



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

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

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

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

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

114-121 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.15>



CB₁ hartzaile astrozitikoa mikroskopio elektronikoko prestakinetan detektatzeko markatzaile astroglialak: 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 astroglial 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 molekula 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 oinarriko 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 neuronala 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 heda 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 zentrolean, bai eta immune sistema, bihotz-hodietako sistema, sistema endokrino eta energia metabolismoan ere. EKSa hartzaile endokannabinoiden eta hauei lotzen zaizkien estekatzaile endogenoek osatua dago, baita sintesi eta degradazioan diharduten entzimez, eta hartzaile-estekatzaile arteko interakzioaren ondorioz ekoizten diren proteina eta hauei erlazionatutako bidezidorrez (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, EKSa 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-neuronaren 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 endokannabinoidarena.

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 erabiliena proteina harikara azidiko gliala (ingelesetik: *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 (ingelesetik: *glutamate aspartate transporter*, GLAST), astrozitoek era espezifikoan adierazten duten aminoazido kitzikatzaileen garraiatzaile bat da, zelula osoan zehar adierazten dena. Proteina honek izugarriko 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

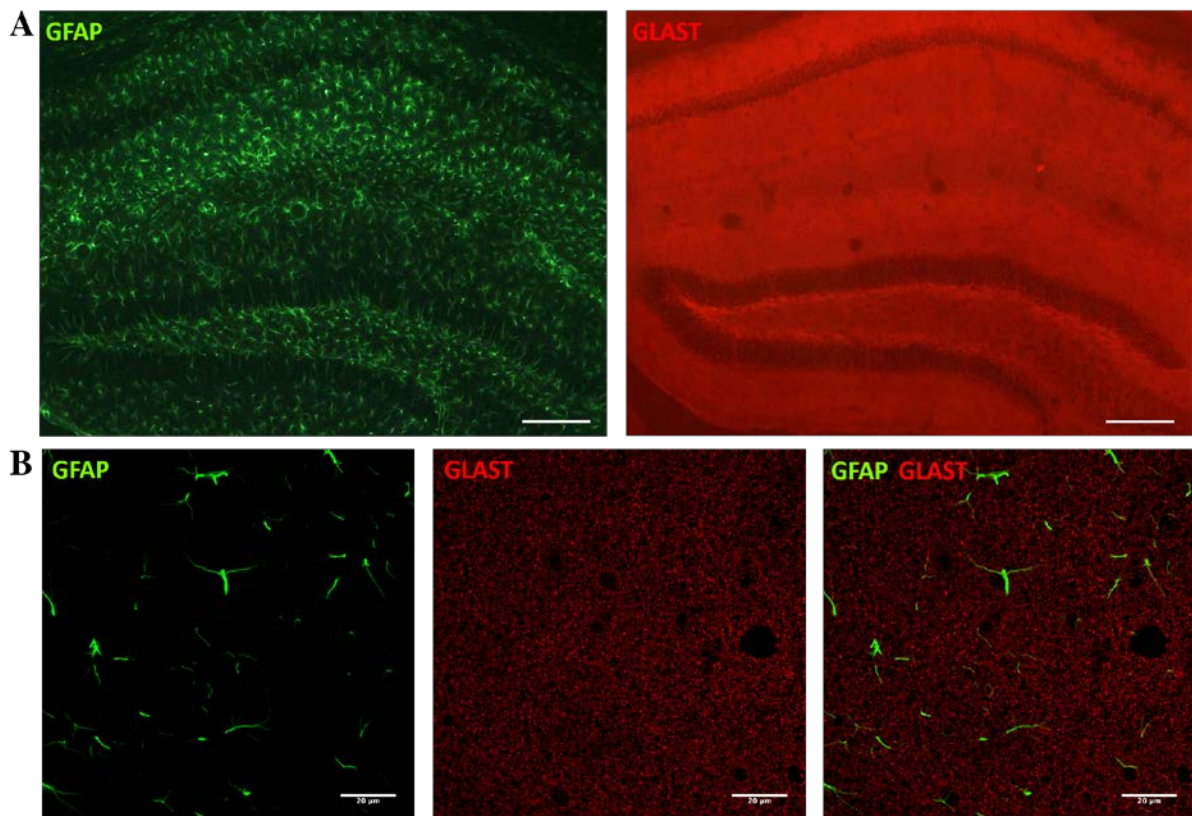
3.1.1. GFAP hipokanpoko astrozitoen gorputz eta adarkadura nagusietara mugatzen den bitartean, GLASTen markaketak hipokanpo osoa betetzen du

Mikroskopio fokukidea erabili zen hipokanpoko astrozitoetan bi markatzaile ezberdinek (GFAP eta GLAST) zuten markaketa patroia aztertzeke asmoz (1. irudia). GFAP astrozitoen zitoeskeletoko proteina garrantzitsuenetariko bat izanik, zelula hauen gorputz eta adarkadura nagusiak ikustea ahalbideratzen 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.

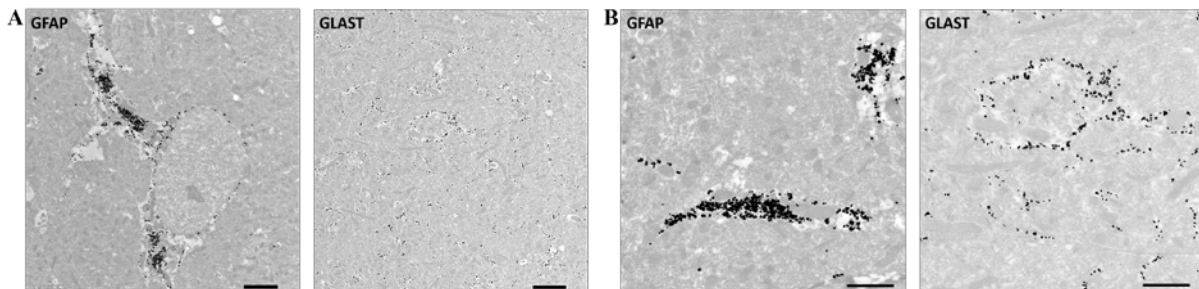
1. irudia. Mikroskopia fokukiderako immunohistokimika bidez markaturiko hipokanpoa, GFAP (berdea-alexa488) edo GLAST (gorria-cy3) antigorputzak erabiliz. A. GFAP astrozitoen soma eta adarkadura nagusietan kontzentratuta agertzen den bitartean, GLAST garraiatzaileak hipokanpo osoa hartzen du, zelula piramidal 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 gutxian zehar sakabanatzen dira, espezifikoki astrozitoen mintzean agertzen direlarik (B eskala barra=1 micra).

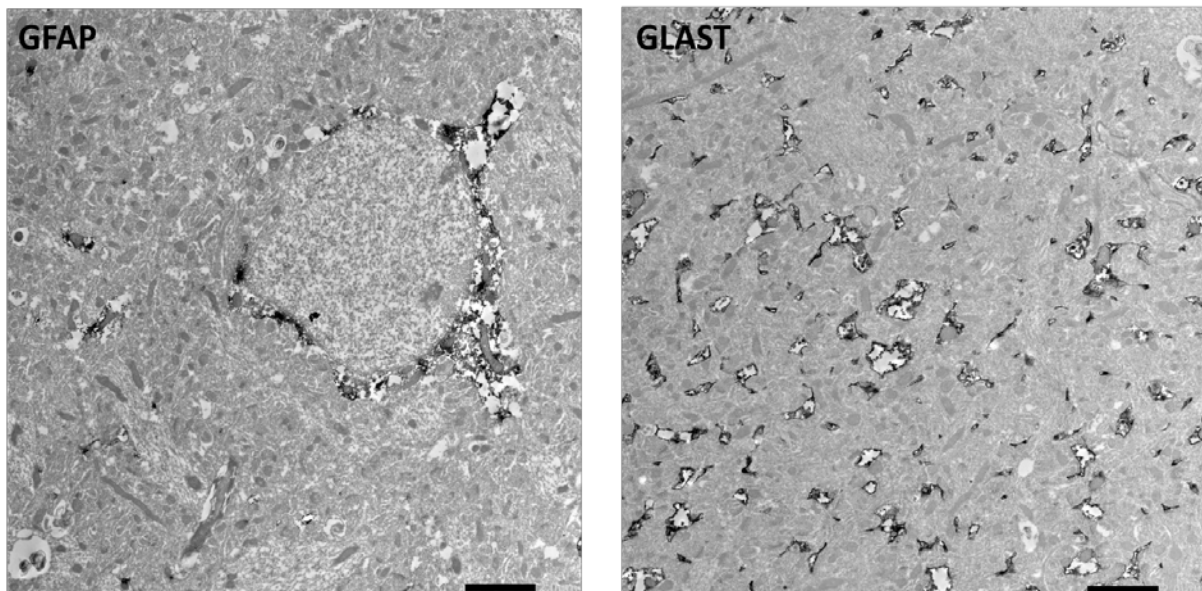


3.1.3. GLAST markatzaile astrozitikoak GFAPk baino hiru eta lau aldiz gehiago markatzen du astrozitoen azalera eta mintza, hurrenez hurren

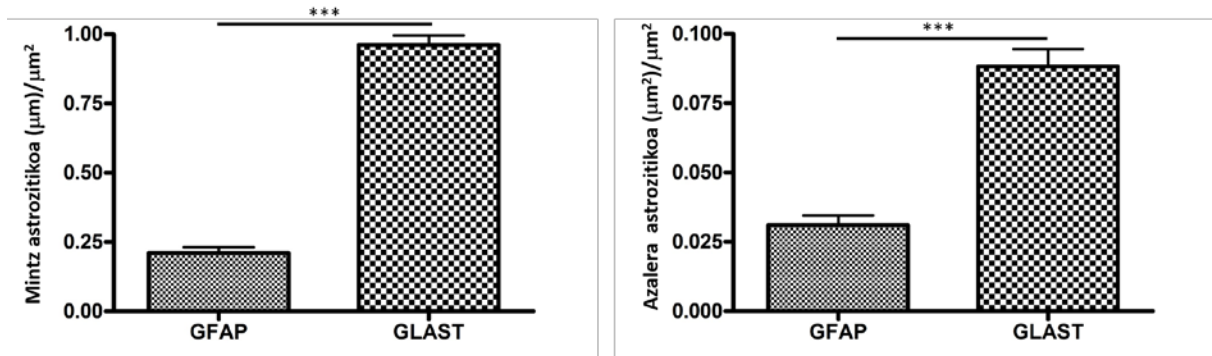
Ondoren, mikroskopio elektronikorako immunoperoxidasa metodoa erabiliz bi markatzaileei esker detekta daitezkeen prozesu astrozitikoaren azalera eta mintz luzera aztertu zen. Immunoperoxidasa metodoan erabilitako antigorputz sekundario biotinilatuari esker DAB prezipitatua, intereseko proteina adierazten 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 GFAPrekin konparatuz. Detekta daitezkeen astrozitoen mintz luzera, ordea, lau aldiz handiagoa da. Hau logikoa da, GLAST markatzaileari esker, GFAPrekin 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.



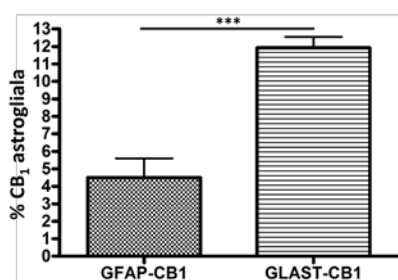
4. irudia. Mikroskopia elektronikorako immunoperoxidasa metodoa erabiliz markatutako prozesu astrozitikoen analisi estatistikoa. **A.** GLAST antigorputzak lau aldiz mintz astroglial gehiago markatzen du ($0,96 \pm 0,019 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) GFAP antigorputzarekin alderatuz ($0,21 \pm 0,034 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$), (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 bikoitzak 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.

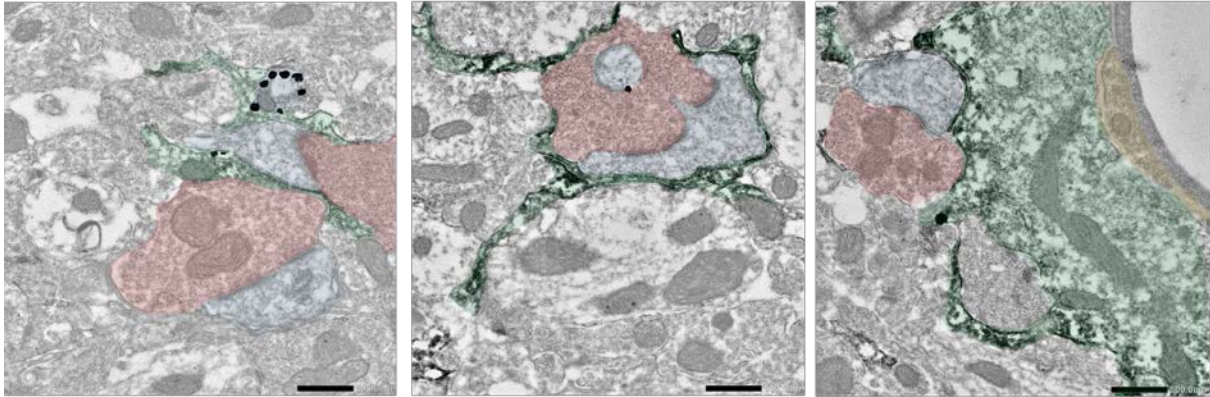
CB₁ hartzailea perisinapsian kokatzen da batez ere, bertan burutzen baititu funtzio nagusiak. Analisi estatistikoa ikus daitekeenez, GLAST-CB₁ immunohistokimikari esker, GFAP-CB₁ antigorputz konbinazioarekin detektatzen den CB₁ astroglialaren bikoitza hauteman daiteke (5. irudia).



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 batenez, mikroskopia 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 mikroskopia elektronikoko immunohistokimika bikoitzan. GFAP adierazle klasikoarekin alderatuz gero, azalera astrozitikoaren hirukoitza agertzen da DABz betea, eta lau aldiz mintz astroglial gehiago detekta daitezke. GFAP astrozitoen zitoeskeletoko proteina harikara batenez, 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 astrozitikoaren parte bat gutxietsiz.

GLAST garraiatzaileak izugarriko 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 mikroskopia elektronikoko ultramikrografietan, astrozitoetan adierazten diren antigorputz gehiago detektatzea ahalbidetzen duelarik.

Sistema endokannabinoideko 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, mikroskopia 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. Emaitza hauek aditzera ematen dute GLAST markatzaile astrozitiko hobea dela mikroskopia 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 Jaurlaritzak BCG IT764-13 eta MINECO/FEDER SAF2015-65034-R. SA-k Euskal Herriko Unibertsitatearen PhD kontratu bat dauka (PIF 16/251).