



Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Estresarekiko erantzun integratua areagotzeak NMDAk eragindako exzitotoxizitatearen aurrean babesten ditu neuronak

Egilea:
Maider Fernández Salado

Zuzendaria:
Asier Ruiz Núñez

AURKIBIDEA

| | |
|---|----|
| 1. SARRERA | 2 |
| 1.1. Glutamato hartzaileak | 2 |
| 1.2. Ca ²⁺ -aren homeostasi intrazelularra eta exzitotoxizitatea | 3 |
| 1.3. ERa, Ca ²⁺ -aren homeostasia eta estresarekiko erantzun integratua (ISR)..... | 4 |
| 1.4. Gaixotasun neurodegeneratiboak eta ISRa..... | 5 |
| | |
| 2. HELBURUAK | 6 |
| | |
| 3. MATERIAL ETA METODOAK | 6 |
| 3.1. Animaliak..... | 6 |
| 3.2. Erreaktiboak | 6 |
| 3.3. Neuronen hazkuntza primarioak | 6 |
| 3.4. Neuronen toxizitate esperimentuak | 7 |
| 3.5. Ca ²⁺ zitosolikoaren neurketa | 7 |
| 3.6. Western plapaketa | 8 |
| 3.7. Datuen analisia | 8 |
| | |
| 4. EMAITZAK | 9 |
| 4.1. Guanabenz-ak ERko estresak eragindako heriotza murrizten du..... | 9 |
| 4.2. Guanabenzak exzitotoxizitatearen aurrean babesten du..... | 9 |
| 4.3. Guanabenzak NMDA hartzaileak inhibitzen ditu | 10 |
| 4.4. Guanabenz 2 µM-ek exzitotoxizitate babesten ditu neuronak | 11 |
| 4.5. Guanabenzak eIF2α-ren fosforilazioa emendatzen du exzitotoxizitate egoeran..... | 12 |
| | |
| 5. EZTABAIDA ETA ONDORIOAK | 12 |
| | |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 14 |

1. SARRERA

Exzitotoxizitatea, neurotransmisore kitzikatzailen bidezko hartzaille ionotropikoen gehiegizko aktibazioaren ondorioz ematen den heriotz zelular mota bat da. Hartzaille hauen gehiegizko aktibazioak zelula barnerako kaltzio korrante masiboa sortzen du, zeinak Ca^{2+} -aren homeostasia hautsi eta neuronen heriotza dakarren nerbio sistema zentrolean (NSZ). Heriotz neuronal proteasa, nukleasa eta fosfolipasa bezalako entzimen aktibazio, mitokondrioaren disfuntzio edota oxigeno espezie erreaktiboan eraginez gertatzen da. Garuneko iskemian eta gaixotasun neurodegeneratiboetan, neuronek, exzitotoxizitate gertaera jasaten dute (Camacho eta Massieu, 2006; Lewerenz eta Maher, 2015).

Nahiz eta aminoazido kitzikatzaille desberdinak egon, hala nola, aspartatoa, glizina, agmatina eta D-serina, ikerketa honetan L-glutamatoaren (azido glutamiko) aktibitatean zentratu gara, NSZeko neurotransmisore kitzikatzaille ugariena baita. Hala ere, neurotransmisore bezala funtzionatzeaz gain, glutamatoak bestelako funtzio garrantzitsuak betetzen ditu: neuronen kitzikagarritasunean epe-luzerako aldaketak sortzen ditu, egitura eta funtzio sinaptikoaren erregulazioan eta neuronen garapenean zeharreko migrazioan parte hartzen du eta neuronen bideragarritasuna bermatzen du, besteak beste.

1.1. Glutamato hartzailleak

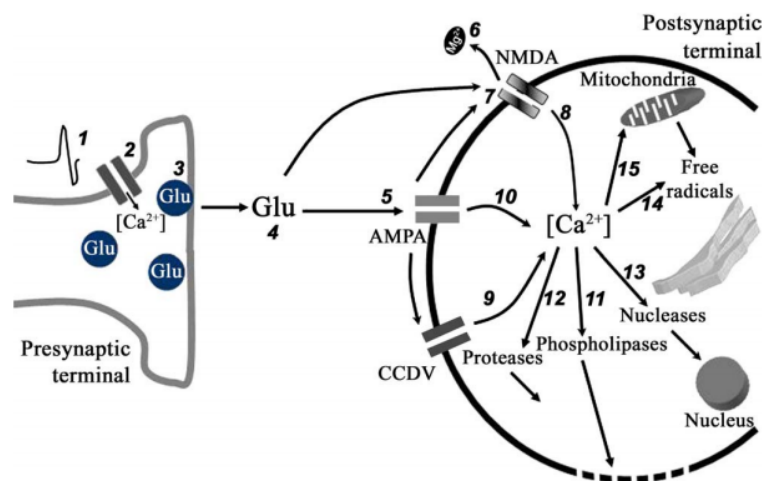
Lehenago aipatu bezala, exzitotoxizitatea glutamato hartzaille ionotropikoen gehiegizko aktibazioaren ondorioz ematen da. Hartzaille ionotropikoek ioi kanalak eratzen dituzte eta aktibatzerakoan, Ca^{2+} eta Na^+ fluxuak zelula barrura garraiatzen dituzte, ekintza potentzialaren sorreran parte hartuz. Propietate farmakologiko, elektrofisiologiko eta molekularrak kontuan hartuz, glutamatoaren hartzaille ionotropikoak hiru taldetan sailkatzen dira: N-metil D-aspartato hartzailleak (NMDAR), azido propionikoaren α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol hartzailleak (AMPA) eta kainato hartzailleak (KAR).

Ikerketa honetan NMDAk eragindako exzitotoxizitatean zentratu gara, izan ere, erlazio handia dago kalte neuronalaren eta NMDAR-en gehiegizko aktibazioaren artean, NMDA hartzailleak Ca^{2+} -arekiko bereziki iragazkorak baitira (Lewerenz eta Maher,

2015). NMDARak, hartzaile heterotetramerikoak dira, bi NR1 azpiunitate eta bi NR2 edo NR3 azpiunitatez osatuak daude. NMDAR-ek glutamatoarentzako lotura guneak izateaz gain, D-glizina, D-serina eta magnesio ioiarentzako (Mg^{2+}) lotura guneak ere badituzte. D-glizina eta D-serina NMDAR-en ko-agonistak dira, eta bietako baten lotura ezinbestekoa da glutamatoaren lotura eman dadin. Mg^{2+} -ak, berriz, NMDAR-en aktibitatea inhibitzen du mintz plasmatikoa atsedean potentzialean dagoenean. Hala ere, mintzaren despolarizazioak Mg^{2+} -aren askapena eragingo du eta hartzaileak aktibitatea berreskuratuko du (Paoletti eta Neyton, 2007).

1.2. Ca^{2+} -aren homeostasi intrazelularra eta exzitotoxizitatea

Kaltzio ioia zelulen bigarren mezulari garrantzitsuenetarikoa da, prozesu ugari eta desberdinetan parte hartzen duelarik eta horregatik, bere kontzentrazio intrazelularra era zorrotzean dago erregulatua.



1. Irudia: ekintza potentziala bukaera presinaptikora heltzean (1) mintz plasmatikoa despolarizatu eta boltai-menpeko kalcio kanalak aktibatuko ditu (2). Kaltzioaren sarrerak, besikula presinaptikoak mintz plasmatikoarekin fusionatzea eragingo du (3). Ondoren, glutamatoa askatu eta bere kontzentrazioa igo egingo da gune sinaptikoan (4). Glutamatoak AMPA hartzaileak aktibatuko ditu neurona postsinaptikoan (5), sodioaren sarrera eta ondorioz, mintz plasmatikoko despolarizazioa eraginez. Baldintza hauetan, normalean NMDA hartzaileak blokeatzen dituen magnesio ioia askatu (6), eta hartzailea glutamatoaren eta glizinen loturen ondorioz aktibatuko da (7). NMDA hartzailearen aktibazioak sodio eta kalcioaren sarrera eragingo du (8). Gainera, boltai-menpeko kalcio kanalak ere aktibatuko dira (9). Zenbait baldintzapean, kalcioa AMPA hartzaileetatik ere sartuko da (10). Kalcioaren sarrerak, zitosolean kalcioaren gainkarga eragingo du, eta honek entzima desberdinen aktibazioa eragingo du: fosfolipasak (11), proteasak (12) eta nukleasak, zeintzuek, besteak beste, fosfolipido, proteina eta nukleotidoen degradazioa eragingo duten (13). Horrez gain, kalcio zitosolikoaren gainkargak, erradikal libreen produkzioa (14), estres oxidatiboa eta mitokondriaren disfuntzioa eragingo ditu, azken honek energia galera ekarriko duelarik (15). Guzti honen ondorioz, neuronen heriotza emango da (Camacho eta Massieu, 2006).

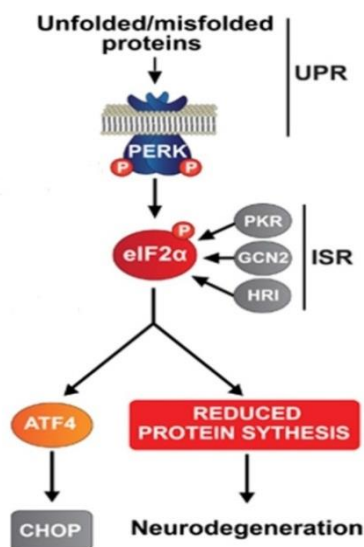
Glutamatoaren hartzaile ionotropikoen gehiegizko aktibazioa ematen denean, zelula barnerako Ca^{2+} korrante masiboa indutzen da, Ca^{2+} -ren homeostasia hautsiz. Erretikulu endoplasmatikoa (*endoplasmic reticulum*, ER) eta mitokondrioak Ca^{2+} -aren barne biltegiak dira eta hauen homeostiaren erregulazio ahalmena gainkargatzen bada heriotz zelularren bidezidorrak aktibatuko dituzte. Hala ere, Ca^{2+} kontzentrazio handiek ere zuzenean aktiba ditzakete heriotz zelularren seinaleak zitosolean (1.Irudia).

1.3. ERa, Ca^{2+} -aren homeostasia eta estresarekiko erantzun integratua (ISR)

ERa zelulako Ca^{2+} biltegi nagusi bezala funtzionatzen duen organulu intrazelularra da, zeinak zitosolak baino askoz ere Ca^{2+} kontzentrazioa handiagoa izan dezakeen. Horregatik, ERak Ca^{2+} -aren seinaleztapenean zuzenean hartzen du parte. Baina, horrez gain, Ca^{2+} menpekoak diren proteinen sintesian eta tolespenean ere hartzen du parte, prozesu hauek era egokian eman daitezen Ca^{2+} kontzentrazio egokia behar delarik (Verkhatsky eta Petersen, 2002).

ERan tolestu gabeko edo gaizki tolestutako proteinak pilatzen direnean, edo Ca^{2+} -aren homeostasia galtzen denean (adibidez, exzitotoxizitateak bideratuta), ERko estresa bezala ezagutzen den egoera patologiko bat sortzen da. Egoera horren aurrean, ERak tolestu gabeko proteinen aurkako erantzuna (*Unfolded Protein Response*, UPR) aktibatzen du. UPRa ERaren mintzean kokatutako estres sentsores espezializatu talde batek eta geneen adierazpena eraldatzen duten transkripzio faktoreek osatzen dute, haien helburua zelulak estresera egokitzea delarik (Hetz eta Mollereau, 2014). ERko estresaren sentsoretako batek, PERKak (*Protein Kinase RNA-like ER kinase*), eIF2 α (*eucaryotic translation initiation factor 2 α*) fosforilatzen du, estresarekiko erantzun integratua (*Integrated Stress Response*, ISR) aktibatzen delarik. ISRa zelula eukariotoek amankomunean daukaten defentsa sistema bat da, mota desberdineko homeostasi galerei aurre egiten laguntzen duena. Erantzun honen elementu zentrala eIF2 α -ren fosforilazioa da (peIF2 α) eta ERko estresaz gain, infekzio birikoek, hipoxiak eta aminoazido gabeziak ere aktibatzen dute (Way eta Popko, 2016). peIF2 α -k, proteinen sintesi orokorra gelditu eta egokitzapen prozesu batzuk martxan jartzen ditu, haien artean, ATF4aren (*activating transcription factor 4*) itzulpena areagotzen du, zeinak ERaren txaperonen adierazpena emendatzen duen (Hetz eta Mollereau, 2014). Hala ere, eragindako estresa gehiegizkoa denean, UPR/ISR sistemek, egokitzapena bultzatu

beharrean, apoptosi seinaleak aktibatuko dituzte, gadd153 (CHOP) bezalako geneak aktibatuz, zeina ERko estresak eragindako apoptosiaren osagai nagusia den (2. Irudia).



2. Irudia: tolestu gabeko edo gaizki tolestutako proteinek PERK aktibatzen dute, zeinak eIF2 α fosforilatzen duen. Honek, proteinen sintesi orokorra gelditu eta egokitzapen prozesu batzuk martxan jartzen ditu, haien artean, ATF4aren itzulpena areagotzen du, zeinak CHOP proteina apoptotikoaren itzulpena aktibatzen duen. Proteinen sintesiaren inhibizioa denboran mantentzen bada neurodegenerazioa ager daiteke (Moldatua: Halliday *et al.*, 2015).

1.4. Gaixotasun neurodegeneratiboak eta ISRa

UPR/ISRa aktibatzen duten zenbait faktorek, gaixotasun neurodegeneratiboen efektore patogeniko bezala funtzionatzen dutela ikusi da. Alzheimer, Parkinson eta albo esklerosi amiotrofikoa bezalako gaixotasunetan PERK-P eta peIF2 α -ren detekzioa UPR/ISRen aktibazioa ematen denaren seinale da (Freeman eta Mallucci, 2016). Baina, era berean, eIF2 α -ren fosforilazioa, eta beraz, ISRaren aktibitatea areagotzeak zelulak ERko estresaren aurrean babesten dituela behatu da (Jousse *et al.*, 2003). Hau horrela izanda, ISRa modulatzeko terapiak interesgarriak suerta daitezke gaixotasun hauen tratamenduan. 2011an, Droga eta Elikagaien Administrazioak (*Food and Drug Administration, FDA*) hipertentsioa tratatzeko onartutako droga batek, guanabenz-ak, UPR/ISRa aktibatu ondoren peIF2 α -ren defosforilazioa modu selektiboan inhibitzen zuela ikusi zuten, proteina fosfatasa 1 (PP1) eta GADD34aren interakzioa inhibituz hain zuzen ere (Tsaytler *et al.*, 2011). Berez, guanabenza, α -2 hartzaike adrenergikoaren agonista da baina zelulak ERko estresak eragindako heriotzatik libratzen ditu ere, jatorrizko efektuarekiko independentea den mekanismo baten bitartez. Ikusi da,

guanabenzak, ISRa areagotuz, oligodentrozitoak eta mielina hanturaren aurrean babes ditzakeela esklerosi anizkoitzan (Way eta Popko, 2016).

2. HELBURUAK

Aurretik aipatu den bezala, ezaguna da zenbait neurodegenerazio eredutan ISR/UPRa aktibatua dagoela, baina ez dago argi horrek neuronengan zer ondorio dituen. Adibidez, NMDAk neuronetan eIF2 α -ren fosforilazioa eragiten du (Ruiz *et al.*, 2009) baina honek exzitotoxizitatean duen efektua onuragarria ala kaltegarria den jakiteke dago.

Beraz, lan honen helburua, ISRaren areagotzaile batek, guanabenzak hain zuzen ere, NMDAk eragindako ISR eta neurotoxizitatean zer nolako eragina duen aztertzea da. Zehazki, eIF2 α -ren bidezidorra farmakologikoki erregulatzeak neuronei nola eragiten dien aztertzea eta guanabenzak neuronetan pEIF2 α -ren defosforilazioa inhibitzen duen ala ez aztertzea dira lan honen helburuak.

3. MATERIAL ETA METODOAK

3.1. Animaliak

Esperimentu guztiak Euskal Herriko Unibertsitateko Animalien Ongizaterako Etika Batzordeak ezarritako araudiarekin bat eginez burutu ziren, animalien sufrimendua ahalik eta gehien minimizatzen saiatuz, eta ahalik eta animalia kopuru txikiena erabiliz.

3.2. Erreaktiboak

Neurobasal® media, B-27 gehigarria eta kaltzeina-AM (*calcein acetoxymethyl ester*) Invitrogen-i (Thermo Life Scientific) erosiak izan ziren. NMDA (N-metil-D-aspartato), HBSS (*Hank's Balance Salt Solution*), FBS (*Fetal Bovine Serum*) glizina, guanabenz, thapsigargina eta tunikamizina Sigma-tik (St. Louis, MO, USA) lortu ziren.

3.3. Neuronen hazkuntza primarioak

Neurona kortikalak, E18 Sprague-Dawley arratoi enbrioien lobulu kortikaletatik lortu ziren aurretik deskribatutako metodologiari jarraituz (Larm *et al.*, 1996). Neuronak

B-27 eta %10 FBSdun Neurobasal® medioan berreseki eta alde zurretik, poli-L-ornitinaz tratatutako 48 putzuko plaka batean erein ziren, 1×10^5 zelula/putzu-ko dentsitatean.

24 ordutara, medioa, FBSrik gabeko Neurobasal® medioarengatik ordezkatu zen, azken honek B-27 gehigarria zuelarik, eta neuronak 37 °C-tan eta % 5 CO₂-arekin mantendu ziren. Kultiboak 8-9 *in vitro* egun ostean erabili ziren.

3.4. Neuronen toxizitate esperimentuak

Zelulen toxizitate esperimentuak zurretik deskribatutako metodologia jarraituz burutu ziren, aldaketa batzuekin (Schubert *et al.*, 1992). Neuronak Ca²⁺ eta Mg²⁺-rik gabeko eta 2.6 mM CaCl₂, 10 mM glukosa eta 10 µM gliznadun HBSSan inkubatu ziren eta NMDA (30 µM eta 100 µM, 37 °C, 30 min) gehitu zitzairen. Inhibitzailea (guanabenz) estimulu exzitotoxikoaren zurretik eta atzetik gehitu zen. ERko estresa eragiteko, neuronak tunicamizina eta thapsigarginarekin (1 µM, 37 °C, 24 h) inkubatu ziren eta guanabenza estimuluaren zurretik (1 h) gehitu zen. Kasu guztietan, zelulen bideragarritasuna 24 ordutara neurtu zen kaltzeina-AM proba erabiliz. Proba hau esterasa intrazelularretan oinarritzen da. Esterasa hauek zelula bizietan bakarrik daude aktibo eta fluoreszentziarik gabeko kaltzeina-AM molekula hidrolizatu eta fluoreszentzia berdedun anioia sortzen dute (Bozyczko-Coyne *et al.*, 1993). Esperimentu guztietan baldintza bakoitzeko lau erreplika burutu ziren eta lortutako balioak gutxienez hiru esperimentu independenteren batz bestekoa ± batz bestekoaren errore estandarra (± *standard error of the mean*, ± SEM) bezala adierazi dira.

3.5. Ca²⁺ zitosolikoaren neurketa

Ca²⁺ zitosolikoaren neurketarako, neuronak Fluo-4 AM molekularekin inkubatu ziren (1 µM; Molecular Probes, Invitrogen) 30 minutuz 37 °C-tan, Ca²⁺, Mg²⁺, eta fenol gorririk gabeko eta 20 mM HEPES, pH 7.4, 2.6 mM CaCl₂, 10 mM glukosa eta 10 µM gliznadun HBSSan. Horren ostean, neuronak 20 minutuz garbitu ziren desesterifikazioa baimentzeko. Fluo-4 AM molekuladun zelulak 488 nm-tan kitzikatu eta igorritako fluoreszentzia irudi bat/15 s-ko maiztasunarekin jaso zen LCS SP2 mikroskopio konfokalaren bidez (Leica). Datuen analisirako, ikus eremuan 15-25 zelulako populazio

homogeneoa aukeratu zen, neuronen soma intereseko eremu bezala hautatu zelarik. Lortutako balioei zelularik gabeko eremu baten fluoreszentzia balioa kendu zitzaien (*background*) eta emaitzak $F/F_0 \pm \text{SEM} (\%)$ bezala adierazi dira, non F -k denbora puntu zehatz batean lortutako fluoreszentzia balioa adierazten duen, eta F_0 -k fluoreszentzia basalaren batz besteko balioa adierazten duen.

3.6. Western plapaketa

Zelulak 0.1 M PBSrekin (*Phosphate-Buffered Saline*) garbitu eta izoztutako 50 μl elektroforesi tanpoian (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, % 10 glizerol, % 2 SDS, 0.2 mg/mL bromofenol urdina, 0.01 M DTT) lisatu eta bildu ziren. Homogeneizatua 10 minutuz irakin eta % 12ko SDS-poliakrilamidazko gel elektroforesiaren bitartez banatu ziren (Criterion Tris-HCl Precast Gels, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Ondoren, laginak PVDF mintz batetara (*Trans-Blot Turbo Midi Nitrocellulose Transfer Packs*) transferitu ziren *Trans-Blot® Turbo™* transferentzia sistema erabiliz (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Horren ostean, mintzak % 5 esne gaingabetua eta % 5 NGS zuen TBST tanpoian (*Tris-Buffered Saline buffer with Tween®20*) blokeatuak izan ziren ordu betez. Mintzak gau osoan zehar inkubatu ziren antigorputz primarioarekin, 4 °C-tan, % 5 BSA zuen TBTS tanpoian: anti-p ϵ IF2 α eta anti-eIF2 α (1:1000, Cell Signalling); anti- β -aktina (1:2000, Sigma). Garbiketak burutu ostean, peroxidasarekin konjokatutako antigorputz sekundarioak (1:2000, Sigma) % 5 esne gaingabetua eta % 1 NGS zuen TBTS tanpoian prestatu eta mintzekin inkubatu ziren 2 ordutan zehar giro tenperaturan. Azkenik, errebelatua, kimioluminiszentzia erabiliz burutu zen fabrikatzailearen argibideei jarraituz (Super Signal, West Dura, Pierce, Rockford, IL, USA) *C-DiGit® blot* eskanerra erabiliz (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA).

Seinaleak *Image Studio Digits* (LI-COR) programarekin kuantifikatu eta β -aktinaren seinalearekiko normalizatu ziren, lortutako balioak gutxienez hiru esperimendu independenteren batz bestekoa $\pm \text{SEM}$ bezala adierazi direlarik.

3.7. Datuen analisisia

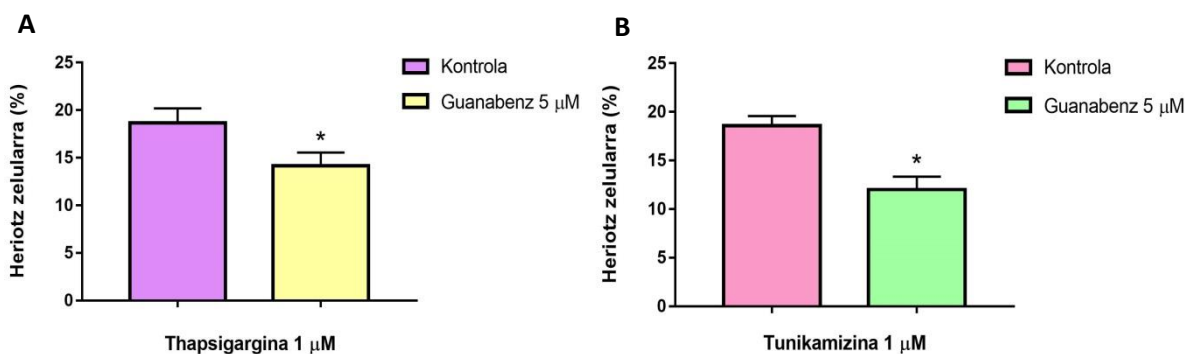
Datu guztiak, batz bestekoa $\pm \text{SEM} (n)$ bezala adierazi dira, non n analizatutako kultiboen kopurua den. Zelula bizien Ca^{2+} zitosolikoko esperimenduetan n gutxienez

hiru kultibo independentetik eratorritako eta aztertutako zelula kopuru totala da. Analisi estatistikoa *t-student* testaren bitartez burutu zen, esangura $p < 0.05$ -ean zehaztu zelarik.

4. EMAITZAK

4.1. Guanabenzak ERko estresak eragindako heriotza murrizten du

Aurretiko ikerketa batean, guanabenzak, zenbait zelula mota ERko estresak eragindako heriotzatik babesten dituela frogatu zen (Tsaytler *et al.*, 2011). Guanabenzak neuronon ERko estresaren aurrean zein eragin duen ikusteko, hauek, ERko estresaren eragile diren thapsigargina eta tunikamizinarekin inkubatu ziren ($1 \mu\text{M}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h) guanabenzik gabe (kontrola) eta guanabenzaren presentzian ($5 \mu\text{M}$). Thapsigarginarekin tratatutako neuronetan, guanabenzak ($5 \mu\text{M}$) neuronon heriotza % 18.66 ± 1.54 tik % 14.15 ± 1.4 ra murriztu zuen ($n=4$) (3. Irudia A). Tunikamizinarekin tratatutako zeluletan, berriz, heriotz zelularra % 15.56 ± 1.01 etik % 12.01 ± 1.32 ra jaitsi zen guanabenzaren presentzian ($n=5$) (3. Irudia B).

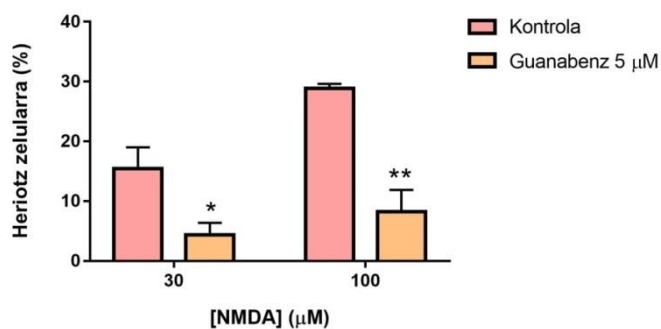


3. Irudia: Guanabenz $5 \mu\text{M}$ -ek neuronak ERko estresak eragindako heriotzatik babesten ditu. (A) Neuronak thapsigarginarekin inkubatu ziren ($1 \mu\text{M}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h) guanabenzik gabe eta guanabenzaren presentzian ($5 \mu\text{M}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h). (B) Neuronak tunikamizinarekin inkubatu ziren ($1 \mu\text{M}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h) guanabenzik gabe eta guanabenzaren presentzian ($5 \mu\text{M}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h). Bi kasuetan, zelulen bideragarritasuna kaltzeina-AM proba erabiliz neurtu zen 24 ordutara. Emaitzen esangura adierazteko *t-student* testa erabili da. $*p < 0.05$ soilik thapsigargina eta tunikamizinarekin tratatutako zelulekin (kontrola) alderatuta.

4.2. Guanabenzak exzitotoxizitatearen aurrean babesten du

Jakina da estimulu exzitotoxikoez ISRa eragiten dutela, eta baldintza hauetan ISRa farmakologikoki erregulatzeak neuronak babesten dituela (Sokka *et al.*, 2007). Honela, guanabenzak NMDAk eragindako exzitotoxizitatearen aurrean neuronak babesten

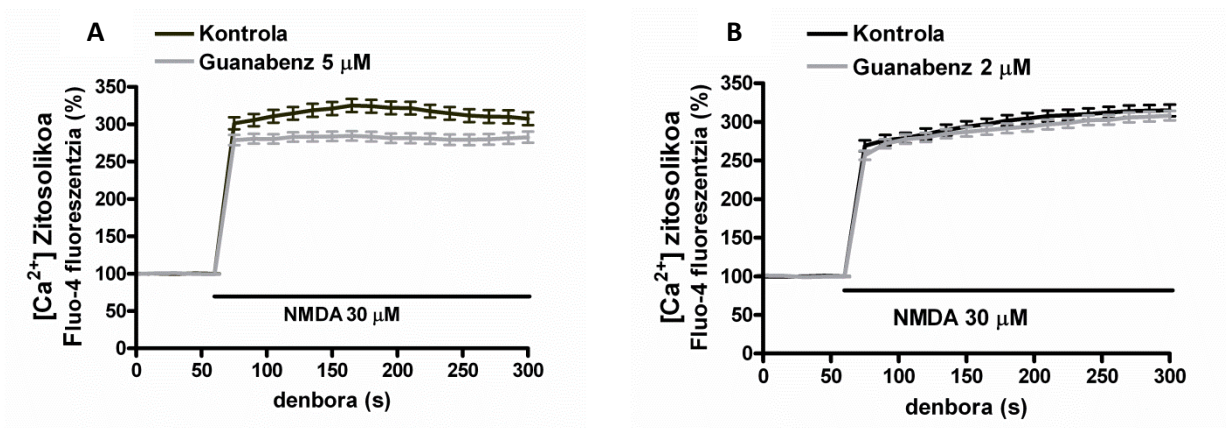
dituen ala ez aztertu genuen. Zelulak NMDAekin inkubatu ziren (30 μM eta 100 μM , 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min), eta guanabenzaren presentzia (5 μM) heriotz zelularra oso modu adierazgarrian murriztu zen. NMDA 30 μM -ekin tratatutako neuronetan, heriotza, % 15.44 ± 3.58 tik % 4.35 ± 2.04 ra jaitsi zen neuronak guanabenz 5 μM -ekin tratatu zirenean (n=5). NMDA 100 μM -ekin, berriz, guanabenzak heriotz zelularra % 28.86 ± 0.74 tik % 8.24 ± 3.63 ra gutxitu zuen (n=4) (4. Irudia).



4. Irudia: guanabenzak exzitotoxizitatearen aurrean babesten ditu neuronak. Neuronak NMDAekin inkubatu ziren (30 μM eta 100 μM , 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min) guanabenzik gabe eta guanabenzaren presentzia (5 μM). Guanabenza estimulu exzitotoxikoaren aurretik eta atzetik gehitu zen eta zelulen bideragarritasuna 24 ordutara neurtu zen kaltzeina-AM probaren bitartez. Emaitzen esangura adierazteko *t-student* testa erabili da. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ soilik NMDAekin tratatutako zelulekin (kontrola) alderatuta.

4.3. Guanabenzak NMDA hartzaileak inhibitzen ditu

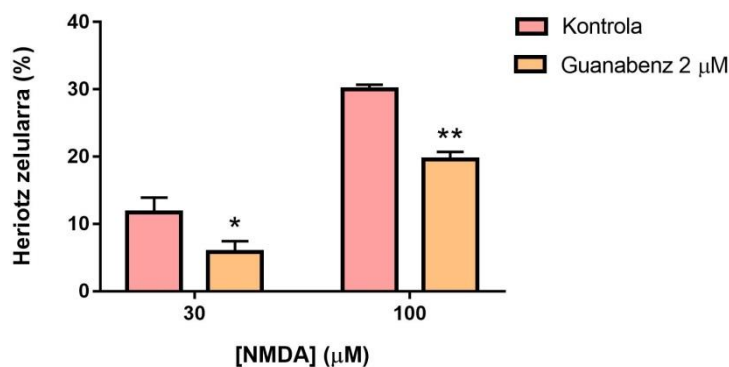
Guanabenzak NMDAk eragindako heriotzaren aurrean erakusten zuen efektu babeslea, ERko estresa modu selektiboan eragiten duten drogen (thapsigargina eta tunikamizina) aurrean erakutsitakoa baino askoz handiagoa zenez, ISRrekiko independentea zen mekanismo bat tartean egon zitekeen hipotesia landu genuen. Izan ere, guanabenzak NMDA hartzaileak inhibititu eta zelula barnerako Ca^{2+} korronea ekidin dezakeela ezaguna zen (Milhaud *et al.*, 2000). Guanabenz 5 μM -en bitartez lorturiko neuronon babesa NMDA hartzaileen inhibizioagatik ematen den jakiteko, zelulen Ca^{2+} zitosolikoaren neurketa burutu zen NMDA 30 μM -ekin tratatutako neuronetan. Guanabenz 5 μM -en presentzia Ca^{2+} zitosolikoaren gehikuntza % 325.17 ± 8.7 tik (n=84) % 284.40 ± 6.23 ra (n=85) murriztu zen (5. Irudia A). Aldiz, guanabenzaren kontzentrazio txikiago baten presentzia (2 μM) NMDAk eragindako Ca^{2+} zitosolikoaren igoera % 314.77 ± 7.54 izatetik (n=101) % 308.12 ± 6.23 (n=102) izatera igaro zen, estatistikoki efektu esanguratsurik azaldu gabe (5. Irudia B).



5. Irudia: Guanabenzak NMDA hartzailak inhibitzen ditu. Neuronen Ca²⁺ zitosolikoaren neurketa burutu zen, zelulak FLUO-4AM zunda fluoreszentearekin 30 minutuz inkubatuz NMDA gehitu ondoren. (A) Neuronak NMDA 30 μM-rekin tratatu ziren, guanabenzaren gabezia eta (A) guanabenz 5 μM eta (B) guanabenz 2 μM-en presentzian.

4.4. Guanabenz 2 μM-ek exzitotoxizitate babesten ditu neuronak

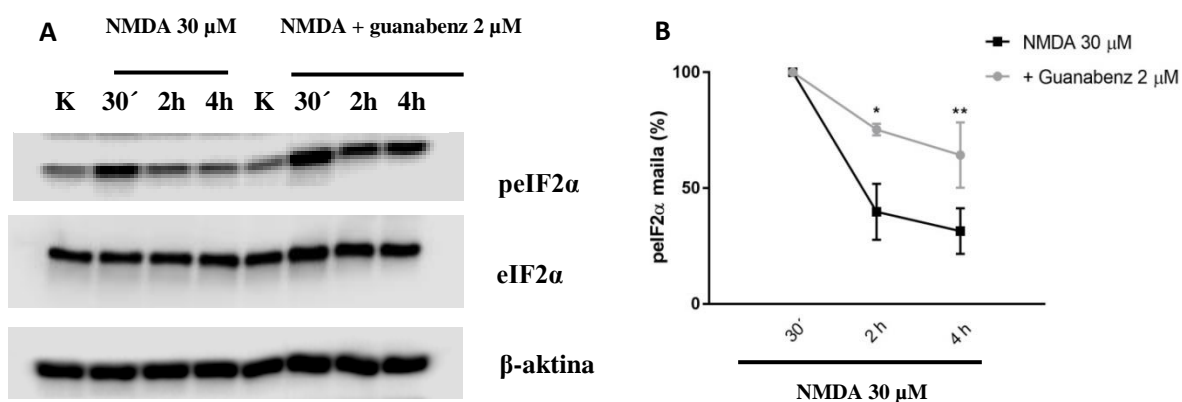
Guanabenz 2 μM-ek NMDA hartzailak inhibitzen ez zituela ikusirik, neuronak exzitotoxizitatearen aurrean babesten dituen aztertu genuen. NMDA 30 μM-ekin tratatutako neuronetan, heriotza, % 11.69 ± 2.23tik % 5.81 ± 1.65era jaitsi zen zelulak guanabenz 2 μM-rekin tratatu zirenean (n=7). NMDA 100 μM-ekin, berriz, heriotz zelularra % 29.97 ± 0.72tik % 19.60 ± 1.10era jaitsi zen neuronak guanabenz 2 μM-en presentzian (n=4) (6. Irudia).



6. Irudia: guanabenz 2 μM-ek exzitotoxizitatearen aurrean babesten ditu neuronak. Neuronak NMDA-rekin inkubatu ziren (30 μM eta 100 μM, 37 °C, 30 min) guanabenzik gabe eta guanabenzaren presentzian (2 μM). Guanabenza estimulu exzitotoxikoaren aurretik eta atzetik gehitu zen eta zelulen bideragarritasuna 24 ordutara neurtu zen kaltzeina-AM probaren bitartez. Emaitzen esangura adierazteko *t-student* testa erabili da. *p<0.05, **p<0.01 soilik NMDA-rekin tratatutako zelulekin (kontrola) alderatuta.

4.5. Guanabenzak eIF2 α -ren fosforilazioa emendatzen du exzitotoxizitate egoeran

NMDAk neuronetan eIF2 α -ren fosforilazioa eragiten du (Ruiz *et al.*, 2009). Bestalde, guanabenzak, UPR/ISRa aktibatu ondoren peIF2 α -ren defosforilazioa modu selektiboan inhibitzen du HeLa zelulen ERko estres eredu batean (Tsaytler *et al.*, 2011). Guanabenzak NMDAk neuronetan induzitutako ISRan duen efektua aztertzeko, peIF2 α -ren maila aztertu genuen estimulu exzitotoxikoaren ondorengo 4 orduetan western plapaketa bidez. Aldez aurretik frogatu zen bezala, NMDA gehitu eta 30 minututara peIF2 α -ren mailaren handipena eman zen. Hala ere, peIF2 α -ren hasierako igoera azkarra iragankorra zela ikusi genuen, 4 ordutara % 31.46 ± 9.85 ra (n=4) murrizten baitzen. Aldiz, guanabenzaren presentzian, NMDAk eragindako peIF2 α maila 4 ordu beranduago % 64.28 ± 14.09 ra (n=4) jaisten zen soilik, eta beraz exzitotoxizitate egoeran aktibatutako ISRa luzaroago mantentzen zen (8. Irudia).



8. Irudia: Guanabenzak NMDAk eragindako ISRa areagotzen du. (A) Neuronak NMDAekin inkubatu ziren (30 μ M, 37 $^{\circ}$ C, 30 min) guanabenzik gabe eta guanabenzaren presentzian (2 μ M). Zelulak, NMDA kentzerakoan (30 min), 2 h eta 4 h-tara lisatu eta bildu ziren western plapaketa bidezko peIF2 α -aren analisia burutzeko. (B) peIF2 α mailaren murrizpenaren kuantifikazioa denboran zehar. peIF2 α mailaren balioak eIF2 α -ren balioekiko eta β -aktinaren balioekiko normalizatuta adierazten dira. NMDAk eragindako peIF2 α mailak % 100a kontsideratu dira. *p<0.05, **p<0.01 soilik NMDAekin tratatutako zelulekiko (kontrola) alderatuta.

5. EZTABAIDA ETA ONDORIOAK

ISRa eIF2 α -ren fosforilazioarekin aktibatzen da eta gaixotasun eredu ezberdinetan zelulak ERko estresaren aurrean babesten dituela frogatu da. Hala ere, neurodegenerazioan eta estresa gehiegizkoa denean, ISRak heriotz zelularra eragin dezake, baina zehazki exzitotoxizitatean jokatzen duen papera oraindik ez dago argi (Scheper eta Hoozemans, 2015). Ikerketa honetan, guanabenzak, peIF2 α -ren

defosforilazioa inhibituz eta fosforilazioa denboran zehar mantenduz, NMDAk eragindako ISRa areagotu egiten duela ikusi dugu. Gainera, ISRa areagotzea NMDAk eragindako exzitotoxizitatearen aurrean neurobabesle suertatzen dela frogatu dugu.

Hasteko, guanabenzak tunikamizina eta thapsigarginak eragindako ERko estresaren aurrean neuronak heriotzatik babesten dituela behatu dugu. Honek bat egiten du beste ikerketa batean Min6 eta INS-1 β -zelula pankreatikoetan ikusitakoarekin (Tsaytler *et al.*, 2011). Ikerketa horretan, ERko estresaren eragileen presentzian, guanabenzak proteinen sintesiaren berreskurapena atzeratu eta proteinen tolespena bultzatzen duten txaperonen lan karga murrizten zuen, erregulatzailer proteostatiko bezala jokatuz. Ikerketa horretan lortutako babesak neuronetan erreproduzitzen da, guanabenzak UPR/ISRan duen eragina zelula edota eredu ezberdinetan ematen dela egiaztatuz.

Bestalde, eIF2 α -ren fosforilazioa ISRaren areagotzaile den salubrinal-en bitartez emendatzeak exzitotoxizitatearen aurka babesten duela frogatua dago (Ruiz *et al.*, 2009; Sokka *et al.*, 2007). Salubrinalak ISRa areagotzen du (Boyce *et al.*, 2005) baina ez da agente terapeutiko egokia, peIF2 α -ren defosforilazioa eta beraz, proteinen sintesia modu konstitutiboan inhibitzen baitu (Way eta Popko, 2016). Guanabenza ere ISRaren areagotzaile bat da, baina salubrinalak ez bezala, espezifikoki, soilik estres baldintzetan inhibitzen du peIF2 α -ren defosforilazioa (Tsaytler *et al.*, 2011). Gure ikerketan, guanabenz 5 μ M-ek NMDAk eragindako exzitotoxizitatearen aurrean efektu babesle sendo bat erakutsi zuen. Hala ere, efektu hau ISRarekiko independentea izan zitekeen, aurretik zerebeloko neuronatan frogatu zen bezala (Milhaud *et al.*, 2000), gure erudian, guanabenzak NMDAk eragindako Ca²⁺ korranteak zuzenean inhibitzen zituelako. Guanabenz 2 μ M-ek, aldiz, NMDAk eragindako Ca²⁺ zitosolikoaren igoera murriztu gabe, exzitotoxizitatearen aurrean neuronak babesten zituela behatu genuen. Ondoren, efektu hau ISRarekin lotuta zegoen ala ez aztertu genuen.

Estimulu exzitotoxikoek ISRa aktibatzen ote dutenaren inguruan eztabaida handia dagoela esatea dago. Aurreko ikerketa batean, NMDAk eIF2 α -ren fosforilazioa azkar emendatzen duela aurkitu zen (Ruiz *et al.*, 2009), eta beste lan bateko emaitzen arabera, kainatoak, glutamatoaren hartzaileen beste agonista batek, eIF2 α fosforilatzen du (Sokka *et al.*, 2007). Beste talde batzuek, aldiz, NMDA hartzailearen aktibitate exzitotoxikoak peIF2 α -rekin (Petegnief *et al.*, 2008) edota UPRarekin (Concannon *et al.*, 2008) loturarik ez duela adierazi zuten. Hala ere, ikerketa honetan, NMDAk

eragindako ISRa iragankorra dela ikusi dugu, denborarekin peIF2 α -ren maila oso nabarmenki murrizten baita, eta horrek ISRaren detekzioa muga dezake. Horrez gain, guanabenz-ak, NMDAk eragindako ISRa areagotzen duela ikusi dugu. Izan ere, guanabenz 2 μ M-en presentzian eIF2 α -ren fosforilazioa emendatu egiten da eta fosforilazio hau denboran zehar luzarago mantentzen da. Aipatzekoa da guanabenzak ez duela egoera basalean (trataturik gabeko neuronetan) eIF2 α -ren fosforilazioa areagotzen.

Guzti hau kontuan hartuz, ondoriozta dezakegu NMDAk ISR iragankor bat aktibatzen duela eIF2 α -ren fosforilazioa eraginez, eta guanabenzak ISRa denboran luzarago mantentzen duela, peIF2 α -ren defosforilazioa inhibituz. Azken hau exzitotoxizitate egoeretan babesle suertatzen da, neuronen heriotza murriztuz. Beraz, exzitotoxizitatea agertzen den NSZeko egoera patologikoetan, hala nola, iskemia, Alzheimer, Huntington eta albo esklerosi amiotrofikoa bezalako gaixotasunetan, guanabenzaren erabilerak interes terapeutikoa eduki lezake kalte neuronalak murrizteko orduan.

Etorkizunari begira, interesekoa litzateke peIF2 α -ren mailaren handipenaren ondorioz potentziazatuta ikusten diren eta neuronen superbizipenerako garrantzia eduki dezaketen seinaleztapen bidezidorrak aztertzea. Izan ere, bidezidor hauek zehaztasunez ezagutzeak, haien modulaziorako aukera emango ligukete eta ondorioz, zenbait gaixotasunei aurre egiteko tratamenduak lortzeko aukerak handitu egingo lirateke.

6. BIBLIOGRAFIA

- Bozyczko-Coyne, D., McKenna, B. W., Connors, T. J., & Neff, N. T. (1993). A rapid fluorometric assay to measure neuronal survival in vitro. *Journal of Neuroscience Methods*, 50(2), 205–216.
- Camacho, A., & Massieu, L. (2006). Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Archives of Medical Research*, 37(1), 11–18.
- Concannon, C. G., Ward, M. W., Bonner, H. P., Kuroki, K., Tuffy, L. P., Bonner, C. T., ... Prehn, J. H. M. (2008). NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal apoptosis in vitro and in vivo occurs in an ER stress and PUMA independent manner. *Journal of Neurochemistry*, 105(3), 891–903.
- Freeman, O. J., & Mallucci, G. R. (2016). The UPR and synaptic dysfunction in neurodegeneration. *Brain Research*, 1–8.
- Halliday, M., Radford, H., Sekine, Y., Moreno, J., Verity, N., le Quesne, J., ... Mallucci, G. R. (2015). Partial restoration of protein synthesis rates by the small molecule ISRIB prevents neurodegeneration without pancreatic toxicity. *Cell Death and Disease*, 6(3), e1672.

- Hetz, C., & Mollereau, B. (2014). Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(4), 233–249.
- Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H. P., & Ron, D. (2003). Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 α phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *Journal of Cell Biology*, *163*(4), 767–775.
- Larm, J. A., Cheung, N. S., & Beart, P. M. (1996). (S)-5-fluorowillardiine-mediated neurotoxicity in cultured murine cortical neurones occurs via AMPA and kainate receptors. *European Journal of Pharmacology*, *314*(1-2), 249–254.
- Lewerenz, J., & Maher, P. (2015). Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases—What is the evidence? *Frontiers in Neuroscience*, *9*(DEC), 1–20.
- Long, K., Boyce, M., & Bryant, K. F. (2005). A Selective Inhibitor of eIF2 α Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress. *Science*, *307*(2005), 935–939.
- Milhaud, D., Fagni, L., Bockaert, J., & Lafon-Cazal, M. (2000). Imidazoline-induced neuroprotective effects result from blockade of NMDA receptor channels in neuronal cultures. *Neuropharmacology*, *39*(12), 2244–2254.
- Paoletti, P., & Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, *7*(1), 39–47.
- Petegnief, V., Font-Nieves, M., Martín, M. E., Salinas, M., & Planas, A. M. (2008). Nitric oxide mediates NMDA-induced persistent inhibition of protein synthesis through dephosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and eukaryotic initiation factor 4G proteolysis. *The Biochemical Journal*, *411*(3), 667–77.
- Ruiz, A., Matute, C., & Alberdi, E. (2009). Endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and IP₃ receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell Calcium*, *46*(4), 273–281.
- Scheper, W., & Hoozemans, J. J. M. (2015). The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta Neuropathologica*, *130*(3), 315–331.
- Schubert, D., Kimura, H., & Maher, P. (1992). Growth factors and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(September), 8264–8267.
- Sokka, A.-L., Putkonen, N., Mudo, G., Pryazhnikov, E., Reijonen, S., Khiroug, L., ... Korhonen, L. (2007). Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(4), 901–8.
- Tsaytler, P., Harding, H. P., Ron, D., & Bertolotti, A. (2011). Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6025), 91–94.
- Verkhatsky, A., & Petersen, O. H. (2002). The endoplasmic reticulum as an integrating signalling organelle: from neuronal signalling to neuronal death. *European Journal of Pharmacology*, *447*(2-3), 141–154.
- Way, S. W., & Popko, B. (2016). Harnessing the integrated stress response for the treatment of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, *15*(4), 434–443.