



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a  
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### OSASUN ZIENTZIAK

**Giza garun postmortemeko nukleo  
neuronalen eta ez-neuronalen  
banaketa**

*Oihane Martinez-Peula,  
Alfredo Ramos Miguel,  
Benito Morentin, Luis Felipe Callado,  
José Javier Meana eta  
Guadalupe Rivero*

69-75 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.08>



## Giza garun postmortemeko nukleo neuronalen eta ez-neuronalen banaketa

Martinez-Peula, O.<sup>1</sup>, Ramos, A.<sup>1,2</sup>, Morentin, B.<sup>4</sup>, Callado, L.F.<sup>1,2,3</sup>,  
Meana, J.J.<sup>1,2,3</sup>, Rivero, G.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Farmakologia saila, Medikuntza eta Erizaintza fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Espainia,* <sup>2</sup>*CIBERSAM (Centro de investigación Biomédica en red de Salud Mental), Espainia,* <sup>3</sup>*Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketa Institutua, Barakaldo, Espainia,* <sup>4</sup>*Auzitegiko Euskal Medikuntzako Institutua, Bilbo, Espainia*  
*oihane.martinez@ehu.eus*

### Laburpena

Zelulen banaketa teknikak gaixotasun ezberdinen diagnostikoan eta pronostikoan maiz erabiltzen dira. Ikerkuntza arloan, teknika hauek ere mekanismo zelular ezberdinak ulertzeko erabilgarriak izan daitezke. Fluoreszentsia bidez aktibatutako zelulen banaketak (FACS) eskaintzen dituen abantailak direla eta, gaixotasun neuroendekaitzaileen eta psikiatrikoen etiopatogenia ulertzeko tresna bezala postulatu da. Ikerketa honetan, izoztutako giza garun postmortemeko laginetatik nukleo neuronal eta ez-neuronalak FACSen bidez banatzea lortu da. Protokolo honi esker, nerbio sistema zentralean zelula mota bakoitzean espezifikoki ematen diren erregulazio mekanismoak aztertzeari atea ireki zaio.

Hitz gakoak: zelula banaketa teknikak, fluoreszentsia bidez aktibatutako zelulen banaketa (FACS), giza garun postmortema

### Abstract

*Cell separation techniques are usually performed for the diagnosis and prognosis of different diseases. In research, these techniques could be useful for understanding specific cellular mechanisms. Because of its advantages, fluorescence activating cell sorting (FACS) has been proposed to study the ethiopathology of neurodegenerative and psychiatric diseases. In this work, neuronal and non-neuronal nuclei from frozen human postmortem brain tissue samples have been separated by FACS. This protocol has opened the door to study the regulatory mechanisms that are specifically performed by each cell type in the central nervous system.*

Key words: cell separation techniques, fluorescence activating cell sorting (FACS), human postmortem brain

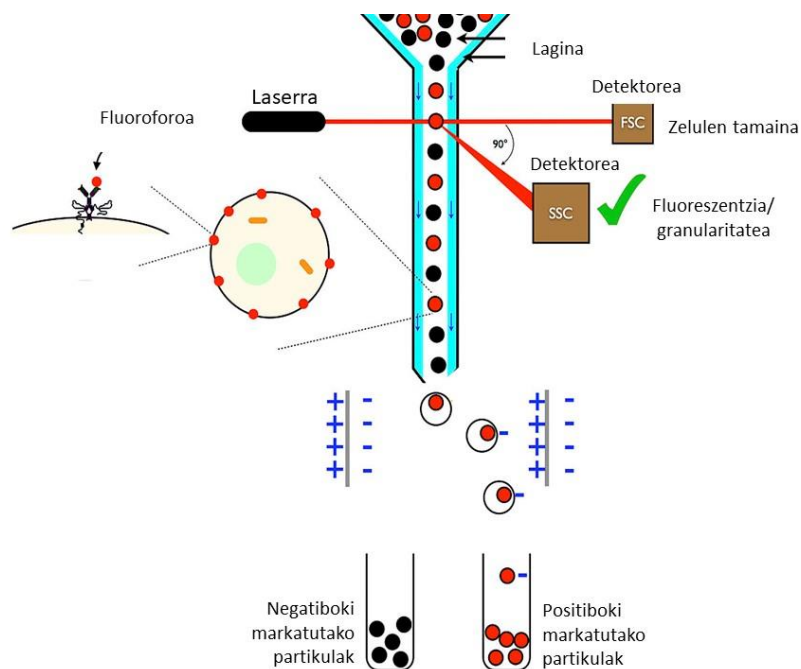
### 1. Sarrera

Zelulen banaketarako metodologiek biologia zelularrean, immunologian, zelula amen eta minbiziaren inguruko ikerkuntzan berebiziko garrantzia dute. Beraiei esker, minbizia eta giza immunoeskasiaren birusaren (GIB) pronostikoa, hezur-muin transplante autologoak eta mikroorganismo patogenikoen isolamendu eta detekzioa ahalbidetzen da. Zelula populazio ezberdinak banatzen hasi zirenean, zelulen dentsitatea, tamaina eta formaren arabera banatzen ziren. Horretarako teknika ohikoenak mikroiragazketak, ultrairagazketak eta ultrazentrifugazioak ziren, baina hauek espezifikotasun baxua eskaintzen zuten. Azken hamarkadetan, zelulen banaketarako teknologien inguruan aurrerakuntza handiak egin dira, eta hain oparo ez diren edota bereziak diren populazioak eraginkortasun eta purutasun gehiagorekin sailkatzea lortu da. Zelula bereziak karakterizatzeak gaixotasunen diagnostikoan eta pronostikoan ez ezik zelula horien barnean ematen diren erregulazio mekanismoak ulertzen ere laguntzen du. Hau da, zelula normal bat nola bihurtzen den patogeniko azal dezake. Gainera, gaixotasunen patogenia ondo ulertzeko, prozesu zelularrak zelularen maila ezberdinetan (nukleoan, zitoplasman, etab) ikertu behar dira (Bayer & Jungbauer, 2007).

Prozesu biokimiko edo zelularrak ikertzeko erabiltzen diren teknikak banatutako zelula populazioetan modu arrakastatsuan aplikatu ahal izateko, banaketa prozesua espezifikoa izateaz gain, zelulen integritatea babestu behar du. Banaketa prozesuaren ostean esperimendu mota bakoitza burutzeko behar den zelula kopurua ere faktore garrantzitsu bat da. Horrekin batera, zenbat denbora behar den zelula kopuru hori banatzeko ere kontuan hartu behar da. Denbora optimizatzeke eta kaltea murrizteko,

banaketa tekniken bidez prozesatuko diren laginen purutasuna ere egokia izan behar da. Horretarako, banaketa prozesua hasi baino lehen, laginen prozesamendua eraginkorra izatea garrantzitsua da (Valihrach, Androvic, & Kubista, 2018).

Banaketa teknikei dagokionez, irizpide fisikoetan oinarritzen diren teknikak eta afinitatean oinarritzen diren teknikak daude. Afinitateaz baliatzen diren tekniketan, antigenu ezberdinen kontrako antigorputzak erabiltzen dituzte intereseko populazioa detektatzeko. Azken multzo honen barruan sartzen den eta gorabidean dagoen teknika bat, fluoreszentzia bidez aktibatutako zelula banaketa (FACS) da. FACS teknika fluxu zitometriari oinarritzen da. Fluxu zitometriari lagin heterogeneo batetik zelulak beraien morfologia tamaina eta granularitateagatik ezberdintzen dira, hau da, zitometroak partikula bakoitzaren ezaugarriak ezagutzen ditu eta deskripzio bat ematen du. Horrez gain, partikulak fluoroforoekin markatuta badaude, igortzen duten fluoreszentiaren intentsitatearen arabera ere sailkatzen ditu. FACS teknikan, zelularen ezaugarri fisikoen eta igortzen duten fluoreszentiaren arabera zelulak analizatzeaz gain, ere banatzen dira (Bayer & Jungbauer, 2007) (1. irudia) FACS bidez zelulak sailkatu ahal izateko, fluxu zitometriari bezala, zelulak suspentsio batean egon behar dira. Horrek FACS odol laginen analisirako teknika ezin hobea bihurtzen du. Gainera, FACSaren bidez zelula kopuru altua banatzen da, zelulen integritatea mantentzen delarik (Herzenberg et al., 2002).



**1. irudia. Fluoreszentzia bidez aktibatutako zelulen banaketa (FACS) teknika eta tresnak.** Suspentsio batean dagoen lagina zitometrotik pasatzean, detektoreek laginaren partikula bakoitza bere granularitateagatik (SSC) eta tamainagatik (FSC) ezberdintzen dute. Azkenik, laginetan gehitutako fluoroforoaren seinalearen arabera sailkatzen dira (“Cell sorting - Wikipedia”, Creative Commons lizentziarekin argitaratutakoaren aldaketa).

Gaur egun, FACSak asaldura hematologikoen sailkapenean eta diagnostikoan gero eta gehiago erabiltzen ari da, baita mentuen kalitatearen ebaluazioan. Izan ere, zelula mota ezberdinak beraien morfologiagatik erraz ezberdindu daitezke eta ondorioz, banaketa prozesua errazago eta eraginkorragoa da. Behin zelula mota bakoitza morfologiagatik sailkatuta, egoera patologiko batean espresatzen diren gainazaleko proteinetan oinarrituta banaketa egin daiteke (Bayer & Jungbauer, 2007). Azken urteetan, FACS teknika arlo ezberdinetan erabilia izan da, hala nola, onkologian, immunologian, transplanteetan, eta genetikan. FACSaren erabilera ezberdin hauek, beste arloetara ere zabaldu dira, honen adibide bat neurobiologia delarik (Bayer & Jungbauer, 2007; Herzenberg et al., 2002; Martin, Xu, Porretta, & Nichols, 2017).

Nerbio sistema zentrala (NSZ) beraien artean konektatuta dauden zelula populazio heterogeneoaz osatuta dago. Zelula populazio hauek beraien morfologia, aktibitate fisiologiko eta beraien nortasun molekularragatik ezberdintzen dira. Nagusiki, NSZko zelulak bi multzo nagusitan banatzen dira: zelula neuronal eta zelula glialen artean (Miller & Gauthier, 2007). Neurona garunaren unitate basikoa da, eta

bere funtzio nagusia mezularia izatea da. Informazio transmititzeko nerbio bulkadak eta seinale kimikoak erabiltzen dituzte. Neuronan bat hiru atalez osatuta dago: axoia, dendritak eta gorputza edo soma. Neuronen nukleoan, beste zeluletan bezala, material genetikoa dago. Soman dendritak hedatzen dira eta beste neuronek bidalitako mezuak jasotzeko arduradunak dira. Axoiak zelulatik mezuak transmititzen ditu. Horrela, mezua garunaren area ezberdinetara bidaliko da edo garunetik beste NSZko aldeetara helduko da (Purves et al., 2008).

Zelula glialak ez dira neuronak bezala, neuronak baino txikiagoak dira eta ez dute dendritarik ezta axoirik. Zelula glialen artean, beraien morfologia eta funtzioagatik astrozitoak, mikroglia eta oligodendrozitoak bereizten dira. Astrozitoen presentzia NSZ osotik hedatzen da, hau da, ez dago alderik astrozitorik gabe. Astrozitoek ez dute mezulari funtzioa baina sinapsi neuronalentzako ezinbestekoak diren faktoreak kontrolatzen dituzte, esaterako, sinapsietan eragin dezaketen hazkuntza-faktoreak askatuz (Sofroniew & Vinters, 2010). Oligodendrozitoak ere NSZera mugatzen diren zelulak dira. Mota honetako zelulek mielinizazio prozesuan parte hartzen dute eta neuronen axoiatzat beharrezkoak diren faktoreak eskaintzen dituzte (Tiane et al., 2019). Mikroglia gliaren %10-20 osatzen duten tamaina txikiko zelula glialak dira, eta beraien jatorria zelula-ama hematopoietikoetatik dator (Hammond, Robinton, & Stevens, 2018). Hori dela eta, makrofagoekin ezaugarri asko partekatzen dituzte. Mikroglia garunaren garapena erregulatzen du. Fagozitosiaren bitartez, mikroglia sinapsietan parte hartzen duten elementuak, garun hondakinak, bizirik edo hilda dauden zelulak, axoiak, etab. suntsitzen ditu. Mikroglia ere mielinizazio eta neurogenesia bezalako prozesuak eragiten ditu, eta zelulen heriotzan eta biziraupenean parte hartzen du (Lenz & Nelson, 2018).

Zelula mota ezberdin hauen funtzio eta gaixotasunen arteko erlazioa ezagutzea ikerketa gai nagusia izan da. Baina, gehienetan ikerketa horiek neuronetan zentratu dira, zelula glialak neuronen sostengu funtzioa soilik zutela pentsatzen zelakoan. Azken urteetan, zientzialariak patogenia heterogeneoa duten gaixotasun psikiatriko eta neuroendekatzailatan neuronen paperaz gain, beste NSZko zelulen rola ere ikasten hasi dira. Mikroglia paper babesgarria zein toxikoa Parkinsonen gaixotasunean, esklerosi anizkoitzean eta Alzheimerren gaixotasunean ikasi da. Gaixotasun neuroendekatzaila hauetan, neuronen inguruan mikroglia pilaketak ikusi dira eta mikroglia aska ditzakeen faktoreen eragina aztertzen ari da (Mizuno, 2015). Gainera, neuronen eta mikroglia arteko elkarrekintzak neuroinflamazioaren oinarri dira, eskizofrenia eta autismo bezalako asalduretan (Liao, Yang, Wang, & Li, 2020; Marques et al., 2019). NSZa konektatuta dauden zelula mota ezberdinez osatuta dago, eta bakoitzaren papera ulertzeko zelula mota bakoitzaren ezaugarriak ezagutzea ezinbestekoa da. Zelula banaketa teknikak neuronen eta zelula glialen arteko elkarrekintza ulertzea erraz dezakete.

Duela 30 urte baino gehiago, zelula barneko markatzaileei esker arratoiaren neurona populazio bat banandu zen (Paden, Berglund, Hapner, & Welsh, 1986). Hala ere, momentu puntual horretatik aurrera fluxu zitometria neurozientziaren arlotik at gelditu izan da (Martin et al., 2017). Izan ere, garun-ehunean zelulak banatzean hainbat zailtasun aurki daitezke. Zelula-zelula arteko loturen gogortasuna dela eta, banaketa prozesua zelulei kalterik egin gabe burutzea zaila da. Nahiz eta zelulak banatzea lortu, zelulak FACS prozedurara bizirauteko posibilitate baxuak daude. Bestalde, populazio neuronalak beste tekniken bidez ere identifikatu daitezke, adibidez, immunohistokimikaren bitartez. Gainera, immunohistokimikan erabil daitezkeen markatzaile zelular espezifiko ugari eskura daude (Okada et al., 2011).

Geneen adierazpena eta erlazionatuta dauden mekanismo epigenetikoak ulertzeko erabiltzen diren teknikak, interpretaziorako zailak diren emaitzak aurkezten dituzte. Izan ere, teknika gehienak ehunen homogeneizatueta burutzen dira, non zelula mota ezberdintzen ez den. Baina, NSZko zelulen nukleotan markatzaile espezifikoak bereiz daitezke eta hauei esker, zientzialari batzuek zelula mota ezberdinetako nukleoak banatzea lortu dute (Dincer et al., 2015; Halene et al., 2016).

## 2. Helburuak

Neuropsikofarmakologiako ikerkuntza taldeak, giza garun postmortemeko lagin sorta kudeatzen du. Giza garun postmortemeko laginak Auzitegiko Euskal Medikuntzako Institutuan burutzen diren autopsien bitartez lortzen dira. Heriotza-mekanismoa istripua, hilketa eta suizidioa izaten da gehienetan.

Hau dela eta, garun sorta honetan asaldura psikiatrikoak zeuzkaten pazienteenak daude. Taldean, gaixotasun psikiatriko ezberdinen etiopatogenia eta mekanismo farmakologikoak ikasten dira. Gaixotasun psikiatrikoetan gerta daitezkeen asaldurak eta tratamendu psikofarmakologikoen modulazioa ulertzeko, zelula barnean ematen diren mekanismo erregulatzailerak eta geneen adierazpena ezagutu behar da. Zelula neuronalen eta ez-neuronalak ezberdintzeak garun-gaixotasunen inguruko etiopatogenia ulertzen lagunduko luke. Tamalez, arestian azaldu den bezala NSZko zelulen banaketa eta isolatzea teknikoki zaila da. Beraz, NSZko zelula neuronal eta ez-neuronalen mekanismoak ulertzeko nukleo zelularren banaketa burutu da.

Proiektu honen helburu nagusia giza garun postmortemeko nukleo neuronalen eta ez-neuronalen banaketa eta karakterizazioerako protokolo bat diseinatzea da. Helburu nagusia hori izanda, hurrengo bigarren mailako helburuak definitu dira:

- 1) Izoztutako (-80°C-tan) garun laginetatik nukleoak banatzea, eta purifikatzea laginaren eduki nuklearra kaltetu baino lehen.
- 2) Markatzaileen bitartez, isolatutako nukleo neuronalak modu eraginkorrean eta espezifikoan markatzea.
- 3) FACS teknikaren bitartez, isolatutako nukleoei egindako markajeari esker, nukleo neuronalak eta ez-neuronalak banatzea. Banatze prozesu honetan, ahalik eta nukleo kopuru gehien lortzea, nukleoen ezaugarriak kaltetzen ez direlarik.

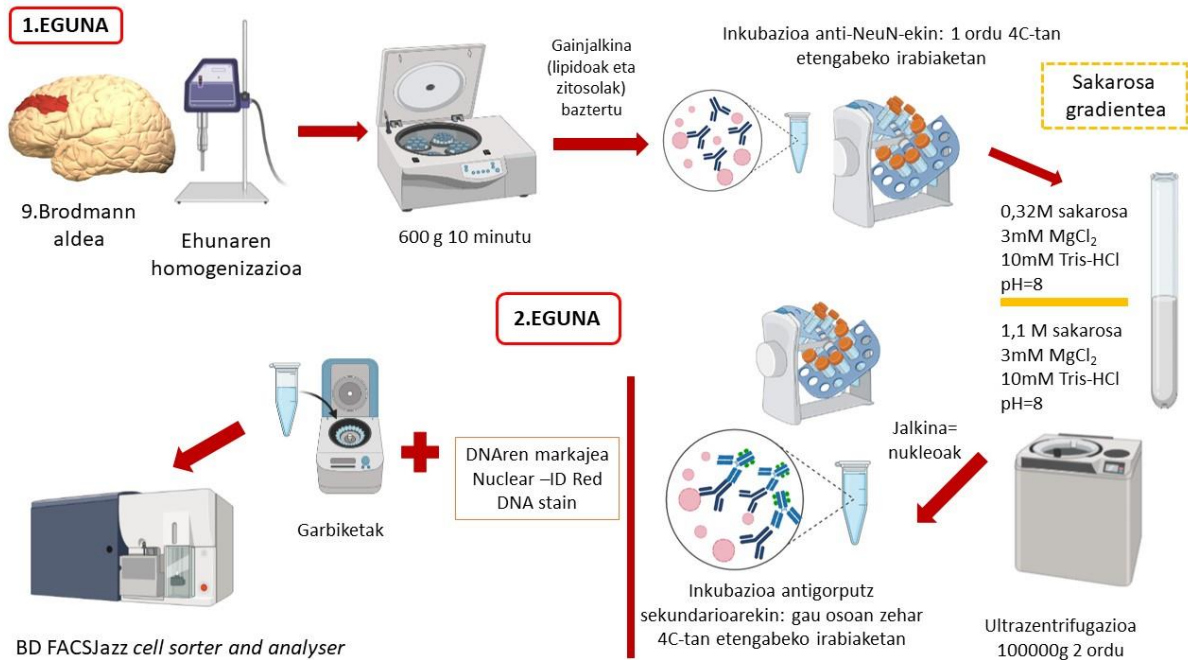
### 3. Ikerketaren muina

Ikerketa honetarako, giza garun postmortemaren kortex prefrontala aukeratu zen. Garuneko alde hau prozesu kognitiboetan paper garrantzitsua jokatzear gain, kortex prefrontalaren desoreka hainbat gaixotasun psikiatriko eta neurologikoetan behatu da, hala nola, antsietatean, depresioan, eskizofrenian eta Parkinsonen gaixotasunean (Xu, Chen, Li, Xing, & Lu, 2019).

Garun postmortemeko laginetatik nukleoak isolatzeko, laborategian ohituraz erabiltzen den metodoa jarraitzen da. Kortex prefrontalaren alde bat disezionatu ondoren, protokoloaren lehenengo pausua laginak homogenizatzea da eta osagai lipidikoak zein zitosolak zentrifugazio azkar batez kentzea da. Ondoren, mielina zorroak kentzeko eta nukleoak isolatzeko sakarosa gradiente batekin eta ultrazentrifugazio baten bidez, nukleoak hauspeatzen dira. Prozesu honetan nukleoak purifikatzen dira, hala ere, nukleoak ez diren zelula osagaien arrastoak gelditu daitezke. Horiek FACSean ezberdindu ahal izateko eta nukleoak ikusten ari garela baieztatzeko, DNARI lotzen den markatzaile bat gehitzen da, zehazki, Nuclear-ID Red DNA stain (#52406, Enzo Life Sciences) (2. Irudia).

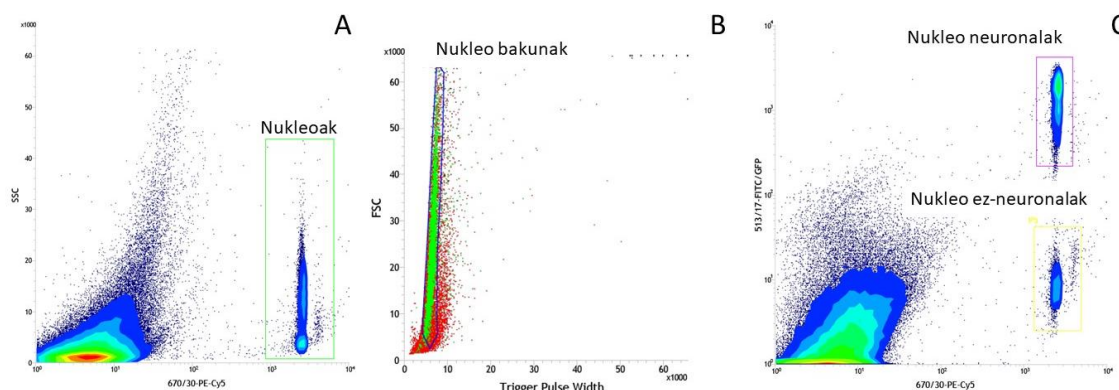
Nukleo ez-neuronalak neuronaletatik ezberdintzeko, zelula barneko markatzaile espezifiko baten kontrako antigorputz bat gehitzea ezinbestekoa da. Kasu honetan, NeuN markatzailea aukeratu zen. NeuN ugaztunen NSZko neurona gehienek nukleoan eta zitoplasman agertzen den proteina da (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015). Immunohistokimika esperimenteren bidez, NeuN proteina bakarrik nerbio sistemako zeluletan agertzen zela ondorioztatu zen. Gainera, NeuN ez da inoiz zelula glialetan detektatu. Proteina hau enbriogenesian sortzen da eta neurona helduetan espresatzen da. NeuN-ari itsasten diren antigorputzek neurona mota gehienak identifikatzen dituzte eta lotura hori, batez ere, markaje nuklearrarekin erlazionatzen da (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015). Metodologia ezberdinetarako, NeuN ezagutzen duten antigorputz primario ezberdinak daude, protokolo honetarako, anti-NeuN, A60 klonak (#MAB377, Merck Millipore) erabili zen eta antigorputz sekundario bezala, primarioari lotzen den Alexa Fluor 488 (#R37114, Invitrogen). Bi antigorputz hauek lotura-leku ez-espezifikoak blokeatzen dituen soluzioan (%1 ahuntz-jatorriko seruma, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl eta 2 mM MgCl<sub>2</sub>) gehitzen dira.

Nukleo neuronalen analisisia Achucarroko FACSean (BD FACSJazz *cell sorter and analyser*) burutzen da. Lehen aipatuenez, FACSaren bidez laginak analizatu ahal izateko, suspentsio batean egon behar dira, horretarako, nukleoen egitura mantentzen zuten eta zitometroarekin bateragarria zen disoluzio bat aukeratu zen. Disoluzio hau, kaltzio, magnesio, eta sodio gatz ezberdinez osatuta dago. Azkenengo pausu bezala, nukleoen suspentsioa diluitzen eta iragazten da.



## 2. irudia. Nukleo neuronalak eta ez-neuronalak banatzeko metodologia.

3. irudian azaltzen den bezala, nukleoak banatu aurretik, intereseko populazioak aukeratu dira (laukien barnean). Karakterizazioarako lehenengo pausua nukleo populazioa zehaztea da, eta horretarako, DNARI lotzen den markatzailearen seinalea aztertzen da (3. irudia, A). Partikulek laserra zeharkatzen dutenean, iragazi arren, agregatu daitezke eta bakarka laserretik pasatu ordez, beste partikulekin batera pasatzea. Fenomeno horri *doublets* edo bikote deritzogu. Hori dela eta, aukeratutako nukleo populaziotik bikoteen seinalea baztertzen da (3. irudia, B). Azkenik, nukleo neuronalak eta ez-neuronalak sailkatzeko (3. irudia, C), NeuN markatzailearen seinalea, nukleoari lotzen den markatzailearen aurrean irudikatzen da. NeuN seinalea positiboa bada, nukleo neuronalak direla ondorioztatuko da. NeuN seinale negatiboa izanda, nukleo horiek ez-neuronalak direla determinatuko da. Karakterizazio honetan nukleo populazio bakoitzeko (nukleo neuronalak eta ez-neuronalak) 600.000 inguruko nukleo kopurua lortu da.



**3. irudia. Nukleo neuronal eta ez-neuronalen karakterizazioa eta sailkapena FACSen bidez.** A: Garun-ehuna prozesatu ondoren lortzen den nukleoaren seinalea. Y ardatzean nukleoaren konplexutasuna (SSC) eta x ardatzean, DNARI lotzen den markatzailearen fluoreszentsia seinalea (PE-Cy5) irudikatzen dira. B: A grafikoa aukeratutako nukleo populazioaren nukleo bakunen aukeraketa, nukleoaren tamaina (y ardatza, FSC) eta seinalearen intentsitatea kontuan izanda. C: B grafikoa aukeratutako nukleo bakunen fluoreszentsia seinalea. X ardatzean DNARI lotzen den markatzailearen seinalea irudikatzen da eta y ardatzean, NeuN-i lotutako fluoroforoaren seinalea.

## 4. Ondorioak

Lan honen bitartez, giza garun postmortemeko laginetan nukleoak isolatzeko eta nukleo neuronalak ez-neuronalatik banatzeko protokolo bat diseinatu da. Alde batetik, izoztutako giza garun postmortemeko laginetatik nukleoak isolatzea lortu da. Nukleo puruak lortu dira, eta nukleoekiko eta neuronekiko

espezifikoak diren markatzaileetara lotu dira. Bestalde, FACS teknikaren bidez bi populazioak (neuronal eta ez-neuronal) modu eraginkor batean banatzea lortu da, beste teknika batzuk burutu ahal izateko nahikoa den nukleo kopurua berreskuratuz. Hurrengo esperimenduetan, geneen adierazpena aztertzen duten qPCR (PCR kuantitatiboa) eta DNA eta RNA sekuentziazio teknikak burutu nahi dira. Metodologia horiei esker, neuronetan espezifikoki ematen diren prozesuak eta mekanismoak ikasi ahal izango dira. Nukleo banaketa esperimenduak, ikerketa taldeak kudeatzen duen asaldura psikiatrikoen kohortetan burutzea planteatzen da, gaixotasun hauen etiopatogenia ezagutzen laguntzeko asmoz.

## 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Banatutako nukleo neuronal eta ez-neuronaletan hainbat teknika ezberdin burutu daitezke. Interesgarrienak epigenetikarekin erlazionatuta daude, kromatina neuronal eta ez-neuronal ikertuz geneen adierazpena modulatzeko duten mekanismoetan sakontzeko.

Nahiz eta FACS teknikaren bidez, nukleo populazioak modu arrakastatsuan banatu, banaketa prozesu honek etorkizunean burutu nahi diren tekniken eraginkortasunean eragin dezake. Adibidez, banaketa prozesua irau duen denbora, banaketa osteko kontserbazioa eta nukleo kopurua beste tekniken optimizaziorako faktore mugatzaileak izan daitezke. Faktore horiek beste teknikekin bateragarriak izateko, banaketa prozesuaren baldintzak optimizatu behar dira. Horretarako, banatutako nukleo beste tekniken bitartez zenbat etekin atera ahal zaien aztertu beharko da. Hortaz, etorkizuneko esperimenduak banaketa prozesuaren optimizazioan eta tekniken eraginkortasuna hobetzean zentratuko dira.

## 6. Erreferentziak

- Bayer, K., & Jungbauer, A. (2007). Advances in biochemical engineering science. In *Journal of Biotechnology*, 132, 97-98
- Cell sorting - Wikipedia. (n.d.). Retrieved March 8, 2021, from [https://en.wikipedia.org/wiki/Cell\\_sorting](https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_sorting)
- Dincer, A., Gavin, D. P., Xu, K., Zhang, B., Dudley, J. T., Schadt, E. E., & Akbarian, S. (2015). Deciphering H3K4me3 broad domains associated with gene-regulatory networks and conserved epigenomic landscapes in the human brain. *Translational Psychiatry*, 5, 1-14
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae*, 7, 42-47.
- Halene, T. B., Kozlenkov, A., Jiang, Y., Mitchell, A. C., Javidfar, B., Dincer, A., ... Akbarian, S. (2016). NeuN+ neuronal nuclei in non-human primate prefrontal cortex and subcortical white matter after clozapine exposure. *Schizophrenia Research*, 170, 235-244.
- Hammond, T. R., Robinton, D., & Stevens, B. (2018). Microglia and the Brain: Complementary Partners in Development and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34, 523-544.
- Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). The history and future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and flow cytometry: A view from Stanford. *Clinical Chemistry*, 48, 1819-1827.
- Lenz, K. M., & Nelson, L. H. (2018). Microglia and beyond: Innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. *Frontiers in Immunology*, 9, 68
- Liao, X., Yang, J., Wang, H., & Li, Y. (2020). Microglia mediated neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 130, 167-176.
- Marques, T. R., Ashok, A. H., Pillinger, T., Veronese, M., Turkheimer, F. E., Dazzan, P., ... Howes, O. D. (2019). Neuroinflammation in schizophrenia: meta-analysis of in vivo microglial imaging studies. *Psychological Medicine*, 49, 2186-2196.
- Martin, D., Xu, J., Porretta, C., & Nichols, C. D. (2017). Neurocytometry: Flow Cytometric Sorting of Specific Neuronal Populations from Human and Rodent Brain. *ACS Chemical Neuroscience*, 8, 356-367.
- Miller, F. D., & Gauthier, A. S. (2007). Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron*, 54, 357-369.

- Mizuno, T. (2015). Neuron-microglia interactions in neuroinflammation. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 6, 225–231.
- Okada, S., Saiwai, H., Kumamaru, H., Kubota, K., Harada, A., Yamaguchi, M., ... Ohkawa, Y. (2011). Flow cytometric sorting of neuronal and glial nuclei from central nervous system tissue. *Journal of Cellular Physiology*, 226, 552–558.
- Paden, C. M., Berglund, D. L., Hapner, S. J., & Welsh, C. J. (1986). A flow cytometric method for intracellular labeling and purification of rare neuronal populations: Isolation of fixed neurophysin neurons. *Brain Research*, 376, 310–319.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., McNamara, J., & White, L. (2001). *Neuroscience. 2nd edition*. Sinauer associates. Sunderland (MA).
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119, 7–35.
- Tiane, A., Schepers, M., Rombaut, B., Hupperts, R., Prickaerts, J., Hellings, N., ... Vanmierlo, T. (2019). From OPC to Oligodendrocyte: An Epigenetic Journey. *Cells*, 8, 1–19.
- Valihrach, L., Androvic, P., & Kubista, M. (2018). Platforms for single-cell collection and analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 22–24.
- Xu, P., Chen, A., Li, Y., Xing, X., & Lu, H. (2019). Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiological Genomics*, 51, 432–442

## 7. Eskerrak eta oharrak

Esperimentu hauek UPV/EHUko doktoratu aurreko laguntza, Eusko Jaurlaritzaren (IT1211-2019) eta Espainiako MINECO (RTI 2018-094414-A-I00) proiektuen diru-laguntza jaso dute.