

GIZA GARUN POSTMORTEMKO NUKLEO NEURONALEN ETA EZ-NEURONALEN BANAKETA

Martinez-Peula Oihane¹, Ramos-Miguel Alfredo^{1,2}, Morentin Benito⁴, Callado Luis Felipe^{1,2,3},
Meana José Javier^{1,2,3}, Rivero Guadalupe^{1,2,3}

¹Farmakologia saila, Medikuntza eta Erizaintza fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Espainia,

²CIBERSAM (Centro de investigación Biomédica en red de Salud Mental), Espainia,

³Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketa Institutua, Barakaldo, Espainia,

⁴Auzitegiko Euskal Medikuntzako Institutua, Bilbo, Espainia

SARRERA

Zelula mota ezberdinen funtzioa eta gaixotasunen arteko erlazioa ezagutzeko ikerketa gai nagusia izan da. Gaur egun, gorabidean dagoen teknika bat, fluoreszentzia bidez aktibatutako zelula banaketa (FACS) da (Bayer & Jungbauer, 2007).

Geneen adierazpenarekin erlazionatutako epigenetika ulertzeko nukleoari begira behar zaio. Izan ere, teknika gehienak ehunen homogeneizatueta burutzen dira, non zelula mota ezberdintzen ez den. NSZko zelulen nukleotan markatzaile espezifikoak bereiz daitezke eta hauetako esker, zelula mota ezberdinetako nukleoak banatzea lortu da (Dincer et al., 2015; Halene et al., 2016).

HELBURUAK

Giza garun postmortemeko nukleo neuronalen eta ez-neuronalen banaketa eta karakterizazioarako protokolo bat martxan jartzea

- 1 Izoztutako (-80°C-tan) garun laginetatik nukleoak banatzea eta purifikatzea
- 2 Markatzaileen bitartez, isolatutako nukleo neuronalak modu eraginkorrean eta espezifikoan markatzea
- 3 FACS teknikaaren bitartez, isolatutako nukleoei egindako markajearekin esker, nukleo neuronalak eta ez-neuronalak banatzea

IKERKETAREN MUINA

LEHEN EGUNA

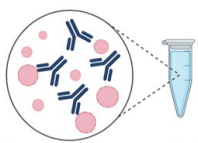
Ehunaren homogenizazioa



600 g 10 minutu



Gainjalkina baztertzen da



Anti-NeuN antigorputz primarioa

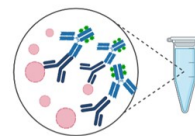
Sakarosa gradientea

0,32 M sakarosa
3 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl
pH=8

Ultrazentrifugazioa
100.000g 2 ordu



Jalkina=Nukleoak



Antigorputz sekundarioa

Inkubazioa gau osoan zehar

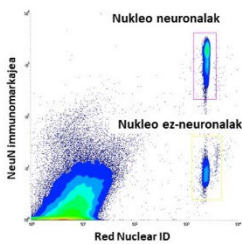
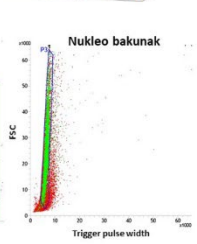
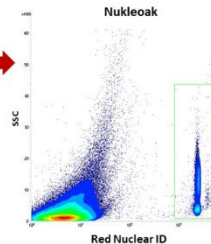
BIGAREN EGUNA

DNAren markajea
Nuclear-ID
Red DNA stain



Garbiketak

BD FACSJazz cell sorter and analyser



1. irudia. Nukleoen erauzketa prozesua eta nukleo neuronal eta ez-neuronalen karakterizazioa eta sailkapena FACS bidez. Lehenengo pausuetan lagina disezionatzen eta homogenizatzen da. Garun ehunetik nukleoak erautzen dira, sakarosa gradiente baten bidez, eta nukleoen markajea NeuN-ri lotzen den antigorputz sekundarioarekin eta DNA-ren markajearekin amaitzen da. Cell sorter-aren bitartez, nukleoak identifikatzen dira eta lagina nukleo neuronalen eta ez-neuronalen banatzen da

ONDORIOAK

- Nukleo neuronal eta ez-neuronalak sailkatzeko metodologia abian dago
- Teknika, ikerketa taldeak kudeatzen duen asaldura psikiatrikoen kohortetan nukleoen banaketa esperimenduak burutzeko prest dago

Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Banandutako nukleoetan batez ere mekanismo epigenetikoak ikertuko dira: DNA metilazioa, ChIP-PCR, sekuentziazioa. Baita geneen adierazpena ere.

Hurrengo esperimenduak burutzeko banaketa prozesuaren optimizazioa eta tekniken eraginkortasuna hobetzea aurreikusten da

ERREFERENTZIAK

Bayer, K., & Jungbauer, A. (2007). *Journal of Biotechnology*, 132, 97-98
Dincer, A. et al (2015). *Translational Psychiatry*, 5, 1-14
Halene, T. B. et al (2016). *Schizophrenia Research*, 170, 235-244