstümmer, T. (2015). A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging. *Nature Communications*, 6, 10237.
- Liu, X., Milshina, N., Glasser, K., Nelson, K., Hannenhalli, S., Chaturvedi, K., ... Skupski, M. (2002). The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291(5507), 1304–1351.
- McPherson, J. D., Marra, M., Hillier, L., Waterston, R. H., Chinwalla, A., Wallis, J., ... Lehrach, H. (2001). A physical map of the human genome. The International Human Genome Mapping Consortium. *Nature*, 409(6822), 934–941.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11), 2281–2308.
- Sledz, C. A., & Williams, B. R. G. (2005). RNA interference in biology and disease. *Blood*.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Espainiako Jaurlaritzako (Ministerio de Ciencia e Innovación) dirulaguntzari esker burutu da (SAF2015-67562-R). Iraia García-Santistebanek Eusko Jaurlaritzako diru laguntza postdoktorala eta EHUKo PES15/44 proiektuari lotutako dirulaguntza jaso ditu. Natividad Alcorta-Sevillanok Eusko Jaurlaritzako Ikasiker dirulaguntza jaso du.

Oharra: lan hau Natividad Alcorta-Sevillanoren Gradu Amaierako Lanean oinarrituta dago.

¹<https://www.addgene.org/crispr/guide/>