



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

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

*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*

144-148 or.  
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.18>



## **mglu2 eta mGlu3 glutamatoaren hartzaille metabotropikoen kokapena CB1 hartzaille kannabinoidearekiko hipokanpoaren hilusean**

Medrano-Peral, Aitor<sup>1,2</sup>; Buceta, Ianire<sup>1,2</sup>, Ramos-Uriarte, Almudena<sup>1,2</sup>; Egaña-Huguet, Jon<sup>1,2</sup>; Bonilla-Del Río, Itziar<sup>1,2</sup>; Royo, Naiara<sup>1,2</sup>; Rico-Barrio, Irantzu<sup>1,2</sup>; Elezgarai, Izaskun<sup>1,2</sup>; Puente, Nagore<sup>1,2</sup>; Reguero, Leire<sup>1,2</sup>, Achicallende, Svein<sup>1,2</sup>; Terradillos, Itziar<sup>1,2</sup>, Soria-Gómez, Edgar<sup>1,2</sup>; Mendizabal, Juan<sup>1,2</sup>; Gerrikagoitia, Inma<sup>1,2</sup>; Meana, José Javier<sup>3</sup>, Gómez-Urquijo, Sonia<sup>1,2</sup> eta Grandes, Pedro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Neurozientzia Saila, Euskal Herriko Unibertsitateko Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea*

<sup>2</sup>*Achucarro Basque Center for Neuroscience, EHUKo Zientzia Parkea*

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

### ***Laburpena***

Hipokanpoko horzdun zirkunboluzioko hilusean, CB1 hartzaille kannabinoide eta mGlu2 eta mGlu3 glutamatoaren hartzaille metabotropikoen arteko hurbiltasuna eta kolokalizazioaren berri eman izan da. mGlu2 edo mGlu3 hartzailleak selektiboki ezabatzeko manipulaturako saguen burmuinak erabiliz CB1arekiko aipaturako mGlu bakoitzaren erlazioa zehaztu ahal izan dugu. mGlu2 hartzaillea prozesu neuronalean 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 (Petralia 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 kitzikatzailan 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 kitzikatzailak 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 erregulatzailak 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 antzeakoak 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.

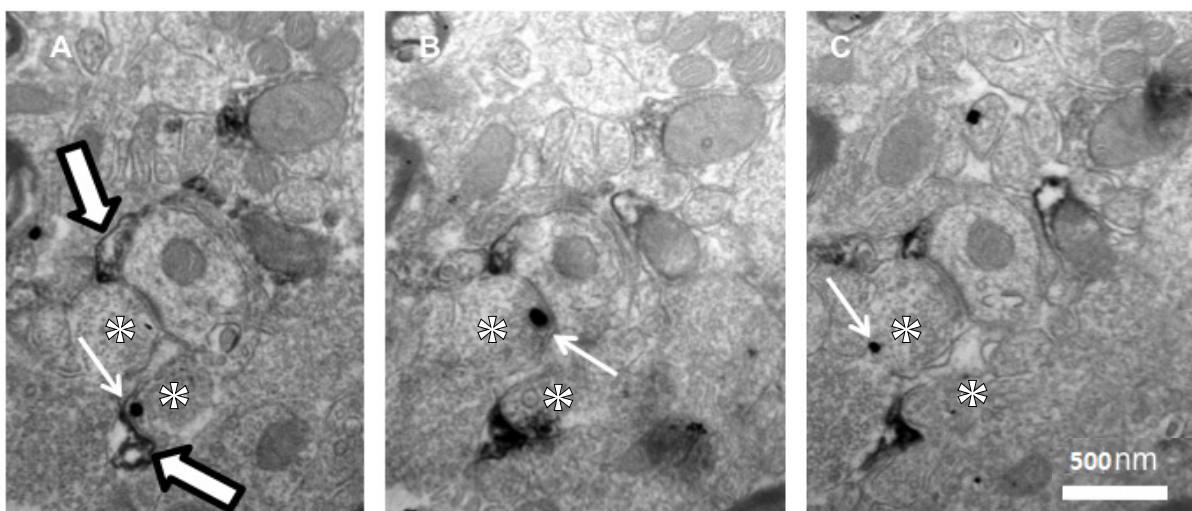
Magnifikazio handiko argazkietan diaminobenzidinaren (DAB) markaketa ikusten zen glutamatoaren mGlu2 eta mGlu3 hartzaileen presentzia adieraziz. Halaber, urre-partikulak ikusten ziren CB1 hartzaileak markatuz. Bi markaketen hurbiltasuna eta erlazio topografikoa ere egiaztatu zen hiluseko eremuan.

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.

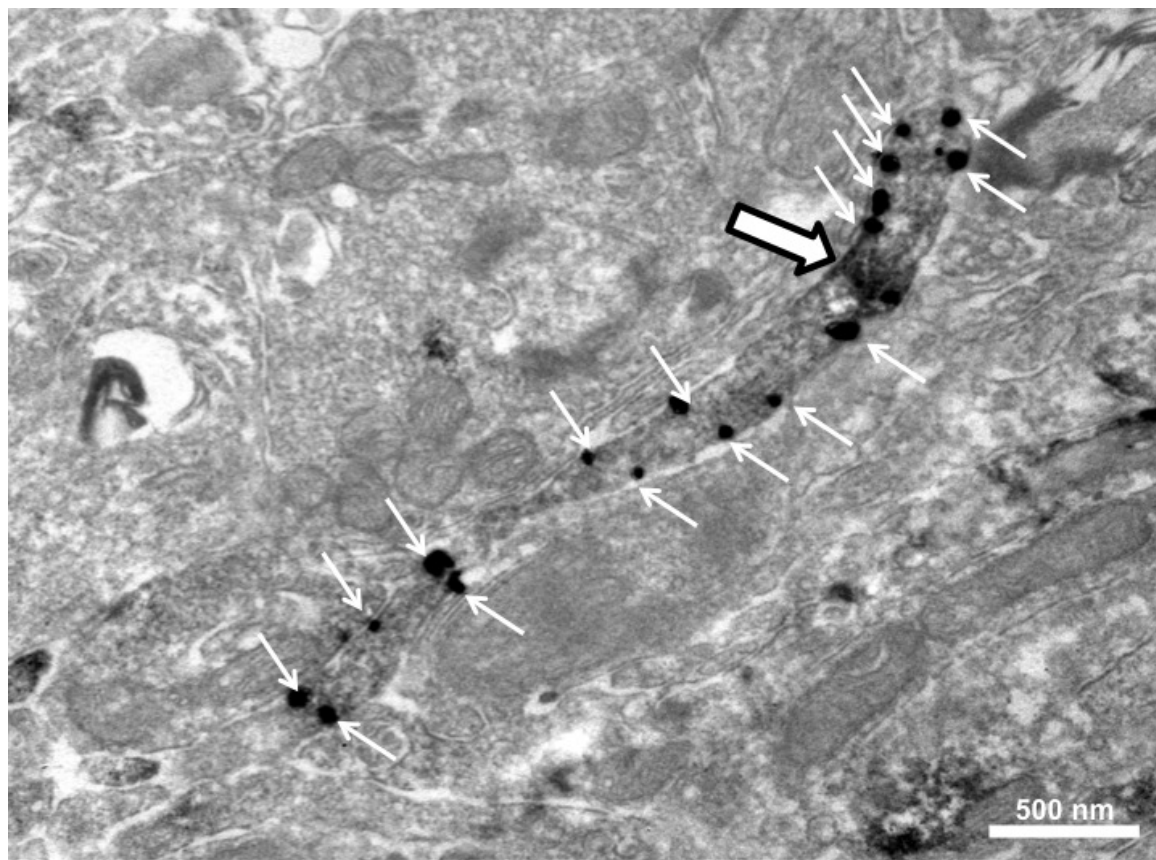
Alde batetik, mGlu2KO saguen hilusean, mGlu3 hartzailea glia prozesuen ezaugarriak zituzten egituretan ikusia izan zen eta, askotan, mGlu3-a zuten egiturak, CB1-z markatutako botoiekin kontaktuan ikusi genituen (1. Irudia). Bestetik, mGlu3KO saguen hilusean, mGlu2 hartzailea ikusi genuen neurona prozesuetan.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

## 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*. IKERGAZTE. 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).