



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

OSASUN ZIENTZIAK

**GRM2 eta GRM3 geneen
adierazpenaren ebaluazioa
subjektu eskizofrenikoen garun
postmortemeko kortex
aurrefrontalean**

*Jon Ander Santas Martín,
Alfredo Ramos Miguel,
Luis Felipe Callado Hernando,
Jose Javier Meana Martinez
eta Guadalupe Rivero Calero*

29-36 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.04.03>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



GRM2 eta GRM3 geneen adierazpenaren ebaluazioa subjektu eskizofrenikoen postmortem garuneko kortex aurrefrontalean

Jon Ander Santas¹, Alfredo Ramos^{1,2}, Luis Felipe Callado^{1,2,3}, Jose Javier Meana^{1,2,3},
Guadalupe Rivero^{1,2,3}

¹Farmakologia saila, Medikuntza eta Erizaintza fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM); ³Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketa Institutua.

jsantas001@ikasle.ehu.eus

Laburpena

mGluR2/3ren farmako aktibatzaileak eskizofreniaren disfunzio glutamatergikoa tratatzeko saiatu dira eraginkortasun eskasarekin, baliteke klozapinak edo beste antipsikotikok eragindako mGluR2ren murrizketagatik. mGluR2/3 kodetzen duten GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpena qPCRz neurtu zen postmortem garuneko kortex aurrefrontalean. Tratamendu antipsikotikoaren, eta bereziki klozapinaren, eragina ebaluatu zen, tratatu eta ez-tratatutako subjektu eskizofrenikoetan. GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenean ez zen desberdintasunik aurkitu subjektu eskizofrenikoen eta kontrolen artean. Klozapinak ez zuen GRM2/3 gene-adierazpena esanguratsuki modulatu beste antipsikotikoekin konparatuz. GRM2ren transkripzio murriztuak ez du mGluR2ren dentsitate murriztua azaltzen.

Hitz-gakoak: Eskizofrenia, GRM2, GRM3, qPCR, kortex aurrefrontala, klozapina

Abstract

mGluR2/3 activating drugs have been tested to treat glutamatergic dysfunction in schizophrenia with poor efficacy, possibly due to mGluR2 depletion caused by clozapine or other antipsychotics. Gene expression of GRM2 and GRM3, which encode mGluR2/3, was measured by qPCR in postmortem brain prefrontal cortex. The effect of antipsychotic treatment, and specially clozapine, was evaluated in schizophrenic subjects treated or not-treated with these drugs. No differences were found in the gene expression of GRM2 and GRM3 between schizophrenic and control subjects. Clozapine did not significantly modulate GRM2/3 gene expression compared to other antipsychotics. Reduced transcription of GRM2 does not explain reduced mGluR2 receptor density.

Keywords: Schizophrenia, GRM2, GRM3, qPCR, prefrontal cortex, clozapine

1. Sarrera eta motibazioa

Eskizofrenia portaera-sindrome kognitibo konplexua da, bizitza osoan %0,7ko prebalentzia duena (Howes et al., 2015). Bere etiologian faktore genetikoek eta ingurumen-faktoreek sustatutako garunaren garapenaren nahasmenduak parte hartzen duela proposatu da (Owen et al., 2016). Eskizofreniak hainbat baldintza kliniko heterogeneo biltzen ditu, bi ezaugarri komunekin: psikosia eta gainbehera sozio-laborala. Psikosiaren sintomak sintoma positibo gisa bildu dira, eta gainbehera soziorabialaren oinarrian dauden adierazpen psikopatologikoak sintoma negatibo gisa bildu dira (de Oliveira-Souza et al., 2007). Sintoma positiboaren artean eldarnioak, aluzinazioak (entzumenezkoak batez ere, baina beste zentzumen batzuk ere inplikaturik egon daitezke kasu batzuetan) eta pentsamendu eta hizkera desantolatutak aurki daitezke. Sintoma positiboek berriro hasteko eta arintzeko joera dute, nahiz eta paziente batzuek epe luzerako hondar sintoma psikotikoak izan. Psikosiaren estreinaldia nerabezaroaren amaieran edo helduaroaren hasieran gertatzen da normalean, eta sarritan fase prodromiko bat aurretik gertatzen da (Owen et al., 2016). Sintoma negatiboek dagokienez, bost domeinu onartu dira,

pentamendu prozesu edo erantzun emozional eskasiei dagozkienak: anhedonia (plazerra sentitzeko gaitasun eza), asozialtasuna (gizarte-harremanetan aritzeko gogorik eza), abolizioa (motibazio eza), afektu moteldua (ahozko edo hitzik gabeko erakustaldi emozional murriztua) eta alogia (hizketapobrezia) (Uno eta Coyle, 2019). Azkenik, sintoma kognitiboak eskizofreniaren ezaugarri nagusi bat dira, eta azaleratzen diren sintoma goiztiarrenak izan ohi dira. Horrelako sintomak eskizofreniaren agerpena baino lehen agertu ohi dira, fase prodromikoan, batzuetan nerabezaroan edo haurtzaroan ere. Subjektu eskizofrenikoek normalean urritasun nabarmenak erakusten dituzte, epe luzerako memorian eta prozesatzeko abiaduran (neurokognizioa), eta emozioen prozesamenduan eta pertzepzio sozialan (kognizio soziala), besteak beste (Green et al., 2019).

Antipsikotikoek (AP) farmako psikotropikoen azpimultzo bat osatzen dute, psikosiaren tratamendurako erabiltzen direnak. Eskizofrenia eta beste gaixotasun psikotikoak (eldarniozko nahasmendua eta nahaste bipolarra, besteak beste) tratatzeko gomendatzen dira. APek, orokorrean, dopaminaren hartzaileen edota serotoninaren hartzaileen blokeoan oinarritu dira (Lally eta MacCabe, 2015). Lehen belaunaldiko APek (adibidez, haloperidol edo klorpromazina) dopaminaren D2 hartzailea blokeatzen edo antagonizatzen dute. Bigarren belaunaldiko APek (adibidez, ketiapina edo klopapina) D2 hartzailea antagonizatzen dute, afinitate txikiagorekin, eta serotoninaren 5-HT_{2A} hartzailearen antagonistak ere badira (Ginovart eta Kapur, 2012). APek sintoma positiboak nabarmen hobetzen dituzten arren, sintoma negatibo eta kognitiboen aurrean duten eraginkortasuna apala da, eta ondorio kaltegarri ugari dituzte (Marder eta Cannon, 2019). Klopapina (CLO), AP eraginkorrena izan arren, gainerako APei erresistente diren pazienteetan bakarrik aholkatzen da, erabilerarekin lotutako agranulozitosi eta sindrome metabolikoagatik (Dong et al., 2020). Hala ere, disfunzio glutamatergiko baten hipotesia indartzen duten ebidentziak aurkitu direnez gero (berrikuspen baterako, ikusi Marek et al., 2010), sistema honetan aritzen diren farmakoak proposatu dira. Hipotesi glutamatergikoak aurreikusten du glutamatoaren hartzaile metabotropiko 2/3ren (mGluR_{2/3}) estimulazioa onuragarria izan daitekeela eskizofreniaren tratamenduan (Marek, 2015). mGluR_{2/3}ren funtsezko funtzio bat neurotransmisoreen askapena inhibitzea da, beraz, glutamatoarena (auto-hartzaileak) ez ezik, beste neurotransmisore batzuen askapena ere modulatu dute, hala nola dopamina eta GABA (hetero-hartzaileak) (Lyon et al., 2008). mGluR_{2/3} agonistek eskizofrenia gaixoetan aurreko garuneko zirkuitu alteratuetan transmisio-oreka berreskuratzen dutela uste da. Beste hitzetan, mGluR_{2/3} aktibatzeak kortex aurrefrontaleko sinapsietan gehiegizko kitzikapen-transmisioa murriztu dezake, glutamatoaren mailak erregulatuz (Noetzel et al., 2012). Hala ere, entsegu klinikoek emaitza nahasiak eman dituzte (berrikuspen baterako, ikusi Maksymetz et al., 2017). Adibidez, LY2140023, mGluR_{2/3} aktibatzen dituen agonista baten monoterapiak ez zuen plazeboarekiko nagusitasunik erakutsi eta bere garapena eten egin zen (Stauffer et al., 2013). Hala ere, entseguan parte hartu zuten subjektuen azpitaldeen azterketa batean, lehenengo belaunaldiko APekin tratatutako subjektuengan LY2140023-k plazeboak baino eraginkortasun handiagoa erakutsi zuela behatu izan zen. Azpitalde honetan, baina ez beste APekin tratatutako subjektuetan, ikusitako LY2140023ren eraginkortasuna lehen eta bigarren belaunaldiko APen 5-HT_{2A} hartzailearen blokeo ezberdintasunean oinarritu daiteke. Izan ere, 5-HT_{2A} hartzailearen blokeoak mGluR_{2/3} proteinaren erregulazio negatiboa eragin dezakeela proposatu da (Kinon et al., 2015). Zenbait ikerketetan, CLOren (5-HT_{2A} hartzailearekiko afinitate altua duena) tratamendu kronikoak GRM2ren sustatzailean histonen marka epigenetiko aktibatzaile batzuk murrizten dituela ikusi da. Mekanismo hau 5-HT_{2A} hartzailearen antagonismoaren menpekota izan daitekeela proposatu da (Kurita et al., 2012; Ibi et al., 2017). Beraz, entsegu kliniko hauetan erabilitako pazienteen populazio orokorrean, mGluR_{2/3}ren farmako aktibatzaileen eraginkortasun falta behatu zen. Eraginkortasun falta hau aurretiko AP tratamenduak bigarren belaunaldiko APekin eragindako kortex aurrefrontaleko mGluR_{2/3}ren dentsitate txikituagatik gerta daiteke (Maksymetz et al., 2017).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburua

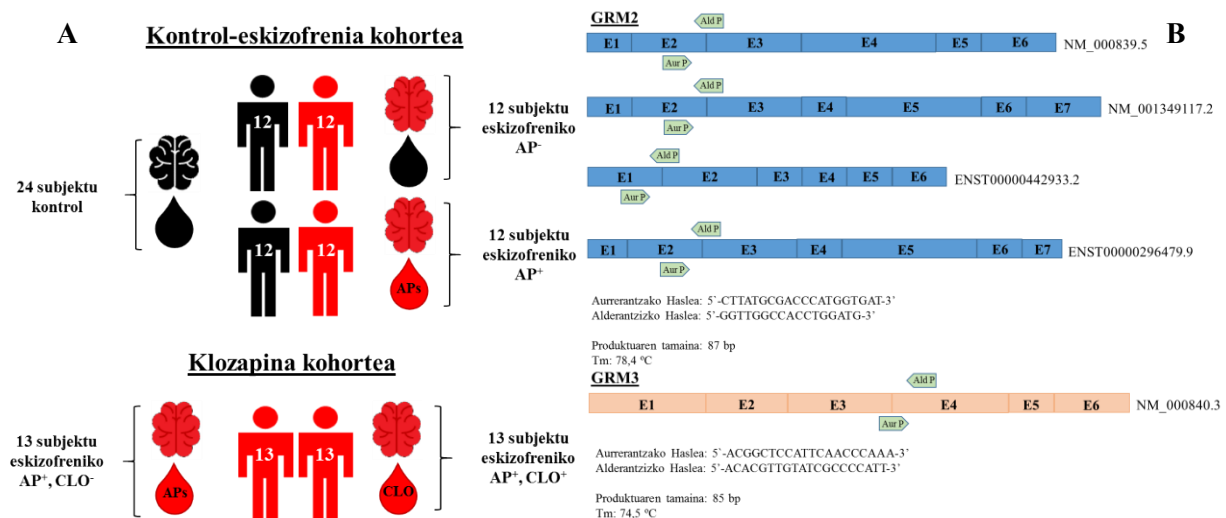
Eskizofrenian mGluR_{2/3} proteinaren eta bere gene kodetzailearen (GRM2) garuneko adierazpena gutxituta ikusi dira, murrizketa handiagoarekin APekin tratatutako subjektu eskizofrenikoetan (Miranda, 2014). APekin tratatutako subjektu eskizofrenikoetan GRM2ren gene-adierazpenaren murrizketa CLOren tratatutako subjektu eskizofrenikoentzat espezifikoa izan daiteke. Hala ere, lehen aipatutako mekanismo epigenetiko horrek (Kurita et al., 2012; Ibi et al., 2017) benetan GRM2ren gene-

adierazpena murrizten duen CLOrekin tratatutako subjektu eskizofrenikoen garunetan aztertze dago. Gainera, mekanismo hori erabili ohi diren APen propietate partekatua den edo, aitzitik, CLOren ezaugarri espezifiko bat den oraindik ez da ezagutzen. Horrez gain, mGluR3ren gene kodetzailea, GRM3, sentikortasun gene gisa identifikatu da eskizofrenian (Harrison et al., 2008). Gure taldeak egindako ebaluazioak subjektu eskizofrenikoen garunetan mGluR3 proteinaren adierazpenaren murrizketa erakutsi du, baina gene-adierazpenari buruzko informazioa falta da oraindik. mGluR2 eta mGluR3 sekuentzia-identitate handia daukate, eta antigorputzen edo ligandoen bidez bereizteko zailak dira (Lyon et al., 2008; Harrison et al., 2008). Proteina mailan emaitza kontrajarriak mGluR2 eta mGluR3 ezagutzen dituzten antigorputzen eta ligandoen espezifikotasun baxuaren ondoriozkoak izan daitezke. PCR kuantitatiboa (qPCR), aldiz, GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpena bereizteko gai da. Beraz, ikerketa honen helburua GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpena APEkin tratatu eta ez tratatutako subjektu eskizofrenikoen garun postmortemeko kortex aurrefrontaletan ebaluatzea da, transkripzio-erregulazioak mGluR2/3 proteinen adierazpenean ikusitako desberdintasuna azaldu ahal duen jakiteko. GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpena CLOrekin tratatutako eta CLO ez diren APEkin tratatutako subjektu eskizofrenikoetan ere ebaluatu zen, gizakietan GRM2ren transkripzio-erregulazioa CLOren ezaugarri berezia (beste APEkin alderatuta) den ala ez ezagutzeko.

3. Ikerketaren muina

Garunak Bilboko Auzitegi Medikuntzako Euskal Institutuan egindako autopsietatik lortu ziren, ikerketa eta berrikuspen etikoen batzordeen politikak betez. RNA totala postmortem garunetako kortex aurrefrontaleko laginetatik erauzi zen eta alderantzizko transkripzioa egin zen cDNA sortzeko. GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenaren balioak subjektu eskizofrenikoetan eskizofreniarik gabeko kontrolekin alderatuta nabarmen aldatzen diren ebaluatzeke, eskizofrenia zuten kasuen eta kontroletako 24na bikoteko kohorte bat erabili zen. Subjektu eskizofrenikoak APEkin tratatutako (AP⁺, n=12) edo ez tratatutako (AP⁻, n=12) subjektuetan banatu ziren, heriotzaren unean odolean lehen/bigarren belaunaldiko APen presentzia edo absentiaren arabera, hurrenez hurren. Bestalde, GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenaren balioak CLOrekin tratatutako (CLO⁺) subjektu eskizofrenikoen eta beste APEkin tratatutako subjektu (CLO⁻) eskizofrenikoen artean konparatzeko, 13 CLO⁺ subjektu eskizofreniko eta 13 parekatutako CLO⁻ subjektu eskizofreniko zeukan kohorte bat aztertu zen (ikus 1A. irudia). Subjektu bikote guztiak adinaren, sexuaren eta postmortem atzerapenaren arabera parekatu ziren.

1. irudia. (A) Kontrol-eskizofrenia eta klozapina kohorteen osaketa. Eskizofreniaren edo APen absentsia garun edo tanta beltzez irudikatzen da, hurrenez hurren. Eskizofreniaren edo APen presentzia garun edo tanta gorritz irudikatzen da, hurrenez hurren. NM = proteinak kodeatzen dituzten NCBIko transkripzio barianteak. ENST = Ensembl-ko transkripzio bariante moztu-itsatsiak. **(B) GRM2 eta GRM3ren transkripzio barianteak amplifikatzeko erabilitako hasleen exoi kokapena, amplifikazio produktuaren tamaina eta *melting* temperatura (T_m).**



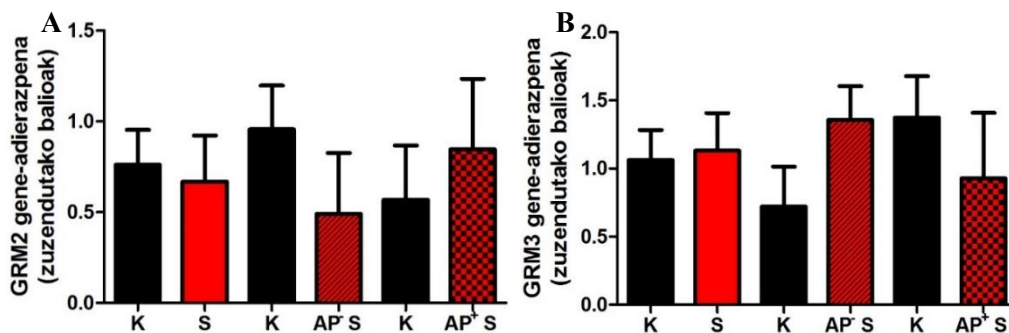
GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenaren mailak neurtzeko qPCRa erabili zen. qPCR teknikak DNA molekula baten amplifikazioa monitorizatzen du PCRan zehar. qPCR produktuak bi modu nagusitan detekta daitezke: kate bikoitzeko edozein DNA molekulatan tartekatzen diren koloratzaile fluoreszente ez-espezifikoak (adibidez, SYBR Green), edo sekuentzia espezifiko baterantz zuzendutako fluoroforo erreportari batekin etiketatutako oligonukleotidoak (adibidez, TaqMan zundak) erabiliz. Fluoroforoaren fluoreszentsia neurtzeak produktu zehatz baten edo gehiagoren sorkuntza-tasa PCR zikloetan zehar neurtzea ahalbidetzen du (Watson et al., 2004). Amplifikazio-kurba osoa fluoreszentsia atari bat gainditzen duen zikloaren arabera laburbiltzen da, atari-zikloa (Ct) deritzona. Ct-ak eta hasierako DNA molekularen kopuruak alderantzizko erlazioa daukate. Beraz, atari-ziklo balio txikiago batek lagin batean DNA molekularen hasierako kontzentrazioa handiagoa dela eta PCR ziklo gutxiago behar direla fluoreszentsia-ataria gainditzeko esan nahi du (Hsu et al., 2021).

Gene-adierazpena $-\Delta\Delta Ct$ (kontrol-eskizofrenia kohortean) edo maila erlatibo (klozapina kohortean) balio gisa adierazi zen. GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenaren mailak bi aldiz normalizatu ziren kontrol-eskizofrenia kohortean. Alde batetik, GAPDH eta RPS13 *housekeeping* geneen adierazpena neurtu zen lagin berdinetan, GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenaren balioak lagin berean lortutako barne erreferentziako balio batera normalizatzeko. Bestaldetik, esperimenteren arteko aldakortasuna kontrolatzeko, esperimenteru guztietan erreferentziako lagin beraren gene-adierazpena neurtu zen. Erreferentziako lagin honen gene-adierazpena balio individual bakoitzaren bigarren normalizazio bat egiteko erabili zen. Klozapina kohortean kasuan, alde batetik, GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenaren balioak normalizatzeko, GAPDH eta RPS13 *Housekeeping* geneen adierazpenaren balioetara erreferentziatu ziren. Bestaldetik, CLO⁺ eta CLO⁻ subjektuen GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenaren balio normalizatuak CLO⁺ subjektuen batez besteko GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenaren balio normalizatueta erreferentziatu ziren. Fast SYBRTM Green Master Mix (Thermo Fisher) erabili zen GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpena neurtzeko. TaqManTM Fast Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher) erabili zen GAPDH eta RPS13ren gene-adierazpena neurtzeko. qPCRa erabilitako GRM2ra zuzendutako hasleekin NCBIko Gene datu basean erregistratutako GRM2ren NM_000839.5 (mGluR2ren isoforma luzeena eta kanonikoaren kodeatzailea) eta NM_001349117.2 (mGluR2ren isoforma motzago baten kodeatzailea) transkripzio barianteak amplifikatu ziren. Ensembl datu baseko GRM2ren ENST00000442933.2 (mGluR2ren beste isoforma motzago baten kodeatzailea) eta ENST00000296479.9 (*Stop* kodoi goiztiar bat daukan transkripzio bariantea) ere amplifikatu ziren. Hau da, GRM2ra zuzendutako hasleekin lehen aipatutako 4 transkripzio barianteak amplifikatu ziren. GRM3ra zuzendutako hasleekin NCBIko Gene datu baseko GRM3ren NM_000840.3 (mGluR3ren isoforma luzeena eta kanonikoaren kodeatzailea) transkripzio bariantea amplifikatu zen (1B. irudia). Kontrolen eta AP⁺ edo AP⁻ subjektu eskizofrenikoen artean, baita CLO⁺ eta CLO⁻ subjektuen artean ere, GRM2 eta GRM3ren batez besteko gene-adierazpenaren balioetan desberdintasun esanguratsurik dagoenez aztertzeko, bi isatsetako parekatu gabeko t-testa (Welsch-en test) erabili zen. Adinaren eragina GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenean Pearson-en korrelazio-analisiaren bidez ebaluatu zen kontrol-eskizofrenia kohortean. Subjektuen sexuaren eta GRM2 edo GRM3ren gene-adierazpenaren arteko erlazioa Student-en bi isatsetako parekatu gabeko t-testaren (Welsch-en test) bidez aztertu zen kontrol-eskizofrenia kohortean.

3.1. GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpena kontrol eta subjektu eskizofrenikoetan

Ez zen desberdintasun esanguratsurik aurkitu GRM2ren gene-adierazpenean kontrol eta subjektu eskizofrenikoak alderatzean ($p=0,77$, $n=22$, 2A. irudia), ezta AP⁻ subjektu eskizofrenikoak ($p=0,28$, $n=11$, 2A. irudia) ezta AP⁺ subjektu eskizofrenikoak ($p=0,58$, $n=11$, 2A. irudia), beraiei dagozkien kontrolekin alderatzean ere. GRM3ren gene-adierazpenean ez zen desberdintasun esanguratsurik aurkitu kontrol eta subjektu eskizofrenikoak alderatzean ($p=0,84$, $n=21$, 2B. irudia) ezta AP⁺ subjektu eskizofrenikoak beraiei dagozkien kontrolekin alderatzean ere ($p=0,45$, $n=11$, 2B. irudia). Hala ere, GRM3ren gene-adierazpenaren gorakada sotil bat ikusi zen AP⁻ subjektu eskizofrenikoetan haiekin parekatutako kontrolekin alderatzean, baina ez zen esanguratsua ($\Delta=44\%$, $p=0,11$, $n=10$, 2B. irudia).

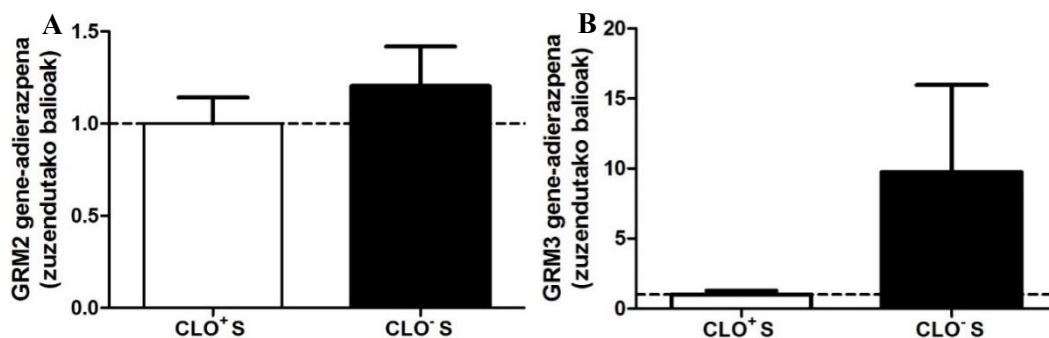
2. irudia. (A) GRM2ren zuzendutako gene-adierazpenaren balioak kontrolen (barra beltzak) eta subjektu eskizofrenikoen (barra gorriak) kortex aurrefrontalean. Subjektu eskizofreniko (S, n=22) eta kontrol (K, n=22) totalak. APrik gabeko subjektu eskizofrenikoak (AP⁻ S, n=11) eta dagozkien kontrolak (n=11). Apekin tratatutako subjektu eskizofrenikoak (AP⁺ S, n=11) eta dagozkien kontrolak (n=11). **(B) GRM3ren zuzendutako gene-adierazpenaren balioak kontrolen (barra beltzak) eta subjektu eskizofrenikoen (barra gorriak) kortex aurrefrontalean.** Subjektu eskizofreniko (S, n=21) eta kontrol (K, n=21) totalak. APrik gabeko subjektu eskizofrenikoak (AP⁻ S, n=10) eta dagozkien kontrolak (n=10). Apekin tratatutako subjektu eskizofrenikoak (AP⁺ S, n=11) eta dagozkien kontrolak (n=11). Emaitzak batez besteko balioa ± SEM gisa erakusten dira.



3.2. GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpena klozapinarekin tratatutako eta klozapinaz beste antipsikotikoekin tratatutako subjektu eskizofrenikoetan

GRM2ren gene-adierazpenean ez zen desberdintasun esanguratsurik aurkitu CLO⁺ subjektu eskizofrenikoak eta CLO⁻ subjektu eskizofrenikoak alderatzean (Δ =%20, $p=0,44$, $n=12$ 3A. irudia). GRM3ren gene-adierazpenean ez zen desberdintasun esanguratsurik aurkitu CLO⁺ subjektu eskizofrenikoak eta CLO⁻ subjektu eskizofrenikoak alderatzean (Δ =%874, $p=0,19$, $n=12$, 3B. irudia).

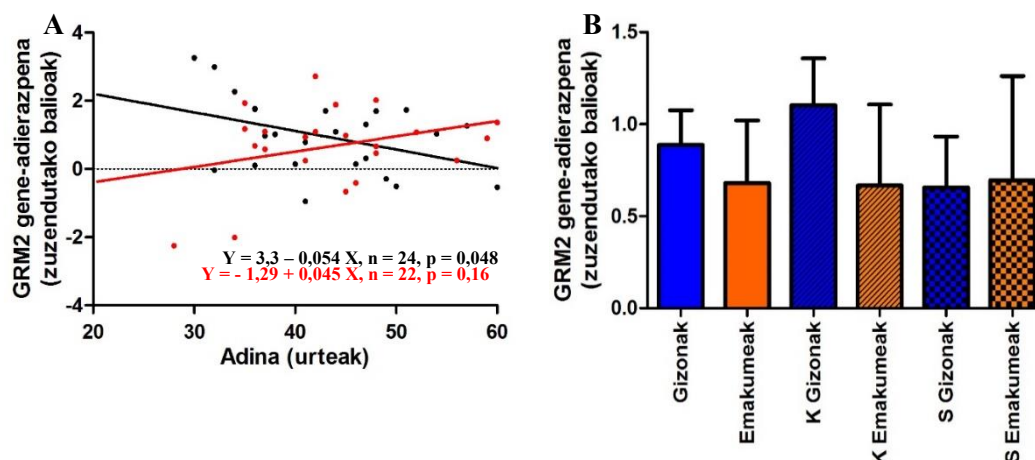
3. irudia. CLOrekin tratatu gabeko subjektu eskizofrenikoen (CLO⁻ S, n=12) eta CLOrekin tratatutako subjektu eskizofrenikoen (CLO⁺ S, n=12) GRM2 (A) edo GRM3ren (B) gene-adierazpena. Emaitzak batez besteko balioa ± SEM gisa erakusten dira.



3.3. Adinaren eta sexuaren eraginaren azterketa

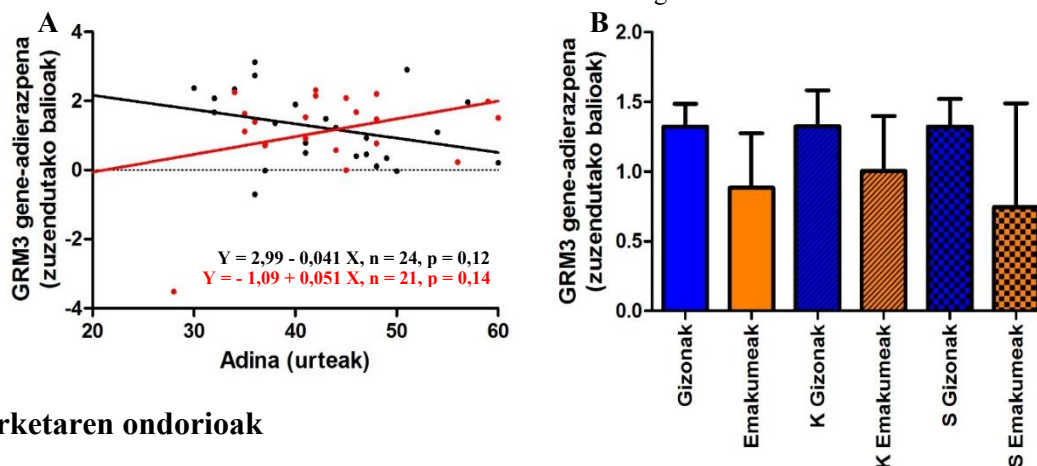
Erregresio linealaren analisisia GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenaren eta adinaren artean egin zen kontrol-eskizofrenia kohortearen kontroletan eta subjektu eskizofrenikoetan. GRM2ren gene-adierazpenari dagokionez, GRM2ren gene-adierazpenaren eta adinaren arteko korrelazio negatibo esanguratsua ikusi zen kontroletan ($p=0,048$, $n=24$, Pearson-en $r=-0,41$, 4A. irudia), baina ez subjektu eskizofrenikoetan ($p=0,16$, $n=22$, $r=0,31$, 4A. irudia). GRM2ren gene-adierazpenean ez zen desberdintasun esanguratsurik aurkitu gizon eta emakumeen artean ($p=0,6$, gizonak $n=31$, emakumeak $n=15$, 4B. irudia), ezta diagnostikoaren arabera banatu zirenean.

4. irudia. Adinaren (A) eta sexuaren (B) eraginaren azterketa GRM2ren zuzendutako gene-adierazpenean kontrol-eskizofrenia kohortean. Kontrolak (n=24) beltzez eta subjektu eskizofrenikoak (n=22) gorritz irudikatzen dira. Gizonak (n=31), kontrol gizonak (n=16) eta gizon eskizofrenikoak (n=15) urdinez irudikatzen dira. Emakumeak (n=15), kontrol emakumeak (n=8) eta emakume eskizofrenikoak (n=7) laranja-jantzi irudikatzen dira. Emaitzak batez besteko balioa \pm SEM gisa erakusten dira.



GRM3ren gene-adierazpenaren eta adinaren artean ez zen korrelazio esanguratsurik aurkitu kontroletan ($p=0,12, n=24, r=-0,32, 5A. irudia$) ezta subjektu eskizofrenikoetan ($p=0,14, n=21, r=0,34, 5A. irudia$) ere. GRM3ren gene-adierazpenean ez zen desberdintasun esanguratsurik aurkitu gizon eta emakumeen artean ($p=0,31, gizonak n=30, emakumeak n=15, 5B. irudia$), ezta diagnostikoaren arabera banatu zirenean.

5. irudia. Adinaren (A) eta sexuaren (B) eraginaren azterketa GRM3ren zuzendutako gene-adierazpenean kontrol-eskizofrenia kohortean. Kontrolak (n=24) beltzez eta subjektu eskizofrenikoak (n=21) gorritz irudikatzen dira. Gizonak (n=30), kontrol gizonak (n=16) eta gizon eskizofrenikoak (n=14) urdinez irudikatzen dira. Emakumeak (n=15), kontrol emakumeak (n=8) eta emakume eskizofrenikoak (n=7) laranja-jantzi irudikatzen dira. Emaitzak batez besteko balioa \pm SEM gisa erakusten dira.



4. Ikerketaren ondorioak

Postmortem garuneko kortex aurrefrontaleko GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenean ez zen desberdintasun estatistikoki esanguratsurik aurkitu subjektu eskizofrenikoetan kontrol subjektuekin konparatuz. Horrez gain, AP^+ eta AP^- subjektu eskizofrenikoak dagozkien kontrolekin alderatzean ez zen lagin berberetan behatutako mGluR2 eta mGluR3 proteinen murrizketa (De la Cuesta-Barrutia, argitaratu gabe) azalduko lukeen gene-adierazpenaren murrizketarik behatu. Proteinen eta mRNA-en mailen emaitza kontrajarriak beste mekanismo batzuek eraginda izan daitezke, hala nola mikro RNAak edo proteinen degradazio azeleratua. RNA kortex aurrefrontalaren materia griseko laginetako sometatik erauzi zen. Beraz, ikerketa honetan aurkeztutako GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenaren datuek kortex aurrefrontaleko zelula neuronal eta gorputz glialetako adierazpena islatuko lukete, baina ez lukete islatuko proteina presinaptikoen transkripzio-erregulazioa soma kokapen desberdina duten proiektzio neuronaletan. Erradioligandoen lotura eta immunoblotting ikasketak mGluR2/3 proteina-maila totalak

(populazio presinaptikoak zein postsinaptikoak) neurtzeko gai dira. Orduan, baliteke lagin berberetan behatutako mGluR2/3ren dentsitatearen murrizketa kortex aurrefrontalerainoko proiektzio neuronalen (adibidez, talamokortikalekoak) mGluR2/3 proteina presinaptikoen murrizketak eraginda izatea. Bestalde, kontuan hartu behar da AP⁻ subjektuek lehenago antipsikotikoak hartu ahal izan dituztela, toxikologiak substantzia ezberdinen kontsumo-maila denbora tarte jakin batean bakarrik jakiteko aukera ematen digulako. Desberdintasunek subjektu eskizofrenikoen tratamenduetan emaitza desberdinak eragin ahal izan dituzte GRM2 eta GRM3ren gene-adierazpenean aurretiko lanekin konparatuz.

GRM2 edo GRM3ren gene-adierazpenean ez zen desberdintasun estatistikorik aurkitu CLO⁺ eta CLO⁻ subjektu eskizofrenikoen artean. Emaidza hauek ez dute babesten CLO⁺ edo beste APEk GRM2ren gene-adierazpena modu bereizgarrian modulatzeko hipotesia. Hala ere, nahiz eta esanguratsua ez izan, GRM3ren gene-adierazpenaren murrizketa bat ikusi zen CLO⁺ subjektuetan, CLO⁻ subjektuekin konparatuz. Izan ere, aldakortasun handia ikusi zen CLO⁻ taldearen subjektuen artean, GRM3ri dagokionez. Aldakortasun honi aurre egiteko, CLOren eragina GRM2 eta GRM3 geneen adierazpenean aztertuko duten hurrengo esperimentuetan taldeen subjektu kopurua handitu ahal da.

GRM2ren gene-adierazpenaren eta adinaren arteko korrelazio negatibo esanguratsua ikusi da kontroletan, baina ez subjektu eskizofrenikoetan. Emaidza hauek eskizofrenian, adinaren araberrako GRM2ren gene-adierazpenaren erregulazioa aberrantea izan daitekeela iradokitzen dute.

5. Etorkizunerako norabidea

mGluR2 eta mGluR3ren mRNA eta proteinen adierazpenari buruzko hainbat galdera oraindik argitu behar dira. Esate baterako, mGluR2 proteinaren beheranzko erregulazioa GRM2ren transkripzio murrizketaren bidez gertatzen ez bada, murrizketa hori eragiten duten mekanismo zehatzak identifikatu behar dira. Kontrol (epi)genetikoaren eta proteinaren adierazpenaren arteko erlazioa desitxuratu duen faktoreen bat egon liteke. Proteinaren degradazio prozesuak azeleratuak egotea proteinaren adierazpenean ikusitako murrizketaren arrazoi bat izan daiteke. Horrez gain, disoziazio hori itzulpena erregulatzen duten mikro RNAen bitartez ere gerta liteke. Eskizofrenian GRM2ren jaitsiera mikro RNAen desarautze batek eragiten duen argitzeak interes handia izan lezake. Bestalde, mGluR2 eta mGluR3rako ligando selektiboak aurkitzea funtsezkoa izango litzateke hartzaile bakoitzaren dentsitatea modu ezberdinean neurtzeko erradioligandoen finkapen-saioetan.

6. Erreferentziak

- de la Cuesta-Barrutia, J. (argitaratu gabe). Evaluation of GPCR receptor complexes in mental disorders: potential novel therapeutic targets. Doctoral thesis. Department of Pharmacology, UPV/EHU.
- de Oliveira-Souza, R., Marrocos, R. P., & Moll, J. (2007). The dementias of schizophrenia. *Dementia & neuropsychologia*, 1(2), 124–130.
- Dong, R., Yuan, L., Yang, Y., Du, X.D., Jia, Q., Dillon, B.A., Yu, L., & Zhang, X.Y. (2020). Differential effects of different antipsychotic drugs on cognitive function in patients with chronic schizophrenia. *Human psychopharmacology*, 35(6), 1-8.
- Ginovart, N., & Kapur, S. (2012). Role of dopamine D(2) receptors for antipsychotic activity. *Handbook experimental pharmacology*, 212, 27-52.
- Green, M. F., Horan, W. P., & Lee, J. (2019). Nonsocial and social cognition in schizophrenia: current evidence and future directions. *World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, 18(2), 146–161.
- Harrison, P. J., Lyon, L., Sartorius, L. J., Burnet, P. W., & Lane, T. A. (2008). The group II metabotropic glutamate receptor 3 (mGluR3, mGlu3, GRM3): expression, function and involvement in schizophrenia. *Journal of psychopharmacology*, 22(3), 308-322.
- Howes, O., McCutcheon, R., & Stone, J. (2015). Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 29(2), 97–115.
- Hsu, B., Sherina, V., & McCall, M.N. (2021). Autoregressive modeling and diagnostics for qPCR amplification. *Bioinformatics*, 36(22-23), 5386-5391.

- Ibi, D., de la Fuente Revenga, M., Kezunovic, N., Muguruza, C., Saunders, J. M., Gaitonde, S. A., Moreno, J. L., Ijaz, M. K., Santosh, V., Kozlenkov, A., Holloway, T., Seto, J., García-Bea, A., Kurita, M., Mosley, G. E., Jiang, Y., Christoffel, D. J., Callado, L. F., Russo, S. J., Dracheva, S., ... Callado, L. F., Russo, S. J., Dracheva, S., ... González-Maeso, J. (2017). Antipsychotic-induced Hdac2 transcription via NF-κB leads to synaptic and cognitive side effects. *Nature neuroscience*, 20(9), 1247–1259
- Kinon, B. J., Millen, B. A., Zhang, L., & McKinzie, D. L. (2015). Exploratory analysis for a targeted patient population responsive to the metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist pomaglumedad methionil in schizophrenia. *Biological psychiatry*, 78(11), 754-762.
- Kurita, M., Holloway, T., García-Bea, A., Kozlenkov, A., Friedman, A. K., Moreno, J. L., Heshmati, M., Golden, S. A., Kennedy, P. J., Takahashi, N., Dietz, D. M., Mucci, G., Gabilondo, A. M., Hanks, J., Umali, A., Callado, L. F., Gallitano, A. L., Neve, R. L., Shen, L., Buxbaum, J. D., ... González-Maeso, J. (2012). HDAC2 regulates atypical antipsychotic responses through the modulation of mGlu2 promoter activity. *Nature neuroscience*, 15(9), 1245–1254
- Lally, J., & MacCabe, J.H. (2015). Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *British medical bulletin*, 114(1), 169-179.
- Lyon, L., Kew, J. N., Corti, C., Harrison, P. J., & Burnet, P. W. (2008). Altered hippocampal expression of glutamate receptors and transporters in GRM2 and GRM3 knockout mice. *Synapse (New York, N.Y.)*, 62(11), 842–850.
- Maksymetz, J., Moran, S. P., & Conn, P. J. (2017). Targeting metabotropic glutamate receptors for novel treatments of schizophrenia. *Molecular brain*, 10(1), 15.
- Marder, S. R., & Cannon, T. D. (2019). Schizophrenia. *The New England journal of medicine*, 381(18), 1753-1761.
- Marek, G. J., Behl, B., Bernal, A. Y., Gross, G., Lee, Y., & Schoemaker, H. (2010). Glutamatergic (N-methyl-D-aspartate receptor) hypofrontality in schizophrenia: too little juice or a miswired brain? *Molecular pharmacology*, 77(3), 317-326.
- Marek, G. J. (2015). When is a Proof-of-Concept (POC) not a POC? Pomaglumedad (LY2140023) as a Case Study for Antipsychotic Efficacy. *Current pharmacological design*, 21(26), 3788-3796.
- Miranda, P. (2014). Biochemistry, function and pharmacology of serotonin 5-HT2A and group II metabotropic glutamate receptors in postmortem human brain. Interest for psychosis. Doctoral thesis. Department of Pharmacology, UPV/EHU
- Noetzel, M. J., Jones, C. K., & Conn, P. J. (2012). Emerging approaches for treatment of schizophrenia: modulation of glutamatergic signaling. *Discovery medicine*, 14(78), 335–343.
- Owen, M. J., Sawa, A., & Mortensen, P. B. (2016). Schizophrenia. *Lancet*. 388(10039), 86-97.
- Stauffer, V. L., Millen, B. A., Andersen, S., Kinon, B. J., Lagrandeur, L., Lindenmayer, J. P., & Gomez, J. C. (2013). Pomaglumedad methionil: no significant difference as an adjunctive treatment for patients with prominent negative symptoms of schizophrenia compared to placebo. *Schizophrenia research*, 150(2-3), 434-441.
- Uno, Y., & Coyle, J. T. (2019). Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 73(5), 204-215.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2004). *Molecular Biology of the Gene* (5. ed.). Benjamin Cummings, San Francisco.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa lan hau Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Farmakologia Sailean, Guadalupe Rivero eta Alfredo Ramos-en zuzendaritzapean, egindako Master Amaierako Lan baten parte izan da. Lan honek MCIU/AEI/FEDER-en (RTI2018-094414-A-I00) eta Eusko Jaurlaritzaren (IT211/19, IT1512/22) diru-laguntzak jaso zituen.