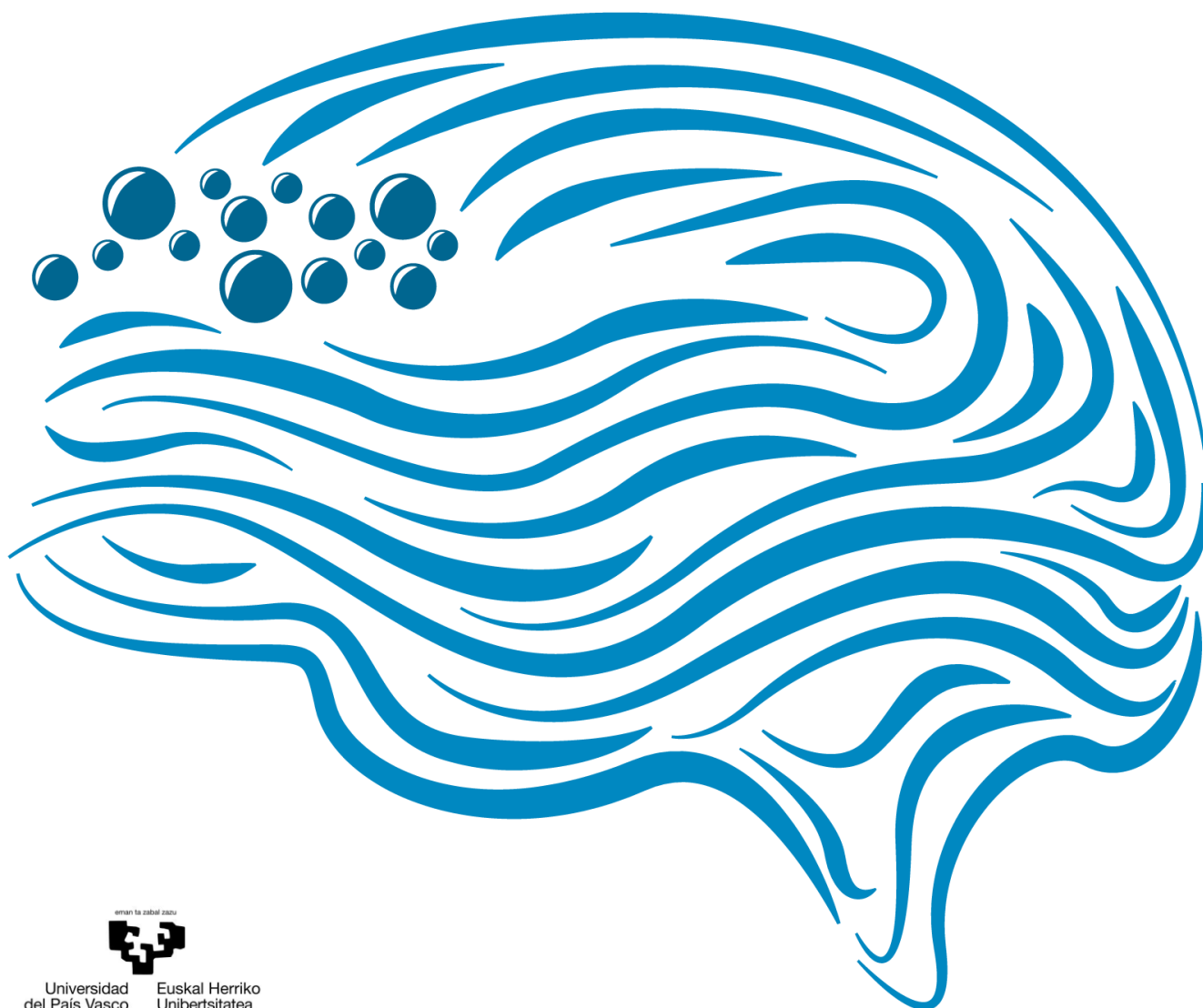


# Estudio de los receptores adrenérgicos $\alpha_2$ y la proteína espinofilina en la corteza prefrontal *postmortem* de sujetos con esquizofrenia

Iria Brocos Mosquera

Tesis Doctoral 2021





## ABREVIATURAS

5hmC : 5-hidroximetilcitosina

5-HT: Serotonina

5mC: 5-metilcitosina

$\alpha$ -AR: Receptores adrenérgicos  $\alpha$

$\alpha_1$ -AR: Receptores adrenérgicos  $\alpha_1$

$\alpha_2$ -AR: Receptores adrenérgicos  $\alpha_2$

$\alpha_{2A}$ -AR: Receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$

$\alpha_{2C}$ -AR: Receptores adrenérgicos  $\alpha_{2C}$

$\beta$ -AR: Receptores adrenérgicos  $\beta$

AC: Adenil ciclasa

Ac: Acetilación

ACH: Acetilcolina

Ach3: Acetilación de la histona H3

Ach3K9: Acetilación en la lisina 9 de la histona H3

Ach3K14: Acetilación en la lisina 14 de la histona H3

Ach3K27: Acetilación en la lisina 27 de la histona H3

Ach3K9K14: Acetilación en la lisinas 9 y 14 de la histona H3

Ach4K5: Acetilación en la lisina 5 de la histona H4

Ach4K16: Acetilación en la lisina 16 de la histona H4

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADRA2: Receptores adrenérgicos  $\alpha_2$

ADRA2A: Receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$

ADRA2C: Receptores adrenérgicos  $\alpha_{2C}$

AID/APOBEC : Deaminasa de citidina inducida por activación/enzima editora de la apolipoproteína B

AKT1: RAC-alfa serina/treonina 1

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AP: Antipsicóticos

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CaMKII : Calcio calmodulina quinasa II

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina

CIE: Clasificación internacional de enfermedades

CNV: Variación en el número de copias

COMT: Catecol O-metiltransferasa

CPF: Corteza prefrontal

CPFDL: Corteza prefrontal dorsolateral

CREB: Elemento de unión de respuesta a AMPc

CRYM: Proteína de unión a la hormona tiroidea regulada por NADP

CYTOC/CYC1: Citocromo c1

DA: Dopamina

DAG: Diacilglicerol

DISC1: Proteína alterada en esquizofrenia 1

DNMT: Gen de la ADN (citosina-5)-metiltransferasa

Dnmt: ADN (citosina-5)-metiltransferasa

DSM: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

EGR1: Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1

ERK: Quinasa reguladora de la señalización extracelular

GABA: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GAD: Ácido glutámico descarboxilasa

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GRIN1: Subunidad 1 del receptor de glutamato NMDA

GLU: Glutamato

GRM2: Receptor metabotrópico de glutamato 2

GWAS: Técnica de asociación del genoma completo

H3K4me3: Trimetilación en la lisina 4 de la histona H3

H3K9me2: Dimetilación en la lisina 9 de la histona H3

H3K27me3: Trimetilación en la lisina 27 de la histona H3

H3R17me: Metilación en la arginina 17 de la histona H3

H3S10P: Fosforilación en la serina 10 de la histona H3

HAT: Histona acetiltransferasa

HCN: Canales catiónicos activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos

HDAC: Histona deacetilasa

HOMER1: Proteína estructural homer 1

HTR5C: Receptor serotonina

IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-trifosfato

IPP: Inhibición prepulso

IVML: Instituto Vasco de Medicina Legal

JMJD2A: Desmetilasa 2A de lisinas de histona

K: Lisina

KCNQ: Canales neuronales de potasio

KCNV1: Subfamilia V del canal dependiente de voltaje de potasio 1

kDa: Kilodalton.

KO: *Knock-out*

LC: Locus coeruleu

LIZ: Rica en leucina e isoleucina

LSD: Dietilamida del ácido lisérgico

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MDH: Malato deshidrogenasa

me: Metilación

me<sub>2</sub>: Dimetilación

me<sub>3</sub>: Trimetilación

mGlu1: Receptores glutamatérgicos metabotrópicos I

NA: Noradrenalina

NF-kB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras  $\kappa$  de las células B activadas

NMDA: N-metil-D-Aspartato

NOS1: Óxido nítrico sintasa 1

NRG-1: Neuregulina 1

OAT: Ornitina aminotransferasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Receptores opioides

P: Fosforilación

P2: Fracción enriquecida en membranas

Pb: Pares de bases

PCP: Fenciclidina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEP: Primer episodio psicótico

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PMD: Intervalo *postmortem*

PP1: Proteína fosfatasa tipo 1

Pre: Fracción presináptica

PSD: Fracción postsináptica

PVALB: Parvalbumina

qRT-PCR: PCR cuantitativa tiempo real

R: Arginina

RELN: Reelina

RGS: Proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G

RSP13: Proteína ribosomal S13

RSP29: Proteína ribosomal S29

RX821002: 2-(2,3-Dihidro-2-metoxi-1,4-benzodioxin-2-il)-4,5-dihidro-1H-imidazol

S: Serina

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SH3: Dominios de homología Src3

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

SOX10: Caja HMG relacionada con SRY

SPA: Ensayo de proximidad de centelleo

SPM: Fracción enriquecida en sinaptosomas

SUMO: *Small ubiquitin related modifier*

SZ: Esquizofrenia

T: Treonina

TDG: Timina-ADN glicosilasa

TET: Tet metilcitosina dioxigenasa

TOMM70A: Subunidad del receptor de importación mitocondrial TOM70

UK14304: 5-Bromo-6-(2-imidazolin-2-ilamino)quinoxalina

Y: Tirosina





# ÍNDICE

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. ESQUIZOFRENIA</b> .....	<b>3</b>
1.1. Aspectos generales.....	3
1.2. Etiopatogenia .....	4
1.2.1. Factores genéticos .....	5
1.2.2. Factores ambientales .....	5
1.2.3. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión .....	6
1.2.3.1. Hipótesis dopaminérgica.....	7
1.2.3.2. Hipótesis serotoninérgica .....	7
1.2.3.3. Hipótesis glutamatérgica .....	8
1.2.3.4. Hipótesis GABAérgica .....	8
1.3. Tratamiento farmacológico de la esquizofrenia .....	8
1.3.1. Antipsicóticos típicos o de primera generación .....	9
1.3.2. Antipsicóticos atípicos o de segunda generación .....	9
1.4. Alteraciones cognitivas en esquizofrenia .....	10
1.4.1. Corteza prefrontal y cognición .....	10
1.4.2. Alteraciones cognitivas en esquizofrenia.....	13
1.4.3. Síntomas cognitivos y tratamiento antipsicótico .....	14
1.5. Alteraciones epigenéticas en esquizofrenia .....	15
1.5.1. Aspectos generales de la epigenética .....	15
1.5.2. Epigenética y cognición .....	19
1.5.3. Epigenética y esquizofrenia.....	20
<b>2. RECEPTORES ADRENÉRGICOS <math>\alpha_2</math></b> .....	<b>22</b>
2.1. Aspectos generales.....	22
2.1.1. Clasificación de los receptores adrenérgicos.....	22
2.1.2. Señalización de los $\alpha_2$ -AR .....	23
2.1.3. Localización de los $\alpha_2$ -AR en el encéfalo .....	24
2.1.4. Funciones de los $\alpha_2$ -AR.....	24
2.2. Receptores adrenérgicos $\alpha_2$ y cognición .....	25
2.3. Receptores adrenérgicos $\alpha_2$ y esquizofrenia.....	27
<b>3. ESPINOFILINA</b> .....	<b>29</b>
3.1. Aspectos generales.....	29
3.1.1. Estructura .....	29

3.1.2.	Localización en el encéfalo .....	30
3.1.3.	Funciones en el encéfalo .....	31
3.2.	Interacción de la espinofilina con receptores .....	32
3.3.	Alteraciones de la espinofilina en esquizofrenia .....	34
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....		<b>37</b>
HIPÓTESIS.....		39
OBJETIVOS.....		39
<b>Sujetos, material y métodos</b> .....		<b>41</b>
1.	MUESTRAS CEREBRALES HUMANAS POSTMORTEM .....	43
2.	MATERIALES .....	46
2.1.	Anticuerpos .....	46
2.2.	Péptido bloqueante .....	48
2.3.	Líneas celulares .....	48
2.4.	Radioligando .....	48
2.5.	Primers o cebadores y sondas.....	48
2.6.	Fármacos y productos utilizados .....	49
3.	MÉTODOS .....	51
3.1.	Western Blot .....	51
3.1.1.	Preparación de la fracción subcelular enriquecida en membranas (fracción P2) ..	51
3.1.2.	Preparación de fracciones subcelulares, fracción presináptica (Pre) y fracción postsináptica (PSD) .....	51
3.1.3.	Preparaciones de las muestras para ensayos de caracterización.....	53
3.1.4.	Técnica de Western Blot.....	55
3.2.	Ensayo de proximidad de centelleo (SPA) .....	57
3.2.1	Preparación de la fracción subcelular enriquecida en membranas (P2) para SPA .	57
3.2.2.	Técnica de SPA .....	58
3.3.	Expresión génica.....	59
3.3.2.	Extracción de ARN y purificación .....	59
3.3.3.	Transcripción inversa .....	60
3.3.4.	Cuantificación de ADNc mediante RT-qPCR .....	61
3.4.	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	63
3.4.2.	Extracción de ADN .....	63
3.4.3.	Cuantificación del ADN inmunoprecipitado mediante RT-qPCR .....	65
3.5.	Análisis estadístico .....	66

<b>Resultados</b> .....	<b>69</b>
ARTÍCULO 1 .....	71
ARTÍCULO 2 .....	81
ARTÍCULO 3 .....	105
ARTÍCULO 4 .....	139
ARTÍCULO 5 .....	151
<b>Discusión</b> .....	<b>165</b>
1. Distribución de los receptores adrenérgicos $\alpha_{2A}$ y $\alpha_{2C}$ en distintas fracciones sinápticas de la CPF humana .....	167
2. Cambios en la expresión y funcionalidad de los receptores adrenérgicos $\alpha_{2A}$ y $\alpha_{2C}$ en la CPF de sujetos con esquizofrenia.....	168
3. Cambios en la expresión génica y epigenética de los genes ADRA2A y ADRA2C en la CPF de sujetos con esquizofrenia .....	173
4. Caracterización de la expresión proteica de espinofilina en cerebro humano .....	176
5. Cambios en la expresión proteica de espinofilina en la CPF de sujetos con esquizofrenia .	177
6. Receptores adrenérgicos $\alpha_{2a}$ y espinofilina en la CPF de sujetos con esquizofrenia .....	179
7. Fortalezas y limitaciones del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral .....	180
<b>Conclusiones</b> .....	<b>185</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>189</b>





# Introducción

---



## 1. ESQUIZOFRENIA

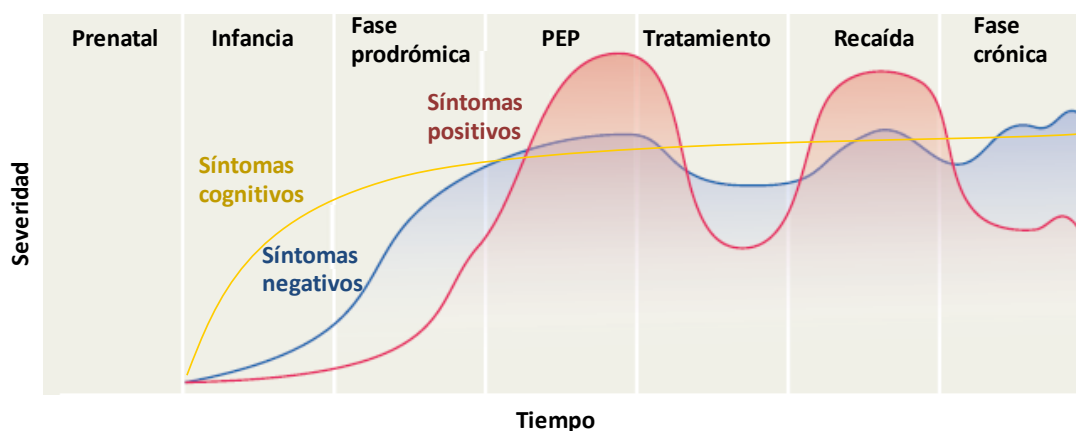
### 1.1. Aspectos generales

La esquizofrenia es una enfermedad crónica e incapacitante que se caracteriza fundamentalmente por una distorsión de la realidad. Esta patología tiene una prevalencia aproximada del 0.7%, afectando a más de 21 millones de personas en todo el mundo. Esto, además, supone un gran coste a nivel sanitario por hospitalizaciones reiteradas, la necesidad de servicios psicológicos y apoyo social (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2020). La esquizofrenia se encuentra entre las diez causas principales de discapacidad por enfermedad en el mundo (Marder & Cannon, 2019) y se estima que es la quinta enfermedad más costosa para la sociedad en términos de atención requerida y pérdida de productividad. Su coste anual en la Unión Europea supera los 29 mil millones de manera directa y, al sumarle los costes indirectos, asciende a más de 90 mil millones (Olesen et al, 2012). Se calcula que los pacientes que la padecen presentan una esperanza de vida 15 años menor que la población general y tienen un riesgo 5-10 veces superior de cometer suicidio (McCutcheon et al, 2020). Esta patología es más frecuente en hombres que en mujeres, con una ratio 1.4:1, siendo los varones los que cursan con síntomas más graves, desarrollan la enfermedad de una manera más temprana y tienen una menor respuesta al tratamiento (OMS, 2020). En hombres la edad de debut suele producirse a finales de la adolescencia o inicio de la etapa adulta, mientras que en mujeres el inicio de la enfermedad se produce al final de la veintena o principio de la treintena (Marder & Cannon, 2019).

La sintomatología presente en la esquizofrenia se recoge mayoritariamente en tres categorías diferentes (Coyle, 2017; Ibrahim & Taminga, 2011; Owen et al, 2016; Tandon et al, 2009):

- Los **síntomas positivos** son los englobados en lo comúnmente llamado psicosis, como son los delirios, alucinaciones, pensamiento y habla desorganizados.
- Los **síntomas negativos** recogen la apatía, anhedonia (pérdida de interés o de la capacidad de sentir placer o satisfacción), alogia (disminución o ausencia del lenguaje espontáneo), aplanamiento afectivo (dificultad o incapacidad de presentar sentimientos o emociones) y retracción social.
- Los **síntomas cognitivos** engloban una serie de disfunciones como problemas de mantenimiento de la atención, velocidad de procesamiento de la información, memoria, aprendizaje verbal y visual, aprendizaje social, resolución de problemas, toma de decisiones, planificación o memoria de trabajo. Estas alteraciones se explican en profundidad en el apartado 1.4.

Los síntomas negativos y cognitivos suelen ser más estables a lo largo de toda la enfermedad, mientras que los síntomas positivos suelen tener una aparición más esporádica, en brotes, contribuyendo a posibles hospitalizaciones y empeoramiento del paciente (Tandon et al, 2009). El inicio de la enfermedad es gradual y tarda varios años en desarrollarse hasta que llega el momento del debut, conocido como primer episodio psicótico (PEP), donde la persona muestra los síntomas positivos iniciales. Previamente a este episodio psicótico van apareciendo los síntomas negativos y cognitivos en lo que se define como la fase prodrómica, en la cual no suele existir un diagnóstico claro. Con la aparición de los síntomas positivos se acentúa el deterioro y la cronicidad de la patología, como se puede observar en la **figura 1** (Insel, 2010; Tandon et al, 2009).



**Figura 1.** Aparición gradual de la sintomatología de la esquizofrenia a lo largo del tiempo. Modificada a partir de una imagen tomada de McCutcheon et al, 2020.

El diagnóstico de la esquizofrenia se basa en los criterios clínicos establecidos en el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-5) publicado en 2013 por la Asociación Estadounidense de Psiquiatría (*American Psychiatric Association, 2013*) o en los que establece la Clasificación internacional de enfermedades (CIE-10) publicada en 1992 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (*World Health Organization, 1992*) (Owen et al, 2016; Van Os & Kapur, 2009).

## 1.2. Etiopatogenia

La esquizofrenia es una patología multifactorial cuya etiología completa se desconoce. Lo que sí se sabe es que tiene cierto componente genético y numerosos factores ambientales influyen en su aparición. Los estudios epidemiológicos y genéticos parecen sugerir que el riesgo de sufrir esquizofrenia es producto de interacciones gen-ambiente (predisposición genética a agresiones ambientales, como se explica a continuación) y del fenómeno de epistasia (fenotipo dependiente de la interacción entre diversos genes) (Comer et al, 2020).



### 1.2.1. Factores genéticos

Gracias a estudios en gemelos se ha podido establecer que existe una elevada heredabilidad de esta patología, puesto que si un gemelo monocigótico desarrolla esquizofrenia, el otro gemelo tiene una probabilidad del 80% de desarrollarla también (Birnbaum & Weinberger, 2017; Imamura et al, 2020; Sullivan et al, 2003). La probabilidad de desarrollar esta patología, si ambos progenitores la padecen, es aproximadamente de un 50%. Al ir disminuyendo el grado de parentesco la probabilidad de padecer esquizofrenia disminuye, pero aún así es mayor que la de la población general (Zhu et al, 2016).

Se han llevado a cabo varios estudios para encontrar un gen candidato que sea el causante de la esquizofrenia; sin embargo, no se ha encontrado un candidato claro. Dichos estudios se han realizado mayoritariamente mediante la técnica de asociación del genoma completo (*genome wide association study*, GWAS), donde se han observado asociaciones con la enfermedad a nivel de polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP) y de variación en el número de copias (*copy number variation*, CNV) en numerosos genes (Birnbaum & Weinberger, 2017; Caldeira et al, 2019; Foley et al, 2017; Van de Leemput et al, 2016). A pesar de no haber encontrado un solo gen candidato, se han asociado varios genes con un mayor riesgo de aparición de esquizofrenia, por lo que se ha sugerido que esta patología es una enfermedad poligénica. Algunos de los genes que se han visto alterados en pacientes con esquizofrenia son NRG-1, COMT, BDNF, DISC1, RGS4 y GRIN1, que codifican proteínas que tienen funciones relacionadas con la sinapsis y la neurogénesis, como son neuregulina 1, catecol O-metiltransferasa, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteína alterada en esquizofrenia 1, regulador 4 de la señalización de la proteína G, subunidad 1 del receptor de glutamato NMDA, respectivamente (Gokhale et al, 2015; Sakata & Duke, 2014; Sekar et al, 2016; Tripathi et al, 2018; Zamanpoor, 2020).

### 1.2.2. Factores ambientales

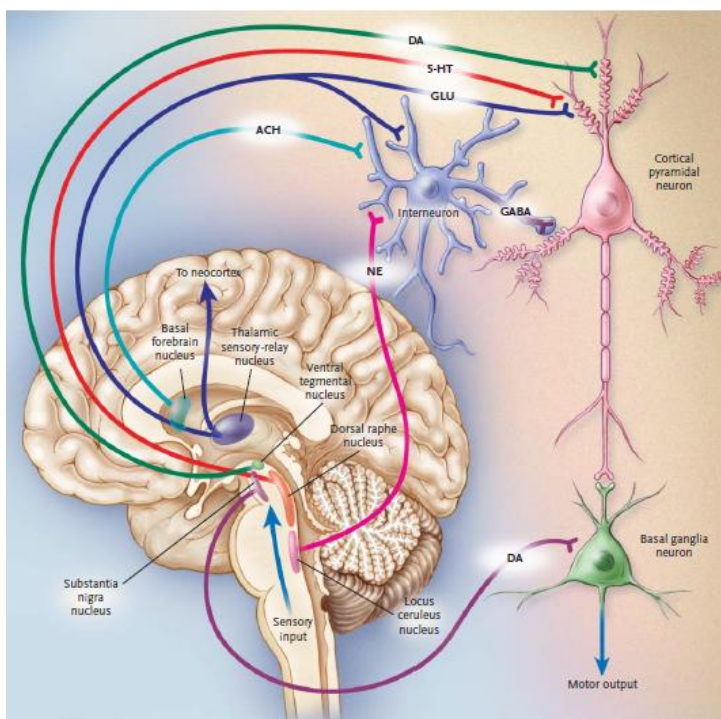
La presencia de alteraciones en los genes relacionados con la aparición de la esquizofrenia causa una predisposición a padecerla. Sin embargo, para que ésta se manifieste es necesaria la presencia de factores ambientales desencadenantes previos al debut de la enfermedad (Stilo & Murray, 2019). Se ha visto que tanto la edad paterna y/o materna avanzada (Lopez-Castroman et al, 2010; Malaspina et al, 2002), como la existencia de infecciones maternas durante el embarazo (Aguilar-Valles et al, 2020; Karlsson & Dalman, 2020), la desnutrición materna o problemas obstétricos perinatales son factores que favorecen la aparición de esquizofrenia. Además, vivir en un ambiente urbano, pertenecer a una clase social baja o a una minoría social también son factores de riesgo. Asimismo, cuando a edad temprana ocurren vivencias como traumas infantiles o el consumo de drogas, como el cannabis, durante la

adolescencia (Dunn et al, 2020) también pueden ser factores desencadenantes de la patología (Van Os & Kapur 2009; Zamanpoor, 2020).

Por otra parte, se han observado también cambios estructurales asociados con la esquizofrenia. Las modificaciones más destacables son la reducción del volumen cortical, con una reducción del tamaño del lóbulo frontal y los lóbulos temporales, habiendo una pérdida de materia gris y un aumento del volumen ventricular (Hirjak et al, 2016; Laskaris et al, 2016). Estas modificaciones se han correlacionado con una pérdida de células piramidales (Garey et al, 1998), interneuronas (Dienel & Lewis, 2019) y una mala organización de la arborización neuronal, así como con alteraciones en la migración y diferenciación neuronal (Glantz & Lewis, 2000; Kolluri et al, 2005; Krajcovic et al, 2019). Estos eventos se pueden relacionar con una disminución de las funciones corticales, algunas de las cuales, deberían alcanzar su máximo desarrollo a la edad de aparición de la esquizofrenia (Coffman et al, 2016; Cui et al, 2016; Yin et al, 2012).

### 1.2.3. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión

Las alteraciones observadas en la esquizofrenia se han relacionado con variaciones en varios sistemas de neurotransmisión, como se puede ver en la **figura 2** (Benes, 2010; Landek-Salgado et al, 2016). A consecuencia de ello, a lo largo de la historia se han establecido diferentes hipótesis para tratar de explicar la etiopatogenia de esta enfermedad.



**Figura 2. Circuitos neuronales y neurotransmisores implicados en la etiopatogenia de la esquizofrenia, como dopamina (DA), serotonina (5-HT), glutamato (GLU), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), acetilcolina (ACH) y noradrenalina (NA). Tomada de Freedman, 2003.**

### 1.2.3.1. Hipótesis dopaminérgica

Esta hipótesis fue la primera que se propuso para explicar el origen de la esquizofrenia. A principios de los años 50 Laborit y Deniker utilizaron por primera vez un fármaco, la clorpromazina, para tratar la psicosis de manera eficaz en psicosis agudas y agitación maníaca. A finales de los años 60, Van Rossum describió el efecto antagonista dopaminérgico de estos fármacos y, a principios de los años 70, Seeman y Kapur propusieron que la potencia de los antipsicóticos se correlacionaba con su ocupación de los receptores D<sub>2</sub>. Además, a finales de esta década, Carlsson observó que la psicosis inducida por ciertas drogas, como las anfetaminas y la cocaína, provocaban un aumento de dopamina en la sinapsis (Madras, 2013).

Todo ello llevó a la conclusión de que en la esquizofrenia existe un desequilibrio dopaminérgico. Primero se observó una hiperdopaminergia mesolímbica responsable de los síntomas positivos y, posteriormente, se determinó la existencia de una hipodopaminergia cortical, responsable en parte de los síntomas negativos y cognitivos (Davis et al, 1991). Sin embargo, esta es una visión simplificada de la enfermedad y no explica todo lo que se observa en ella, puesto que los síntomas negativos y cognitivos no mejoran con fármacos que inhiben la recaptación de dopamina a nivel cortical (Davis et al, 1991; Yamaguchi et al, 2015).

### 1.2.3.2. Hipótesis serotoninérgica

El inicio de esta teoría se basó en la observación de que el consumo de LSD (dietilamida del ácido lisérgico) causa efectos similares a las alucinaciones producidas en la esquizofrenia. Como la estructura química de esta sustancia es similar a la serotonina, se propuso que este neurotransmisor podría estar implicado en la etiopatogenia de la enfermedad (Woolley & Shaw, 1954). Mediante estudios de fijación de radioligandos se estableció que diferentes sustancias alucinógenas tenían afinidad por el receptor 5-HT<sub>2A</sub> y su unión a este receptor era la causa de los efectos alucinógenos que provocaban (Glennon et al, 1984).

La aparición de un nuevo tipo de fármaco antipsicótico, la clozapina, mostró una mayor eficacia para tratar la esquizofrenia (explicado en el apartado 1.3.). Este compuesto posee una mayor afinidad por el receptor 5-HT<sub>2A</sub> que por el D<sub>2</sub> (Meltzer & Massey, 2011). A partir de estas observaciones se hipotetizó que la serotonina tenía un efecto inhibitorio sobre la dopamina en la corteza y, como resultado, aumentaría la hipodopaminergia cortical. Por lo que el uso de antipsicóticos atípicos que bloquearan el receptor 5-HT<sub>2A</sub> (explicados en el apartado 1.3.) produciría una reversión de este efecto inhibitorio sobre la transmisión dopaminérgica a nivel cortical, y con ello, mejorarían los síntomas negativos de la patología (Baumeister & Hawkins, 2004).

En esta línea, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente la existencia de un aumento de la expresión de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> de alta afinidad en la corteza prefrontal (CPF) de sujetos con esquizofrenia (Muguruza et al, 2013). Además los receptores 5-HT<sub>2A</sub> mostraron una hiperfuncionalidad en la CPF de sujetos con esquizofrenia y una mayor señalización a través de la proteína G $\alpha$ <sub>i1</sub> (García-Bea et al, 2019).

#### 1.2.3.3. Hipótesis glutamatérgica

Los efectos provocados por la fenciclidina (PCP) y la ketamina dieron lugar al inicio de esta teoría. La PCP, una droga alucinógena, y la ketamina, un anestésico usado en el ámbito veterinario, presentan efectos disociativos. Ambos compuestos son antagonistas del receptor de glutamato N-metil-D-Aspartato (NMDA) y pueden producir, a dosis bajas e infra-anestésicas, psicosis transitoria, disminución de las capacidades cognitivas y alteración del estado afectivo; lo que se asemeja a la sintomatología de la esquizofrenia (Krystal et al, 2005).

Se han descrito numerosas alteraciones en el sistema glutamatérgico en pacientes con esquizofrenia, como una alteración de niveles de glutamato en varias áreas cerebrales o diferencias en la expresión de los distintos tipos de receptores glutamatérgicos (Meador-Woodruff & Healy, 2000). Por otra parte, hay que destacar la presencia de receptores NMDA en los circuitos reguladores de la liberación de dopamina, por lo que una desregulación en el sistema glutamatérgico podría dar como resultado las alteraciones dopaminérgicas que se han observado en la esquizofrenia (Javitt, 2010).

#### 1.2.3.4. Hipótesis GABAérgica

Algunos estudios han demostrado una disminución de la síntesis (a través de la enzima ácido glutámico descarboxilasa [GAD]) y de la liberación de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en la CPF y en el núcleo accumbens en esquizofrenia, lo que podría contribuir a las alteraciones de este sistema en la enfermedad (Huang & Akbarian, 2007). Además, en otras áreas cerebrales, como el hipocampo o la amígdala, se ha descrito una menor presencia de proteínas recaptadoras de GABA en pacientes con esquizofrenia (Lewis et al, 2008; Steiner et al, 2016).

### **1.3. Tratamiento farmacológico de la esquizofrenia**

Los fármacos antipsicóticos son la base farmacológica actual para tratar la esquizofrenia. Junto a la toma de estos fármacos, los sujetos que padecen esta patología se deben someter, habitualmente, a psicoterapia para mejorar su calidad de vida. Los fármacos antipsicóticos, también llamados neurolépticos, son generalmente eficaces para tratar los síntomas positivos. Sin embargo, frente a los síntomas negativos no muestran apenas eficacia y, en cuanto a los

síntomas cognitivos tampoco los mejoran e, incluso, pueden empeorarlos (explicado en el apartado 1.4.3) (Freedman, 2003; Jarskog et al, 2007; McCutcheon et al, 2020).

Los antipsicóticos se clasifican en dos grandes grupos: antipsicóticos típicos y antipsicóticos atípicos.

### 1.3.1. Antipsicóticos típicos o de primera generación

Son potentes antagonistas del receptor dopaminérgico  $D_2$ . Estos fármacos dan lugar a una alta ocupación de estos receptores mejorando los síntomas positivos presentes en la patología. Sin embargo, también conllevan la aparición de efectos secundarios como los síntomas extrapiramidales al ocupar los receptores  $D_2$  situados en la vía dopaminérgica nigroestriatal, y la hiperprolactinemia, por la ocupación de estos receptores en la vía tuberoinfundibular. Algunos de los fármacos pertenecientes a esta generación son la clorpromazina (Delay & Deniker, 1955) (primer antipsicótico, sintetizado en 1950), el haloperidol y la levopromazina (Freedman, 2003; Jarskog et al, 2017; Maric et al, 2016).

### 1.3.2. Antipsicóticos atípicos o de segunda generación

Se caracterizan por mostrar una menor afinidad por los receptores  $D_2$ , además de antagonizar el receptor  $5HT_{2A}$ . Ello induce una menor frecuencia de aparición de los efectos secundarios generados por los antipsicóticos típicos, principalmente los efectos extrapiramidales. Además, este tipo de antipsicóticos muestran afinidad por otro tipo de receptores como pueden ser los receptores serotoninérgicos  $5HT_{1A}$  o  $5HT_{2C}$ , los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  o  $\alpha_2$  o los receptores dopaminérgicos  $D_1$  o  $D_3$  (Jarskog et al, 2017; Maric et al, 2016). La clozapina fue el primer fármaco de esta generación, sintetizado en 1990, y actualmente sigue siendo el más eficaz. Sin embargo, puede producir la aparición de agranulocitosis como efecto adverso, por lo que no suele ser el antipsicótico de primera elección, dado que requiere una vigilancia estrecha con una monitorización del paciente midiendo diversos parámetros sanguíneos (Marder & Cannon, 2019). Otros antipsicóticos de esta familia son risperidona, olanzapina o quetiapina. Estos fármacos provocan efectos secundarios diferentes, principalmente el síndrome metabólico asociado a aumento de peso o aumento de los niveles de colesterol, que originan un aumento del riesgo cardiovascular del paciente (Coyle, 2017; Freedman, 2003; Jarskog et al, 2017).

Ante la existencia de pacientes no respondedores a la medicación, en muchas ocasiones se les prescribe un aumento de dosis por encima de las dosis recomendadas o un segundo antipsicótico (en más del 75% de las personas diagnosticadas con esquizofrenia). La efectividad de estas medidas no está demostrada de manera empírica (Marder & Cannon, 2019; Samara et

al, 2018). Por otra parte, además de estar tratados con antipsicóticos, los pacientes suelen estar polimedicados con otro tipo de fármacos como son antidepresivos o benzodiazepinas (Freedman, 2003; Samara et al, 2018). En la actualidad, el tratamiento de elección suele ser los antipsicóticos atípicos. Sin embargo, alrededor de un 30-40% de pacientes son resistentes al tratamiento (Elkis & Buckley, 2016).

#### **1.4. Alteraciones cognitivas en esquizofrenia**

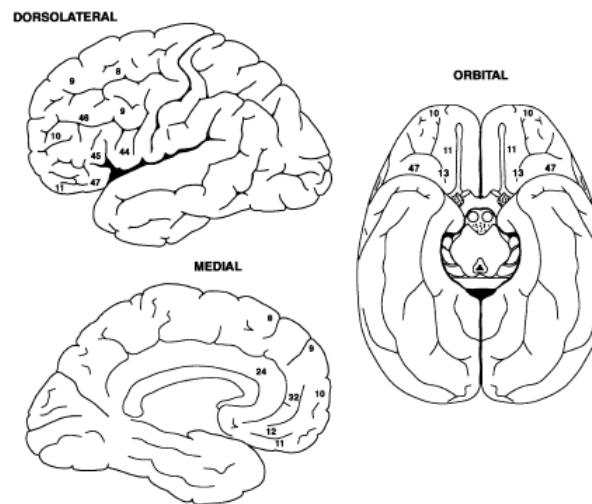
Los déficits cognitivos causan una disfunción importante en los sujetos con esquizofrenia, dado que son una de las causas por las que estas personas no tienen autonomía ni pueden ejercer un empleo fácilmente. Estos síntomas, como ya se ha explicado anteriormente (apartado 1.3.), no sufren una mejoría significativa con los fármacos antipsicóticos que existen actualmente. Por ello, es necesario conocer en profundidad cómo funciona la cognición en el cerebro humano y cómo ésta se encuentra alterada en la esquizofrenia, para intentar conseguir un tratamiento más adecuado para tratar estos déficits.

##### **1.4.1. Corteza prefrontal y cognición**

La CPF es la región cerebral encargada de regular las funciones cognitivas y está más desarrollada en humanos que en la otra especie animal que la posee, los primates. Se encuentra en la zona frontal del cerebro y está conectada con numerosas regiones cerebrales como son el tálamo, el sistema límbico, los ganglios basales, el hipocampo y otras áreas de la corteza tanto frontal como parietal o temporal (Teffer & Semendeferi, 2012).

La CPF se compone de tres áreas diferentes (Fuster, 2001), como se puede observar en la **figura 3**:

- La **CPF ventromedial** está involucrada en los procesos emocionales.
- La **CPF orbitofrontal** es la encargada de inhibir impulsos o conductas inapropiadas.
- La **CPF dorsolateral** (CPF<sub>DL</sub>) lleva a cabo las funciones de cognición, atención, y la mayoría de funciones ejecutivas, como la memoria de trabajo, memoria a corto plazo y organización temporal.



**Figuras 3. Áreas de la CPF con los números correspondientes a la clasificación de Brodmann.**  
Tomada de Fuster, 2001.

En humanos y primates no humanos, la CPFDL es el principal sustrato anatómico de las actividades cognitivas, especialmente de la memoria de trabajo, representando un componente básico de las funciones ejecutivas. La CPFDL posee capacidad para inhibir información irrelevante ajustando la conectividad cortical a las demandas de cada tarea, guiando así el pensamiento, el comportamiento, las emociones, inhibiendo las conductas inapropiadas y permitiendo planificar el futuro.

Se ha descrito que la CPF es muy sensible a la liberación de catecolaminas, pero con ciertas diferencias entre regiones. Mientras que la CPF ventromedial parece ser más sensible a la serotonina (5-HT), la CPFDL está más influenciada por la dopamina (DA) y la noradrenalina (NA) (Hains & Arnsten, 2009; Topolov & Getova, 2016). Estos dos últimos neurotransmisores tienen un gran peso en la memoria de trabajo, de la cual se encargan principalmente los receptores de la familia  $D_1$  ( $D_1$  y  $D_5$ ) (Arnsten et al, 2017; Vijayraghavan et al, 2016) y los receptores adrenérgicos  $\alpha$  ( $\alpha$ -AR).

Los sistemas monoaminérgicos y sus neurotransmisores (DA, NA y 5-HT) modulan la relación señal:ruido en varias áreas cerebrales, como la CPF, en situaciones como el estrés, el ciclo sueño/vigilia y la motivación. Además, los cuerpos celulares de estos sistemas monoaminérgicos, que se encuentran en los núcleos del tronco cerebral, sufren un control “Top-Down” a través de las proyecciones de las neuronas de la CPFDL (Robbins & Arnsten, 2009). Gracias a este control “Top-Down” se modifica la señalización neuronal mediante la prolongación o acortamiento del disparo neuronal.

Para un funcionamiento adecuado de la memoria de trabajo son necesarios unos niveles adecuados de DA en la CPFDL, ya que este neurotransmisor tiene un efecto en “U invertida”. Si hay un bloqueo de receptores  $D_1$  o una deplección de DA, se observan déficits en la memoria de

trabajo (Brozoski et al, 1979; Sawaguchi & Goldman-Rakic, 1991). Inversamente, un aumento de DA o un exceso de actividad de los receptores D1 también causa déficits en las funciones cognitivas de la CPFDL (Vijayraghavan et al, 2007). La enzima catecol-orto-metil-transferasa (COMT) puede presentar una variante polimórfica que causa un cambio en los niveles corticales de DA, por lo que las personas que tienen dicha variante son más susceptibles a sufrir alteraciones en la memoria de trabajo (Robbins & Arnsten, 2009). La hipodopaminergia cortical observada en la esquizofrenia podría deberse a una hipoactividad de las células glutamatérgicas de la CPFDL cuyas proyecciones llegan a los núcleos del tronco cerebral (Lewis & González-Burgos, 2008). Sin embargo, un modelo animal de psicosis producido por antagonistas NMDA, ha mostrado una hiperexcitabilidad en las neuronas piramidales de la corteza frontal provocando un aumento de la liberación de DA cortical, cuya diana principal serían las interneuronas GABAérgicas (López-Gil et al, 2009). Estos resultados que pueden parecer contradictorios, podrían explicarse por el efecto opuesto que pueden causar los antagonistas NMDA sobre células piramidales. Es decir, se inhibirían las “*Delay cells*” (neuronas que tienen un disparo neuronal persistente, por lo que hay una excitación sin un estímulo) y se desinhibirían las “*Response cells*” (neuronas que disparan tras un estímulo sensorial, para desencadenar una respuesta motora, o tras recibir una respuesta motora) (Wang et al, 2013). Los déficits de la memoria de trabajo en esquizofrenia se pueden deber al efecto inhibitorio sobre las neuronas de la capa III de la corteza. Se conoce que tanto antipsicóticos típicos como el haloperidol, que son antagonistas de los receptores D2, o antagonistas de los receptores D1, causan déficits en la memoria de trabajo y aprendizaje asociativo en primates y, que los agonistas de los receptores D1 revierten el efecto de los antipsicóticos (Aleman & de Haan, 2000; Puig & Miller, 2012).

Otras funciones de la CPFDL como la memoria de aprendizaje, la impulsividad o la atención, son controladas por el sistema serotoninérgico a través de varios subtipos de receptores (Williams et al, 2003; Celada et al, 2013). Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> se encuentran en los conos axónicos de las células piramidales. Mientras, los 5HT<sub>2A</sub> están principalmente en las dendritas apicales de estas células, aunque también se encuentran en interneuronas GABAérgicas, provocando efectos inhibitorios o, en las neuronas glutamatérgicas de la capa V, produciendo efectos estimulatorios. Los antipsicóticos atípicos son antagonistas de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, dando lugar a una modulación de la 5-HT cortical y de la actividad de este neurotransmisor sobre los receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Celada et al, 2013). No obstante, agonistas del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, como el LSD, dan lugar a modelos farmacológicos de psicosis debido a su carácter alucinógeno, mientras que existen otros agonistas 5-HT<sub>2A</sub>, análogos del LSD, que no poseen esta capacidad alucinógena. En nuestro grupo se ha estudiado esta disyuntiva, observando que los agonistas 5-HT<sub>2A</sub> no alucinógenos señalizan a través de las proteínas  $G\alpha_q$  en la CPFDL humana, mientras que los agonistas alucinógenos lo hacen a través de estas proteínas  $G\alpha_q$  pero, también lo hacen a



través de las proteínas  $G\alpha_{i/o}$  (García-Bea et al, 2019). Además, se ha visto que la supersensibilidad de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en sujetos con esquizofrenia se debe a un incremento del estado de alta afinidad, acoplado a proteínas  $G\alpha_{i1}$  (Muguruza et al, 2013; García-Bea et al, 2019).

El sistema noradrenérgico tiene un rol fundamental en la regulación de las funciones cognitivas en la CPFDL (Robbins & Arnsten, 2009). La influencia de la NA sobre la CPFDL también sigue un efecto en "U invertida" (Arnsten et al, 2012), provocando una regulación fina de los procesos cognitivos. Esto provoca que tanto si no hay suficiente NA como si hay demasiada, pueda haber una alteración de la cognición, pudiendo dar lugar a déficits cognitivos (Arnsten, 2009). El tono noradrenérgico sobre las células piramidales de la capa III, en condiciones basales, es regulado por los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ -AR) postsinápticos (esto será explicado más en detalle en el apartado 2.2.) (Arnsten & Goldman-Rakic, 1985; Arnsten et al, 2012). Sin embargo, cuando hay un exceso de NA, este neurotransmisor se une a los  $\alpha_1$ -AR y a los adrenoceptores  $\beta$  ( $\beta$ -AR) por los cuales tiene una menor afinidad. En humanos, los  $\alpha_2$ -AR se encuentran en las capas I y III de la corteza (Grijalba et al, 1996), mientras que en roedores estos receptores se encuentran sobre todo en las capas IV y V de la corteza (Franowicz et al, 2002). Con el uso de agonistas selectivos  $\alpha_{2A}$ -AR, como la guanfacina, se ha observado una mejora de la memoria de trabajo regulada por la CPFDL. Por el contrario, cuando se han utilizado agonistas  $\alpha_2$ -AR no selectivos, como la clonidina, no se observó ningún efecto en la memoria de trabajo (Arnsten & Goldman-Rakic, 1985). No obstante, si las vías presinápticas se encuentran dañadas, el efecto de la guanfacina es mayor y, mutaciones en el subtipo  $\alpha_{2A}$ -AR han mostrado un empeoramiento cognitivo (Arnsten & Goldman-Rakic, 1985; Franowicz et al, 2002). En cuanto a los  $\alpha_1$ -AR, el uso de agonistas de este receptor ha provocado un deterioro de la memoria de trabajo, mientras que la utilización de antagonistas ha protegido de los deterioros causados por el estrés o las adicciones (Arnsten, 2009; Arnsten, 2011). Además, los  $\alpha_1$ -AR se coexpresan con los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en las células piramidales (Santana et al, 2013) y son antagonizados por la acción de los antipsicóticos atípicos, lo cual podría contribuir a su acción terapéutica.

#### 1.4.2. Alteraciones cognitivas en esquizofrenia

Los síntomas cognitivos parecen ser el núcleo de la esquizofrenia. Aparecen antes de que se manifiesten el resto de síntomas y provocan una alteración de las funciones cognitivas antes de que la enfermedad sea diagnosticada (Kahn & Keefe, 2013). En ningún caso los síntomas positivos o negativos de la esquizofrenia son los causantes de los déficits cognitivos, sino que estos ya están presentes con anterioridad. Además, los síntomas cognitivos pueden ser un

predictor de cómo podría ser la readaptación social del sujeto tras el diagnóstico de la enfermedad (Luck et al, 2019).

Gracias a la aportación de numerosas investigaciones sabemos que existe una hipoactivación de la CPFDL en sujetos con esquizofrenia cuando están realizando actividades de reconocimiento o memoria, actividades de cifrado semántico y en todas las actividades que requieren una actividad cognitiva alta (Achim & Lepage, 2005; Guo et al, 2019; Lett et al, 2014). Las alteraciones cognitivas más importantes en esta patología se producen en los campos de la memoria de trabajo, atención, aprendizaje verbal y visual, memoria, velocidad de procesamiento, cognición social, razonamiento y resolución de problemas (Adhikari et al, 2019; Harvey & Isner, 2020).

#### 1.4.3. Síntomas cognitivos y tratamiento antipsicótico

Los fármacos antipsicóticos actuales no son eficaces para tratar los síntomas cognitivos y, además, pueden llegar a empeorarlos. Se han realizado diversos estudios para analizar el efecto de los antipsicóticos, típicos o atípicos, en las capacidades cognitivas de sujetos con esquizofrenia (Benes et al, 1985; Kasper & Resinger, 2003; Meshul et al, 1992), en proteínas asociadas a estas funciones en CPF (Lidow et al, 2001; Uranova et al, 1991), y las alteraciones producidas por estos antipsicóticos en los receptores por los que muestran afinidad (Kim et al, 2012b; Vincent et al, 1994). En varios estudios se ha visto una ausencia de mejoría (Lett et al, 2014; McCutcheon et al, 2020) o un empeoramiento de las capacidades cognitivas debido a dosis altas de antipsicóticos, tanto típicos como atípicos, (Nielsen et al, 2015; Veselinovic et al, 2019) o debido al uso continuado durante un periodo largo de tiempo de estos fármacos (Husa et al, 2017).

Por un lado, los fármacos antipsicóticos típicos, que solamente parecen ser eficaces en el tratamiento de los síntomas positivos, pueden contribuir al empeoramiento de la cognición (Nielsen et al, 2015; Pandurangi & Buckley, 2020). Además, los síntomas negativos como la disforia, que los antipsicóticos de primera generación no logran mejorar, pueden contribuir a la reducción de la actividad cognitiva. A esto se le añade que el consumo de anticolinérgicos, para paliar los síntomas extrapiramidales que producen estos antipsicóticos típicos, da lugar a un empeoramiento de la memoria y del aprendizaje (Ibrahim & Tamminga, 2011). En este sentido, Vincent y colaboradores, describieron un aumento de terminales GABAérgicos que interactuaban con las neuronas piramidales de la corteza frontal en ratas tratadas con haloperidol. Este efecto podría provocar una inhibición sobre los receptores dopaminérgicos y, empeorar así, la hipofunción cortical dopaminérgica y aumentar, de este modo, los síntomas cognitivos (Vincent et al, 1994).

Por otro lado, un estudio valoró el efecto de los antipsicóticos atípicos sobre las funciones cognitivas de pacientes con esquizofrenia donde se observó que había mejora en algunos de los test para probar diferentes funciones cognitivas. Para llegar a este punto en casi todos los grupos incluidos en el estudio era necesario estar tratados un periodo largo, pudiendo llegar incluso a 1 año, para ver una mejoría en estas funciones (Kraguljac et al, 2015).

En diversos estudios han relatado cómo al producirse una intervención temprana de la enfermedad, las funciones cognitivas se ven menos afectadas. Esto serviría para atenuar su deterioro, mejorar la respuesta al tratamiento, tanto con antipsicóticos típicos como atípicos, e incluso, frenar el empeoramiento cognitivo (Nørbak-Emig et al, 2016; Omachi & Sumiyoshi, 2018).

Sin embargo, todas estas mejoras descritas en los diferentes estudios no se vieron trasladadas a la vida cotidiana de los sujetos, ya que sigue habiendo una deficiencia en la vida ocupacional y/o social de las personas que padecen esquizofrenia (Fleischhacker et al, 2014; Insel, 2010). Por tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos que sean efectivos frente a estos síntomas cognitivos en la esquizofrenia, para que los pacientes tengan una mejor calidad de vida y se reduzca su coste social (Jin & Mosweu, 2017).

## **1.5. Alteraciones epigenéticas en esquizofrenia**

Diversos estudios han demostrado que las alteraciones epigenéticas pueden tener un papel importante en el origen y la evolución de la esquizofrenia (Cariaga-Martinez et al, 2016; Gavin & Akbarian, 2012; Ibi & González-Maeso, 2015; Kavhari & Cairns, 2020; Punzi et al, 2018; Richetto & Meyer, 2021; Smigielski et al, 2020; Thomas, 2017).

### 1.5.1. Aspectos generales de la epigenética

La epigenética es el estudio de los cambios que provocan la activación o inactivación de la transcripción de genes sin cambiar la secuencia de ADN. Estas modificaciones pueden ser hereditarias o pueden deberse a factores ambientales (Bohacek & Mansuy, 2013; Sui et al, 2012).

La cromatina se organiza en unas estructuras que se denominan nucleosomas. Cada uno de ellos está formado por un tetrámero de histonas H3 y H4 y dos dímeros de histonas H2A y H2B. Todo ello se encuentra rodeado por dos vueltas de ADN y una porción de ADN que sobresale de este octámero y se une a la histona H1, que actúa como estabilizadora del ADN. Estas unidades básicas de la cromatina tienen un tamaño de ~150pb, pesando ~300kDa (Barrachina et al, 2012). En función de las modificaciones que pueda haber en los nucleosomas la cromatina puede estar en dos estados reversibles, mostrados en la **figura 4** (Maze et al, 2013):

- **Heterocromatina o cromatina inactiva:** el ADN está unido al octámero de histonas para que no pueda acceder la maquinaria transcripcional, por lo que estos genes están inactivados.
- **Eucromatina o cromatina activa:** el ADN está abierto y hay espacio para que la maquinaria transcripcional se pueda unir a él y, potencialmente, los genes que se encuentran en esa secuencia de ADN se puedan transcribir.

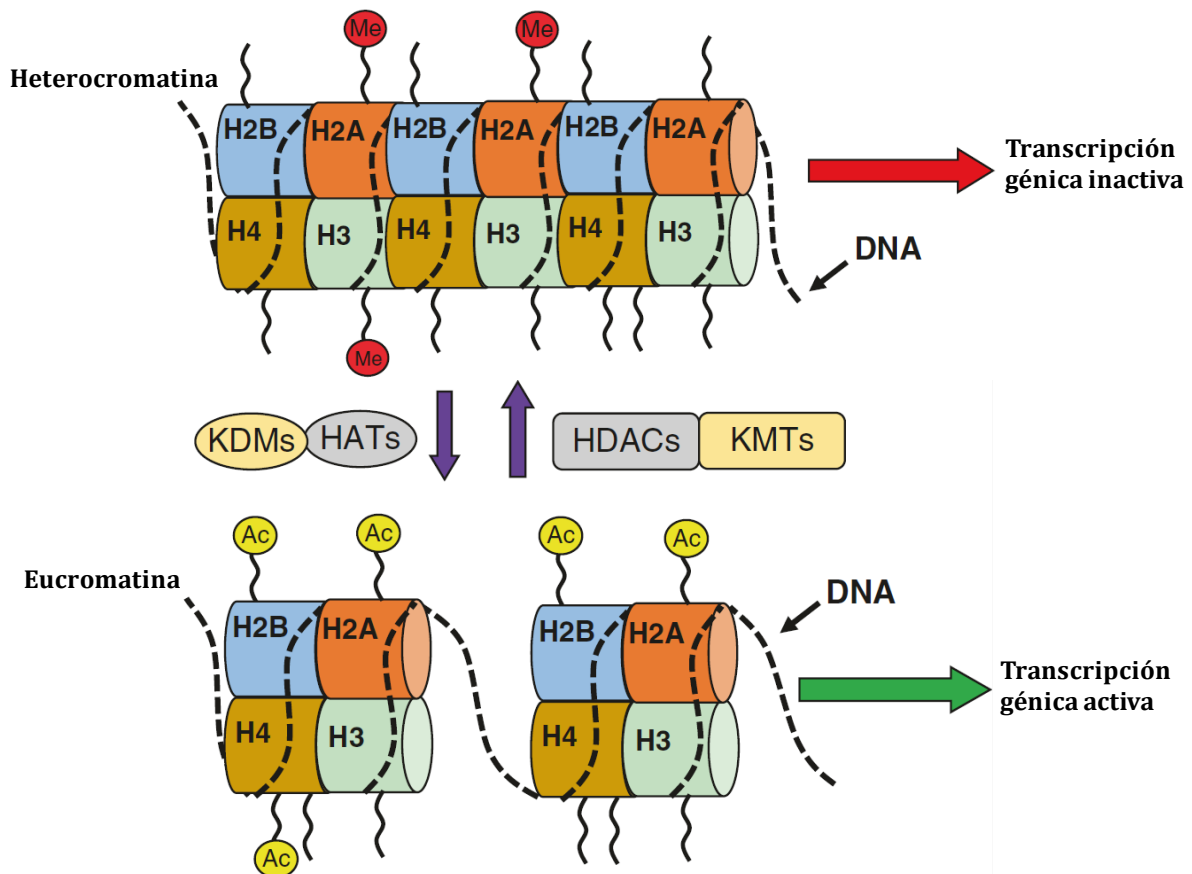


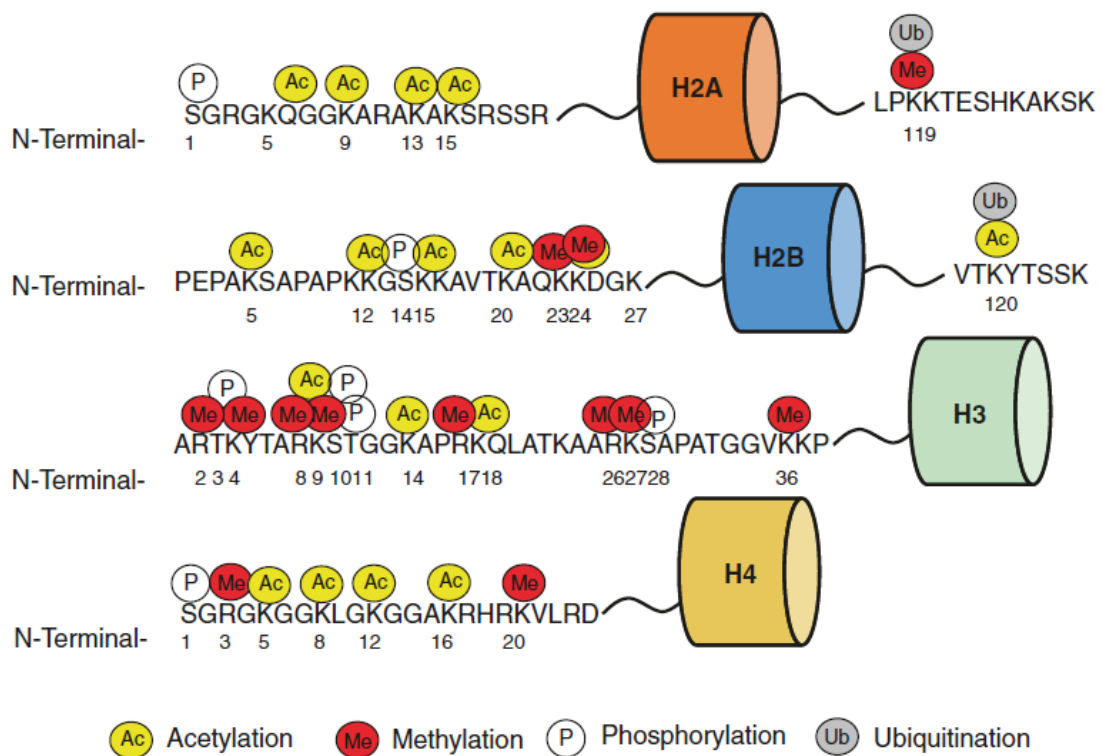
Figura 4. Activación o inactivación de la cromatina debido a modificaciones epigenéticas (acetilación o metilación). Modificada a partir de una imagen tomada de Thomas, 2017.

Tanto el ADN como las histonas pueden sufrir modificaciones que varíen el estado de la cromatina (Ibi & González-Maeso, 2015; Mitchell et al, 2014; Nestler et al, 2016; Thomas, 2017), como se puede ver en la **figura 5**. A continuación se explican las posibles modificaciones (Gavin & Akbarian, 2012; Gürel et al, 2020; Xin et al, 2012):

1. **Metilación del ADN:** Se metila la citosina del grupo CpG. Fue la primera modificación epigenética descrita y, es especialmente importante en las islas CpG de las secuencias promotoras de genes para mantenerlos silenciados (Gürel et al, 2020). Este patrón de metilación se transmite entre las células al dividirse y, por esta razón, se encuentra muy relacionado con diferentes tipos de cáncer. Las enzimas encargadas de llevar a cabo esta

metilación son las metilasas específicas que se conocen como Dnmt1 (mantiene la metilación), Dnmt2 y Dnmt3 (encargada de la metilación *de novo*). Para eliminar estos grupos metilos pueden actuar varias enzimas, principalmente TETs (tet metilcitosina dioxigenasas), AID/APOBEC (deaminasa de citidina inducida por activación/enzima editora de la apolipoproteína B) y TDG (timina-ADN glicosilasa). Estas enzimas oxidan a 5mC (5-metilcitosina), transformándolo en 5hmC (5-hidroximetilcitosina) y, de este modo, se produce la liberación de la citosina del ADN y se forma una nueva no metilada.

2. **Metilación de histonas:** Se produce la unión de uno, dos o tres grupos metil (me, me<sub>2</sub> o me<sub>3</sub>) en el N-terminal de lisinas (K) o argininas (R). Esta modificación puede ser represiva o permisiva, en función del residuo metilado y de las proteínas que dicha marca epigenética permita unirse. Por ejemplo, la marca H3K4me<sub>3</sub> (trimetilación en la lisina 4 de la histona H3) es una marca permisiva mientras que H3K27me<sub>3</sub> (trimetilación en la lisina 27 de la histona H3) es una marca represiva. La unión de estos grupos metilos es llevada a cabo por las enzimas metiltransferasas específicas para modificar ciertos residuos y su eliminación se produce por las enzimas desmetilasas, para las cuales también hay diferentes tipos según el residuo sobre el que actúen.
3. **Acetilación de histonas:** Se da la unión de un grupo acetyl (Ac) en el N-terminal de lisinas (K). La unión de este grupo acetyl a la lisina neutraliza la carga de este residuo facilitando la descondensación del ADN y permitiendo la transcripción génica. Esta modificación es añadida por las enzimas histona acetiltransferasas (HAT) y eliminada por las enzimas histona deacetilasas (HDAC).
4. **Fosforilación de histonas:** Se une un grupo fosfato (P) en las serinas (S), treoninas (T) o tirosinas (Y) en el N-terminal de las histonas a través de quinazas. Esta modificación neutraliza la carga positiva del aminoácido provocando la separación entre éste y el ADN y, con ello, su apertura permitiendo la unión de la maquinaria transcripcional. La eliminación de esta marca es realizada por las enzimas fosfatasas.
5. **Ubiquitinización de histonas:** Se produce la unión entre una lisina de las histonas H2A o H2B y una proteína llamada ubiquitina, que consta de 76 aminoácidos, mediante la activación consecutiva de tres enzimas E1, E2 y E3. Cuando la histona H2A se ubiquitina impide que se pueda unir la maquinaria transcripcional, en contraposición, si la unión se produce en la histona H2B favorece la transcripción génica. Su eliminación es llevada a cabo por enzimas deubiquitinizantes.
6. **Sumolación de histonas:** Se une a las lisinas (K) una proteína denominada SUMO (*small ubiquitin related modifier*), formada por 100 aminoácidos, que interacciona con otros complejos proteicos reprimiendo la transcripción génica.
7. **Deiminación de histonas:** Las argininas (R) pasan a citrulinas para que no puedan ser reconocidas por las metiltransferasas y, por lo tanto, no se pueden metilar.



**Figura 5. Tipos de modificaciones epigenéticas y los residuos de las histonas del nucleosoma sobre las que estas pueden ocurrir. Tomada de Thomas, 2017.**

Además de estas modificaciones, hay diferentes mecanismos que pueden contribuir al efecto de la epigenética sobre la transcripción génica:

- **Impronta genética:** Es un proceso biológico mediante el cual los genes están expresados de manera diferente según el origen paterno o materno, ya que estas marcas se generan en la gametogénesis, y por lo tanto son heredables. Esto sirve principalmente para reducir la expresión de uno de los alelos, en función de su origen paterno o materno (Bohacek & Mansuy, 2013; Lee et al, 2019).
- **Cross-talk:** Es la capacidad que tiene una modificación epigenética de influir en la aparición o no aparición de otra. Hay modificaciones epigenéticas que tienen efecto sumatorio, como la acetilación de K5, K8 y K12 en la histona H4, que son favorecidas cuando el residuo R3 de la histona H4 está metilado y, todo ello, lleva a la activación de la cromatina (Kouzarides, 2007).
- **Cromatina bivalente:** Es un proceso epigenético en el que la cromatina tiene a la vez marcas permisivas y represivas en equilibrio y, la llegada de otra marca epigenética o la eliminación de una de las existentes, provoca la modificación de la cromatina hacia un estado activo o inactivo. Esta cromatina bivalente se encuentra asociada a secuencias de promotores con regiones ricas en CpG, es decir, a islas CpG (Peter & Akbarian, 2011).

En patologías neurológicas como Alzheimer o Parkinson, se ha visto que hay otros factores que también varían el estado de las marcas epigenéticas, como pueden ser el sexo (Gilbert et al, 2019; Huang et al, 2007; Labrie et al, 2012; Mill et al, 2008) o la edad (Gilbert et al, 2019; Nativio et al, 2018; Tang et al, 2011).

### 1.5.2. Epigenética y cognición

Los diferentes estudios que relacionan cognición y alteraciones epigenéticas tienen como objetivo la identificación de alteraciones en marcas epigenéticas en promotores de genes que intervienen en funciones cognitivas o, en las enzimas encargadas de modificar dichas marcas (Jakovcevski et al, 2015).

En modelos animales se ha descrito que los mecanismos epigenéticos pueden alterar la memoria y el aprendizaje. Estos estudios se realizaron bajo el condicionamiento del miedo, donde se observó un aumento transitorio de H3K4me3 durante el aprendizaje asociativo y un aumento de H3K9me2 mantenido en el tiempo en promotores de genes como DNMT3a y BDNF. La proteína fosfatasa tipo 1 (PP1) interviene en la modificación del estado de la cromatina en promotores de genes como CREB (elemento de unión de respuesta a AMPc) o NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas), y a su vez interacciona con enzimas como HDAC1 y JMJD2A (desmetilasa 2A de lisinas de histona), provocando que la cromatina esté inactiva. Sin embargo, la inactivación de la PP1 permite la activación de la cromatina y da lugar a un aumento de H3S10P y AcH3K14 en el promotor de CREB, facilitando su transcripción. Cabe destacar que el CREB es un factor de transcripción involucrado en aprendizaje y memoria (Koshibu et al, 2009). También se ha visto que el estrés aumenta la expresión de HDAC2 y, esta sobreexpresión causa deficiencias en la formación de la memoria y en la plasticidad sináptica, provocando anomalías en la cognición (Ibi et al, 2017). Con estos datos, tanto inhibidores de HDAC (Guan et al, 2009; Rudenko & Tsai, 2014) como inhibidores de PP1 podrían mejorar el aprendizaje y la memoria.

También se ha estudiado la posible implicación de otras enzimas, como las Dnmt, cuya disminución en neuronas corticales puede provocar una menor expresión de reelina y, con ello, una alteración de la migración neuronal, la plasticidad sináptica y la formación de la memoria (Lubin et al, 2011).

Para mantener un buen control sobre la memoria y el aprendizaje es fundamental, por una parte, una regulación coordinada en la acetilación de histonas que permitan la transcripción génica para regular estas funciones (Sui et al, 2012) y, por otra parte, la existencia de cambios en la metilación del ADN y en promotores de genes, como COMT y HOMER1 (proteína estructural homer 1), que puedan tener un impacto en la consolidación de la memoria. Además, se ha visto

que un aumento del aprendizaje puede inducir el aumento de la actividad de TET1 y este aumento de actividad favorece la formación de memoria (Jarome & Lubin, 2014).

En este contexto, se han encontrado ejemplos de *cross-talk* mostrando que la metilación de H3K4 correlaciona de manera negativa con la metilación del ADN y, un aumento de H3K4me3 en los promotores de BDNF y EGR1 (proteína de respuesta de crecimiento temprano 1) causa una disminución de H3K9me2, provocando que la cromatina se active y dichos genes se puedan transcribir (Gupta-Agarwal et al, 2012).

La mayoría de la investigación relacionada con epigenética se ha realizado mediante estudios GWAS, dando una mayor probabilidad de asociar variaciones genéticas a alteraciones o patologías. De este modo, se encontraron alteraciones epigenéticas en varios genes relacionados con funciones cognitivas. En muchos casos estos estudios se han centrado en la región cromosómica 22q13.2, donde se han encontrado numerosas alteraciones que causan déficits cognitivos y, algunos de los genes situados en dicha región están involucrados en patologías psiquiátricas, como puede ser la esquizofrenia (Ohi et al, 2018).

### 1.5.3. Epigenética y esquizofrenia

No existen muchos estudios que relacionen epigenética y esquizofrenia, por lo que hay poco conocimiento previo en este campo. Sin embargo, sí existen algunos estudios donde se muestran alteraciones en pacientes con esquizofrenia de algunas marcas epigenéticas o de las enzimas involucradas en su colocación o desaparición.

La gran mayoría de estudios se centran en cambios de metilación del ADN en los promotores de algunos genes, como una hipermetilación en el promotor de RELN (reelina) (Alladi et al, 2018), SOX10 (caja HMG relacionada con SRY) (Khavari & Cairns, 2020), GAD1 (Ovenden et al, 2018); hipometilación del promotor BDNF IV en corteza frontal de sujetos con esquizofrenia (Smigielski et al, 2020); o cambios en la metilación en la CPF de islas CpG de genes asociados con la esquizofrenia y el neurodesarrollo como NOS1 (óxido nítrico sintasa 1), AKT1 (RAC-alfa serina/treonina 1), DNMT1 y SOX10 (Punzi, 2018). No obstante, también hay estudios que se han centrado en cambios producidos en las modificaciones epigenéticas de las histonas, como un aumento de la marca permisiva AcH3K9K14 en los promotores de GAD1, HTR5C (receptor serotonina) y TOMM70A (subunidad del receptor de importación mitocondrial TOM70) (Tang et al, 2011). En otro estudio se ha descrito un aumento de H3R17me causando la disminución de la expresión de varios genes con funciones metabólicas como CRYM (proteína de unión a la hormona tiroidea regulada por NADP), MDH (malato deshidrogenasa), OAT (ornitina aminotransferasa) y CYTOC/CYC1 (citocromo c1) en la CPF de sujetos con esquizofrenia (Darby & Sabuncian, 2014). También se ha observado una disminución de AcH3K9 en diferentes



promotores como en GAD1, PVALB (parvalbumina), KCNV1 (subfamilia V del canal dependiente de voltaje de potasio 1) como resultado de un aumento de HDAC1 (Thomas, 2017). Asimismo, se ha descrito una relación entre el aumento de la metilación en H3R17 con el aumento cortical de HDAC1 y de metiltransferasas de histonas, así como una disminución de HDAC2 en la CPF de sujetos con esquizofrenia (Khavari & Cairns, 2020; Richetto & Meyer, 2021). Además, se observó una desregulación en los niveles de H3K4me3 y H3K27me3 en numerosos genes en células de epitelio olfatorio de sujetos con esquizofrenia (Gürel et al, 2020; Kano et al, 2013).

A lo descrito anteriormente se le añade la existencia de alteraciones en marcas epigenéticas debidas al tratamiento antipsicótico (Mahgoub & Monteggia, 2013; Ovenden et al, 2018). Kurita y colaboradores describieron una disminución de Ach3 y un aumento de H3K27me3 en el promotor de GRM2 (receptor metabotrópico de glutamato 2), acompañados de una menor expresión de su ARNm, en sujetos con esquizofrenia tratados con clozapina (Kurita et al, 2012). Además, Ibi y colaboradores señalaron como el tratamiento crónico con clozapina dio lugar a un aumento de HDAC2 debido a una mayor expresión de NF-kB (Ibi et al, 2017).

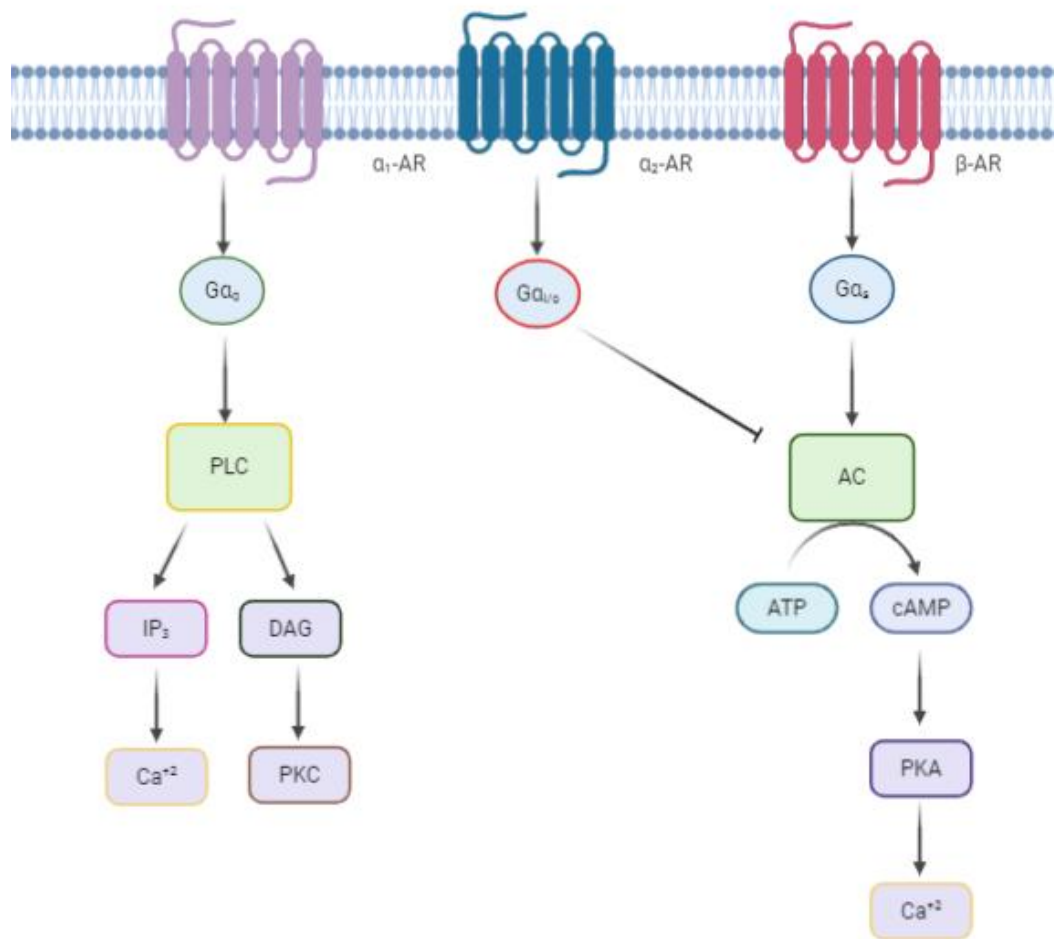
## 2. RECEPTORES ADRENÉRGICOS $A_2$

### 2.1. Aspectos generales

#### 2.1.1. Clasificación de los receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos son receptores de membrana acoplados a proteínas G, que se encuentran distribuidos en diversos tejidos, tanto del SNC como periféricos. Estos receptores forman parte del sistema noradrenérgico y se clasifican en dos familias debido a su señalización, estructura y propiedades farmacológicas: los receptores adrenérgicos  $\alpha$  y los receptores adrenérgicos  $\beta$  (Hein & Kobilka, 1995; Ramos & Arnsten, 2007). A continuación se explica su señalización, ilustrada en la **figura 6**:

- **Receptores adrenérgicos  $\alpha$  ( $\alpha$ -AR)** subdivididos en dos grandes grupos,  $\alpha_1$ -AR y  $\alpha_2$ -AR.
  - **Receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  ( $\alpha_1$ -AR)**: se acoplan principalmente a proteínas  $G\alpha_q$  que activan la fosfolipasa C (PLC) y ésta da lugar al desencadenamiento de diversas cascadas intracelulares. Por una parte, se activa el inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) que provoca un aumento de  $Ca^{+2}$ . Por otra parte, se activa el diacilglicerol (DAG) y este modula la acción de la proteína quinasa C (PKC) involucrada en diferentes rutas intracelulares. Dentro de este tipo de receptores se diferencian tres subtipos  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - y  $\alpha_{1D}$ -AR.
  - **Receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ -AR)**: su vía canónica de señalización es a través de las proteínas  $G\alpha_{i/o}$  (explicada más en profundidad en el apartado 2.1.2.). Encontramos tres subtipos,  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ -, y  $\alpha_{2C}$ -AR cuyos genes se encuentran en los cromosomas 10, 2 y 4 respectivamente. Cabe destacar que las secuencias de estos tres subtipos tienen una alta homología. Estos receptores se explicarán en profundidad en los siguientes apartados, puesto que son la base del estudio de esta Tesis Doctoral (**Resultados- Artículos, 1, 2 y 3**).
- **Receptores adrenérgicos  $\beta$  ( $\beta$ -AR)**: se unen, principalmente, a las proteínas  $G\alpha_s$ , provocando una activación de la adenil ciclasa (AC) desencadenando la apertura de canales de  $K^+$ , un aumento del AMPc intracelular y de la actividad de la proteína quinasa A (PKA), y un aumento de  $Ca^{+2}$ , dando lugar a la puesta en marcha de diferentes mecanismos intracelulares. Dentro de esta familia encontramos tres subtipos de receptores denominados  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - y  $\beta_3$ -AR.



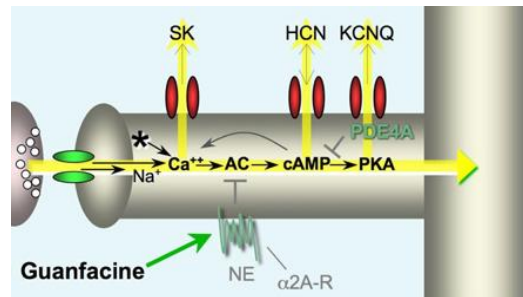
**Figura 6. Cascada de señalización de  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - y  $\beta$ -AR.**

### 2.1.2. Señalización de los $\alpha_2$ -AR

La señalización de los  $\alpha_2$ -AR comienza con la unión a las proteínas  $G\alpha_{i/o}$ , provocando la inhibición de la AC que da lugar a la disminución del AMPc; esto provoca una inhibición de la PKA con la consiguiente bajada del  $Ca^{+2}$  intracelular y, con ello, la inhibición de mecanismos intracelulares (Lu & Ordway, 1997). En caso de que la concentración del agonista sea muy alta, estos receptores se pueden unir a la proteína  $G\alpha_s$ , provocando un aumento de la actividad de la AC (Qu et al, 2019).

En la CPF se ha observado que los  $\alpha_{2A}$ -AR postsinápticos, mediante su inhibición de la AC, disminuyen los niveles de AMPc bloqueando los canales catiónicos activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) y provocando así, un aumento de la actividad de la PKA y del disparo neuronal tardío (Arnsten et al, 2012). Cuando los canales HCN y KCNQ (canales neuronales de potasio) están abiertos provocan un aumento del AMPc y la

activación de la PKA como se ve en la **figura 7** (Arnsten & Jin, 2012). Los canales HCN son numerosos en las espinas dendríticas de la capa III de la CPF de primates y colocalizan con los  $\alpha_{2A}$ -AR. Cuando se estimulan estos receptores se produce un aumento en el disparo neuronal, mientras que al bloquear los  $\alpha_{2A}$ -AR este disparo disminuye. Sin embargo, a pesar de que los  $\alpha_{2A}$ -AR sigan bloqueados, si se bloquean los canales HCN este disparo neuronal vuelve a la normalidad (Arnsten & Wang, 2016).



**Figura 7.** Interacción de los  $\alpha_2$ -AR con los canales HCN y KCNQ y su efecto en el disparo neuronal. Tomada de Arnsten & Jin, 2012.

#### 2.1.3. Localización de los $\alpha_2$ -AR en el encéfalo

Los  $\alpha_2$ -AR se encuentran en prácticamente todas las regiones del encéfalo. El subtipo  $\alpha_{2A}$ -AR es el mayoritario en el encéfalo, mientras que el subtipo  $\alpha_{2B}$ -AR tiene una baja presencia, relegada casi exclusivamente al tálamo. El subtipo  $\alpha_{2C}$ -AR parece ser el subtipo más numeroso en el núcleo caudado, con una menor presencia en otras regiones del encéfalo como en el hipocampo, la CPF, el hipotálamo, el bulbo olfatorio, y en otros ganglios basales (Flügge et al, 2003; Grijalba et al, 1996; Pazos et al, 1988).

A nivel subcelular, estos receptores están presentes en las membranas sinápticas de las neuronas, principalmente. En primates, se ha determinado que el subtipo  $\alpha_{2A}$ -AR se encuentra mayoritariamente en la membrana postsináptica de neuronas noradrenérgicas (Ji et al, 2008), aunque también hay cierta presencia en las membranas presinápticas (Schlicker & Feuerstein, 2017). Además de encontrarse en las membranas de neuronas, se ha descrito la presencia de  $\alpha_{2A}$ -AR en membranas de astrocitos, del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático rugoso (Aoki et al, 1998).

#### 2.1.4. Funciones de los $\alpha_2$ -AR

Los  $\alpha_2$ -AR llevan a cabo diferentes funciones, como el control de la presión arterial (Moura et al, 2012), control de la glucosa en sangre (Gilsbach & Hein, 2012), analgesia (Brede et al, 2004), secreción endocrina (Fornai et al, 1990), cognición y memoria de trabajo (Arnsten et al, 1996; Brede et al, 2004; Kawaura et al, 2014), ciclo sueño-vigilia (Fornai et al, 1990), respuesta termogénica (Bill et al, 1989) o control de la liberación de NA (Brede et al, 2004).

Por una parte, se ha visto que, los  $\alpha_2$ -AR presinápticos, pueden inhibir la liberación de neurotransmisores, principalmente NA y DA, (Devoto et al, 2001) y también puede inhibir el disparo neuronal (Aoki et al, 1994). Por otra parte, se ha observado que agonistas que actúan sobre los  $\alpha_2$ -AR a nivel postsináptico pueden desencadenar una mejora cognitiva mediante la disminución de AMPc en la CPF. Esta disminución de AMPc produce un aumento de la excitabilidad piramidal que conlleva una hiperpolarización por el cierre de canales (Arnsten et al, 2012).

Se ha visto que la inhibición de la recaptación de NA a nivel presináptico en CPF es más lenta cuando está mediada por el subtipo  $\alpha_{2C}$ -AR que cuando se realiza mediante el subtipo  $\alpha_{2A}$ -AR (Uys et al, 2017b). Asimismo, se ha visto que su activación puede causar un aumento de DA cortical (Bücheler et al, 2002). No obstante, un estudio realizado en cerebro de ratón, mostró que el subtipo  $\alpha_{2C}$ -AR es necesario para la regulación inhibitoria de la liberación de NA, DA y 5-HT (Trendelenburg et al, 2001; Uys et al, 2017a).

## 2.2. Receptores adrenérgicos $\alpha_2$ y cognición

Como ya se ha explicado anteriormente (apartado 1.4.1.), el sistema noradrenérgico realiza un control fino de la cognición mientras que los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico realizan un control más grueso sobre estas funciones cognitivas. Los  $\alpha_2$ -AR son los encargados de este control cuando hay unos niveles de NA normales. Esta relación entre los  $\alpha_2$ -AR y la cognición comenzó a investigarse a mediados de los años 80 mediante la manipulación farmacológica. Se observó una mejora cognitiva en primates ancianos tratados con clonidina, agonista  $\alpha_2$ -AR, y se vio un empeoramiento cognitivo al someterse a tratamiento con yohimbina, antagonista  $\alpha_2$ -AR (Arnsten & Goldman-Rakic, 1985). Estos estudios probaron que los  $\alpha_2$ -AR tienen un gran peso en el control de las funciones cognitivas. Esta regulación de las funciones cognitivas parece llevarse a cabo mediante la activación de los  $\alpha_{2A}$ -AR (Arnsten & Wang, 2016) y de los  $\alpha_{2C}$ -AR (Galeotti et al, 2004; Uys et al, 2017a).

La NA actúa sobre los  $\alpha_2$ -AR postsinápticos de la CPF y se relaciona con la memoria espacial (Li & Mei, 1994; Li et al, 1999). No obstante, agonistas de los  $\alpha_2$ -AR pueden mejorar la cognición de manera indirecta modulando la liberación de DA en la CPF y controlando el exceso de NA que puede producirse por la acción de los  $\alpha_1$ -AR, en situaciones patológicas como el estrés (Arnsten, 1997), cuyo exceso puede empeorar procesos cognitivos. En este punto, los  $\alpha_{2A}$ -AR presinápticos de las células piramidales pueden dar lugar a la activación de circuitos inhibitorios (Arnsten & Wang, 2016), causando una inhibición de la liberación de NA y del disparo neuronal (Ramos et al, 2006). A esto hay que añadir que, cambios en la síntesis del AMPc, mediada por receptores adrenérgicos, puede beneficiar a aspectos cognitivos. Por una parte, los  $\alpha_{2A}$ -AR producen una disminución del AMPc, lo que conlleva el cierre de los canales HCN y fortalece el

disparo neuronal tardío (Wang et al, 2007a) y de este modo, favorece la memoria de trabajo. Por otra parte, los  $\beta$ -AR provocan un aumento de AMPc, que participa en la consolidación de la memoria y la potenciación a largo plazo (Ramos et al, 2006), puesto que la activación de la vía de señalización AMPc/PKA mejora la memoria a largo plazo. La desinhibición de esta vía puede tener efectos cognitivos más marcados con el aumento de la edad, puesto que animales viejos son más sensibles a los cambios de actividad de la PKA (Ramos et al, 2003). Estos mecanismos de regulación dan lugar a una mejora de la conectividad sináptica favoreciendo la funcionalidad de los microcircuitos de la CPF, mejorando así las respuestas cognitivas. Esto también puede regular otras funciones como la atención, el comportamiento y la inteligencia emocional, a través del circuito CPF-hipocampo (Ramos et al, 2006).

Para poder afinar más el papel de los  $\alpha_2$ -AR en la cognición, se han realizado numerosos estudios observando diferencias al utilizar distintos tipos de fármacos, como la guanfacina, con mayor afinidad por los  $\alpha_{2A}$ -AR que por los  $\alpha_{2C}$ -AR, o la clonidina, también agonista  $\alpha_2$ -AR pero con una afinidad muy similar por ambos subtipos, o la propia NA, que tiene más afinidad por los  $\alpha_{2C}$ -AR que por los  $\alpha_{2A}$ -AR (Brosda et al, 2014; Coull, 1994; Uys et al, 2017a). Los agonistas  $\alpha_2$ -AR, clonidina y la guanfacina, han mostrado una mejora cognitiva, de la atención o impulsividad, al actuar sobre los  $\alpha_{2A}$ -AR postsinápticos (Kawaura et al, 2014). La clonidina puede proteger la memoria de trabajo de las distracciones aumentando la actividad tardía de la CPF o suprimiendo la información irrelevante (Franowicz & Arnsten, 1999). Sin embargo, la guanfacina actuando sobre los  $\alpha_{2A}$ -AR postsinápticos en las neuronas de la CPF, aumenta el disparo neuronal que desencadena la memoria de trabajo (Kim et al, 2012a) e inhibe la producción de AMPc aumentando el control cognitivo del comportamiento (Arnsten & Jin, 2012). Además, la guanfacina da lugar a menos efectos secundarios, ya que el efecto de sedación e hipotensión es menor (Franowicz & Arnsten, 1999; Friedman et al, 2004). Esto es debido a que a mayor afinidad de los agonistas por los  $\alpha_{2A}$ -AR, mejoran las funciones cognitivas y muestran una menor cantidad de efectos adversos (Arnsten et al, 1996; Arnsten & Wang, 2016). No obstante, parece que la clonidina es más activa sobre los receptores presinápticos que la guanfacina (Arnsten et al, 1988) y que, dosis bajas de clonidina, puede dar lugar a una mejora cognitiva gracias a su acción sobre estos  $\alpha_{2A}$ -AR presinápticos (Arnsten, 1997) o por una disminución de la liberación de NA en el locus coeruleus (LC) (Jäkälä et al, 1999). En contraposición, se ha establecido la posibilidad de que un antagonista  $\alpha_{2A}$ -AR a dosis bajas pueda mejorar la memoria de trabajo mediante un aumento de la estimulación de NA postsináptica (Arnsten, 1997). Este mismo efecto se obtuvo al bloquear los  $\alpha_{2C}$ -AR, en cambio, su activación tiene un efecto negativo en la cognición, (Kalkman & Loetscher, 2003).

Estudios con animales han mostrado el efecto *in vivo* que pueden tener estos compuestos, acercándonos más a la realidad de cuál sería su efecto fisiológico. Por una parte, se

observó que primates con mutaciones en el  $\alpha_{2A}$ -AR no mostraban mejoría en la memoria de trabajo tras tratarlos con guanfacina (Franowicz & Arnsten, 1999). Además, primates tratados con agonistas  $\alpha_{2A}$ -AR mostraron una protección frente a estímulos de distracción, por lo que estos fármacos mejoraron la atención y memoria en los test cognitivos a los que fueron sometidos (Arnsten & Contant, 1992). Por otra parte, estudios realizados con dos compuestos antagonistas de  $\alpha_{2C}$ -AR mostraron una mejora cognitiva en roedores. El compuesto ORM-10921 produjo una menor inmovilidad, una mayor interacción social y el aumento de DA en la CF (Sallinen et al, 2013) causando una mejora cognitiva en ratas (Uys et al, 2017a). El compuesto OR-12741 dio lugar a una mejora en la memoria de trabajo, el aprendizaje espacial, la navegación y la memoria (Uys et al, 2017b). Por lo tanto, la activación de los subtipos  $\alpha_{2A}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR podría tener una función opuesta sobre la cognición, como parece suceder con la sedación que se produce al activar los  $\alpha_{2A}$ -AR mientras que cuando se activan los  $\alpha_{2C}$ -AR, se revierte este efecto (Sallee et al, 2013).

### 2.3. Receptores adrenérgicos $\alpha_2$ y esquizofrenia

En la esquizofrenia existe una hipodopaminergia cortical (explicado en el apartado 1.2.3.1) que sumada a las alteraciones en el sistema noradrenérgico en la CPFDL, ha dado lugar a la hipótesis de este trabajo, la existencia de una alteración en la funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR. Se ha observado que en la esquizofrenia hay una disminución de NA en la CPF, lo que podría contribuir a los déficits cognitivos que se presentan en esta patología (Friedman et al, 1999). Esto podría ser la causa principal de los síntomas cognitivos que sufren los sujetos con esquizofrenia.

No existen muchos estudios en los que se evalúen los  $\alpha_2$ -AR en esquizofrenia *in vitro* con tejido humano. Un estudio realizado en plaquetas de sujetos con esquizofrenia mostró una disminución de estos receptores en dichas plaquetas (Rice et al, 1984). En algunos trabajos que analizan enfermedades psiquiátricas se estudian las plaquetas porque comparten origen embrionario con las neuronas y son fáciles de conseguir (Asor & Ben-Shachar, 2012). Por otra parte un estudio realizado en diferentes regiones cerebrales, como el hipocampo y la CPF, no observó cambios de expresión de los  $\alpha_2$ -AR en sujetos con esquizofrenia (Klimek et al, 1999). Además otro estudio no encontró ninguna diferencia entre sujetos con esquizofrenia y sujetos controles ni a nivel de densidad ni de afinidad en los  $\alpha_2$ -AR en la CPF (Dean, 2003). Sin embargo, estos estudios evaluaron los  $\alpha_2$ -AR sin diferenciar su localización sináptica y/o el subtipo. A esta información, se le suma la existencia de dos polimorfismos en la región reguladora del gen ADRA2A que dan cierta susceptibilidad a la aparición de la esquizofrenia (Lochman et al, 2013). No obstante, en estudios *in vivo*, se utilizó la prueba de la inhibición prepulso (IPP), test que evalúa la atención y alteraciones cognitivas, y en ella se vio que ratones KO para el subtipo  $\alpha_{2A}$ -

Estudio de  $\alpha_2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

AR respondieron de una manera exagerada a este test, mientras que los ratones KO para los  $\alpha_{2C}$ -AR no respondieron a dicha IPP (Lähdesmäki et al, 2004; Sallinen et al, 1998).

La mayoría de los estudios que han aportado información en este campo han usado diversos compuestos como herramienta farmacológica para poder determinar la relación entre los  $\alpha_2$ -AR y los síntomas cognitivos presentes en la esquizofrenia. En numerosos estudios se vio que tanto la clonidina como la guanfacina, presentaron mejoras en procesos cognitivos de la CPF de sujetos con esquizofrenia (Arnsten, 2004; Brosda et al, 2014; Jin et al, 2007). Por contra, antagonistas de los  $\alpha_{2C}$ -AR presinápticos podrían hacer que se libere mayor cantidad de NA a la sinapsis y aumente la señalización en las neuronas piramidales de la CPFDL y con ello la cognición, como parece ocurrir con el compuesto ORM-10921. Este antagonista  $\alpha_{2C}$ -AR mostró una mejora cognitiva y efectos antipsicóticos, tanto en síntomas cognitivos como positivos, en un modelo animal de esquizofrenia (Uys et al, 2016).

En la esquizofrenia se ha visto una disminución de NA en la corteza frontal que se asocia con un deterioro en la memoria de trabajo y del aprendizaje (Bridge et al, 1985; Friedman et al, 1999; Goldman-Rakic, 1987; Sara & Herve-Minvielle, 1995). La clorpromazina, antipsicótico atípico, manifestó la capacidad de bloquear los  $\alpha_2$ -AR de las plaquetas, por lo que dio lugar a un aumento de NA (Langer, 1977; Rice et al, 1984). Este aumento de NA, también se notificó con el antagonismo de los  $\alpha_2$ -AR e inhibidores de la recaptación de NA que produjeron una mejora en la disfunción cognitiva de la esquizofrenia (Brosda et al, 2014).

Además, el uso combinado de idazoxan, antagonista  $\alpha_2$ -AR, y racloprida, antagonista del receptor  $D_2$ , mostró unos efectos similares a la clozapina (Marcus et al, 2005), pero con una menor ocupación de los receptores  $D_2$ , por lo que daría lugar a menos efectos secundarios asociados a estos receptores (Uys et al, 2017b). La mirtazapina, antidepresivo antagonista de los  $\alpha_2$ -AR, dio lugar a una mejoría de la sintomatología positiva y negativa en la esquizofrenia (Abassi et al, 2010) por un aumento de NA y DA en la CPF, acompañado de una mejora en la atención y en la velocidad de procesamiento (Brosda et al, 2014; Maletic et al, 2017). La administración combinada de mirtazapina y risperidona, antipsicótico atípico, mostró una mejora en la sintomatología cognitiva en sujetos con esquizofrenia (Cho et al, 2011).

Los fármacos antipsicóticos atípicos, antagonistas  $\alpha_2$ -AR con mayor afinidad por los  $\alpha_{2C}$ -AR que por los  $\alpha_{2A}$ -AR (Kalkman & Loetscher, 2003), demostraron en algunos estudios una mejora en la cognición, la funcionalidad social y aspectos sensorimotrices de modelos animales de esquizofrenia (Uys et al, 2017b).

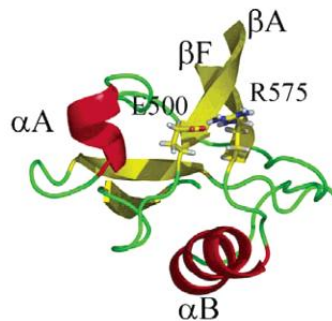


### 3. ESPINOFILINA

#### 3.1. Aspectos generales

##### 3.1.1. Estructura

La espinofilina es una proteína del citoesqueleto que consta de 817 aminoácidos y tiene un peso molecular de 89.6 kDa, pese a que en un gel SDS-PAGE su aparición puede estar entre 90 y 130 kDa (Sato et al, 1998). Esta proteína está codificada por el gen PPP1R9B que se encuentra en la región cromosómica 17q21.33 y consta de 10 exones (Sarrouilhe et al, 2006). La espinofilina es una proteína ácida, cuyo punto isoeléctrico es 4.6. Tiene una estructura de hélice superenrollada, lo que provoca que tenga una solubilidad baja como muestra la **figura 8** (Allen et al, 1997).

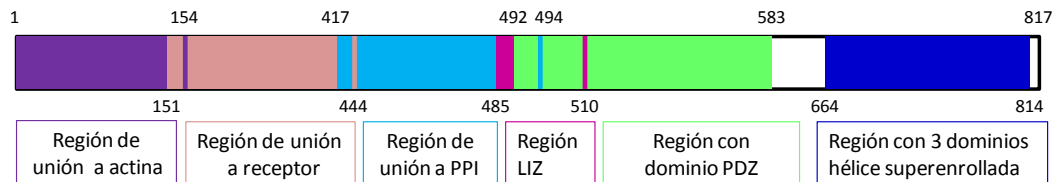


**Figura 8. Estructura 3D de la proteína espinofilina. Tomada de Kelker et al, 2007.**

La estructura de la espinofilina consta de varios dominios, la mayoría de los cuales tienen unas dianas de unión establecidas como se puede observar en la **figura 9** (Allen et al, 1997; Sato et al, 1998; Sarrouilhe et al, 2006):

- **Región N-terminal**, rica en prolina y con 3 dominios de homología Src3 (SH3). Mediante esta región la espinofilina puede unirse a la proteína F-actina a través de dos dominios y colaborar en la organización del citoesqueleto. Esta región puede ser fosforilada por proteínas como ERK2 o Cdk5 y disminuir así su capacidad de unión a la F-actina.
- **Región de unión a receptores**, a través de la cual puede interactuar con varios receptores transmembrana mediante su unión con la 3ª hélice intracelular, modificando así la actividad, localización y/o señalización de estos receptores.
- **Región de unión a la proteína fosfatasa 1 (PP1)**, que permite unirse a la subunidad catalítica de dicha PP1 e inhibir su actividad enzimática. Estas dos proteínas tienen una gran afinidad.
- **Región con motivo de cremallera**, rica en leucina e isoleucina (LIZ). Sirve para mediar la unión entre fosfatasas o quinasas y canales iónicos.

- **Región con dominio PDZ**, mediante la cual se une a la región C-terminal de las proteínas transmembrana de las espinas dendríticas.
- **Región C-terminal**, que contiene 3 dominios de hélice superenrollada. Esta región permite la formación de dímeros consigo misma o con otras proteínas, mediante la unión de una hélice  $\alpha$  anfipática a esta zona.



**Figura 9. Estructura de la espinofilina con las regiones de unión a diferentes moléculas indicando los aminoácidos de la estructura que pertenecen a cada dominio.**

### 3.1.2. Localización en el encéfalo

La espinofilina se encuentra en diferentes regiones del encéfalo. Muestra una elevada expresión en la capa I de la CPF (Muly et al, 2004a), ya que se ha detectado su presencia en la mayoría de espinas de las células piramidales de esta región (Muly et al, 2004b), pero también se ha visto en otras regiones corticales. Asimismo, se puede observar una alta expresión de espinofilina en otras áreas cerebrales como el hipocampo, el caudado y el putamen, donde aparece localizada en el citoplasma del soma y en dendritas espinales de las neuronas espinosas largas. No obstante, se ha descrito una baja presencia de esta proteína en el cerebelo y el giro dentado (Ouimet et al, 2004).

La localización celular de la espinofilina es, principalmente, en las espinas dendríticas y su presencia es necesaria para el desarrollo normal de éstas. También se puede encontrar en el tallo dendrítico, axones preterminales, dendritas de interneuronas corticales y en glía. Donde no se ha podido detectar la presencia de espinofilina es en los terminales axónicos (Muly et al, 2004a).

En la región postsináptica (*postsynaptic density*, PSD) de la neurona se ha visto que la espinofilina se encuentra distribuida de una forma muy heterogénea. Hasta los 100nm tiene una elevada expresión y, a partir de este punto, va disminuyendo su expresión hasta llegar a los 400nm de distancia donde ya no se detecta expresión alguna de dicha proteína (Muly et al, 2004a). Se ha descrito que la acumulación de espinofilina en la membrana plasmática es dependiente de cadherina, y ambas colocalizan en las regiones de adhesión célula-célula. Sin embargo, cuando la espinofilina es fosforilada, su expresión aumenta en el citosol y disminuye en la membrana celular (Sarrouilhe et al, 2006).

Durante el desarrollo, la expresión general de espinofilina va aumentando hasta la adolescencia, momento en el que se ha observado una mayor cantidad de ARNm de espinofilina. A partir de esta edad, va decayendo su expresión (Webster et al, 2011), al igual que pasa con el número de espinas dendríticas (Moyer et al, 2016).

### 3.1.3. Funciones en el encéfalo

Se han descrito numerosas funciones para la espinofilina, puesto que, como se ha mencionado anteriormente, tiene a lo largo de su secuencia diferentes dominios que permiten la unión con una gran cantidad de moléculas. Se han identificado hasta 30 proteínas que interactúan con ella (Sarrouilhe et al, 2006).

La espinofilina puede producir, a corto plazo, cambios en la regulación de la transmisión sináptica mediante su interacción con diferentes receptores transmembrana (explicado más en detalle en el apartado 3.2.) y canales iónicos, regulando su estado de fosforilación y, con ello, su actividad (Allen et al, 1997). Mientras que, a largo plazo, produce cambios en la densidad y morfología de las espinas dendríticas, la plasticidad sináptica y la migración neuronal (Sarrouilhe et al, 2006). Feng y colaboradores describieron cómo en ratones KO para la espinofilina se observaba una disminución de peso corporal y del tamaño del cerebro, en especial del grosor de las capas del hipocampo, y vieron un aumento en la densidad de espinas dendríticas con una presentación temprana de filopodia (Feng et al, 2000).

Por una parte, la espinofilina está involucrada en la organización del citoesqueleto de las espinas dendríticas a través de su interacción con los filamentos de actina, y esto se relaciona con la formación, el mantenimiento y la morfología de dichas espinas (Feng et al, 2000). La función de la espinofilina se ve regulada mediante fosforilación, por quinasas como PKA, PKC o la calcio calmodulina quinasa II (CaMKII), dando lugar a una menor interacción con actina. Además, la espinofilina regula la morfología de las espinas dendríticas gracias a su unión con PP1, inhibiendo el crecimiento de las espinas o facilitando su retracción, lo cual repercute en una regulación de la transmisión sináptica (Grossman et al, 2004). Así, puede intervenir en el aprendizaje y la memoria mediante su acción sobre el estado de la cromatina, como se comenta en el apartado 1.5.2. Cabe destacar que los cambios de número, tamaño y forma de las espinas dendríticas están asociados a cambios hormonales, de desarrollo y de aprendizaje (Feng et al, 2000).

Por otra parte, la espinofilina puede modular la función de canales iónicos y del citoesqueleto, desencadenando procesos de señalización que dan lugar a cambios estructurales en las espinas dendríticas y en la plasticidad sináptica (Grossman et al, 2004). En este sentido, mediante su interacción con la PP1, puede modular la transmisión sináptica glutamatérgica (Feng et al, 2000).

### 3.2. Interacción de la espinofilina con receptores

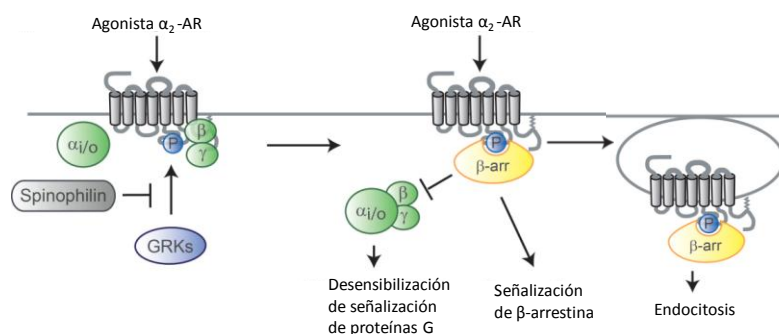
La espinofilina tiene un dominio propio en su secuencia para interactuar con receptores transmembrana, como se ha mencionado en la sección 3.1. Aun así, hay receptores que pueden unirse a más de una región dentro de la secuencia de espinofilina. Los receptores dopaminérgicos y los  $\alpha$ -AR se unen a la región N-terminal y al dominio de unión a receptores de la espinofilina (Kelker et al, 2007), mientras que los receptores opioides (OR) se unen a la región C-terminal y al dominio de unión a receptores de la espinofilina (Fourla et al, 2012). Pese a esto, la interacción general con los receptores transmembrana se produce mediante la interacción de su 3ª hélice intracelular con el dominio de unión a receptor de la espinofilina, lo cual estabiliza a los receptores en la membrana (Di Sebastiano et al, 2016). La unión de espinofilina a estos receptores varía su señalización, dado que modula las proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G (RGS), que están en el complejo de señalización (Liu et al, 2006). Además, regula la señalización de receptores transmembrana uniéndolos con la señalización intracelular dependiente de Rac/GEF y P70<sup>S6K</sup>. Esto controla la translocación del ARNm y la proliferación celular.

A continuación se describen algunas interacciones de espinofilina con diferentes receptores transmembrana:

- La espinofilina puede unirse con **receptores glutamatérgicos metabotrópicos e ionotrópicos**. Por una parte, la unión de espinofilina con los receptores glutamatérgicos metabotrópicos I (**mGlu1**) bloquea la fosforilación de ERK<sub>1/2</sub>, lo que impide el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina y disminuye la endocitosis de estos receptores. Mediante el uso de ratones KO para la espinofilina, se ha descrito un aumento de la estimulación de ERK<sub>1/2</sub> y la fosforilación basal de AKT y, con ello un aumento de la endocitosis de los receptores mGlu1 (Di Sebastiano et al, 2016). Por otra parte, la activación de los receptores glutamatérgicos  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (**AMPA**), por la interacción con la espinofilina, es imprescindible para el aprendizaje y la formación de memoria, ya que colaboran en la reorganización del citoesqueleto (Ragusa et al, 2010).
- La interacción entre espinofilina y los **receptores  $\delta$ -opioides ( $\delta$ -OR)** también produce una atenuación de la fosforilación de estos receptores por ERK<sub>1/2</sub>. Además, se ha visto un mejor acople de la espinofilina con  $\delta$ -OR y esto causa una mayor interacción entre las proteínas G $\alpha_{i/o}$  y AC, provocando una acumulación de AMPc. Además, mediante la interacción de espinofilina con proteínas G $\beta\gamma$  se facilita la dimerización de  $\delta$ -OR (Fourla et al, 2012). Asimismo, la espinofilina se une a los **receptores  $\mu$ -opioides ( $\mu$ -OR)** dando

lugar a la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Fourla et al, 2012). Esta interacción promueve la endocitosis de los  $\mu$ -OR (Magalhaes et al, 2012).

- La interacción de espinofilina con los receptores **dopaminérgicos D<sub>2</sub>** permite su unión a otras proteínas ancladas a la membrana, siempre que contengan un dominio PDZ (Smith et al, 1999).
- La espinofilina también puede interaccionar con los receptores **adrenérgicos (AR)**, impidiendo su endocitosis y regulando su localización y función.
  - Regulación de la endocitosis. Los  $\alpha_{2A}$ -AR pueden interaccionar a través de la 3<sup>a</sup> hélice intracelular con  $\beta$ -arrestina, 14-3-3 $\zeta$  y proteínas G $\alpha$  heterotriméricas, pudiendo unirse a la vez a espinofilina y a la proteína G $\alpha_i$  pertinente (Richman et al, 2001). La unión de los  $\alpha_2$ -AR con la espinofilina bloquea la fosforilación de estos receptores. Cuando los  $\alpha_2$ -AR son fosforilados por la GRK2 se desencadena la activación de la MAPK y da lugar a la unión de la  $\beta$ -arrestina, y con ello la endocitosis del receptor, como se puede observar en la **figura 10** (Wang et al, 2007b). Además, el impedimento de la unión de la  $\beta$ -arrestina con los  $\alpha_2$ -AR también altera la señalización de Ca<sup>+2</sup> (Magalhaes et al, 2012). La interacción de estos receptores con espinofilina o  $\beta$ -arrestina es un mecanismo de regulación y de optimización de la señalización y respuesta celular (Wang et al, 2004). La afinidad de ambas proteínas por  $\alpha_2$ -AR es la misma *in vitro* (Wang & Limbird, 2002). Sin embargo *in vivo*, si el receptor está fosforilado, tiene mayor predisposición de unión con la  $\beta$ -arrestina, mientras que si no se encuentra fosforilado, se favorece la unión con espinofilina (Wang et al, 2007b). La fosforilación de la espinofilina por PKA regula la interacción de ésta con  $\alpha_{2A}$ -AR y causa la internalización del receptor (Xu et al, 2008).



**Figura 10. Competición entre espinofilina y  $\beta$ -arrestina para unirse a  $\alpha_2$ -AR activado. Al estar fosforilado, la  $\beta$ -arrestina tiene mayor afinidad, para la señalización producida por las proteínas G y el receptor se internaliza. Modificada a partir de una imagen tomada de Gilsbach & Hein, 2012.**

- Regulación de su localización y función. La interacción de la espinofilina con los  $\alpha_2$ -AR puede regular la localización y la función de dichos receptores (Hu et al,

2008), regulando la duración de la señalización y la sensibilidad de la respuesta (Wang et al, 2007b). Los  $\alpha_{2A}$ -AR activos en las espinas dendríticas reclutan espinofilina a la membrana plasmática, y así pueden aumentar su señalización. Esto se realiza mediante proteínas asociadas a espinofilina, gracias a los numerosos dominios de unión que contiene su secuencia (Brady et al, 2005). Además, la espinofilina tiene una mayor capacidad de interactuar con los  $\alpha_{2A}$ -AR activos (Lu et al, 2010). La unión de espinofilina con  $\alpha_{1B}$ -AR disminuye la señalización de  $Ca^{+2}$ . Se ha visto que una delección de espinofilina aumenta la potencia de la señalización de  $Ca^{+2}$  desencadenada por la adrenalina (Wang et al, 2007b).

### 3.3. Alteraciones de la espinofilina en esquizofrenia

La espinofilina se encuentra principalmente en las espinas dendríticas, como ya se ha dicho, y éstas están disminuidas en las áreas corticales en esquizofrenia. En la esquizofrenia hay una disminución del volumen de materia gris cerebral y del número de espinas dendríticas principalmente en las células piramidales de la CPF (Sweet et al, 2009), el lóbulo temporal (Glausier & Lewis, 2013) y el hipocampo (Critchlow et al, 2006). En estudios de sujetos con una elevada predisposición genética a desarrollar esquizofrenia se ha descrito una disminución del tamaño del cerebro, con especial relevancia en estas tres regiones cerebrales. La disminución de espinas dendríticas en esquizofrenia puede deberse a un problema de formación, maduración y mantenimiento de las sinapsis axoespinosas (Glausier & Lewis, 2013). Se han descrito numerosas alteraciones sinápticas en esta patología, como una deficiencia en la conectividad colateral del hipocampo (Weickert et al, 2008). Además, se ha visto que la disminución sináptica en el hipocampo se produce por una pérdida de volumen de espinas dendríticas y un menor contacto sináptico entre neuronas, lo que da lugar a alteraciones en funciones de memoria (Glausier & Lewis, 2013).

Con estas observaciones en esquizofrenia y, teniendo en cuenta la acción reguladora de la espinofilina sobre las espinas dendríticas, numerosos estudios han analizado la expresión de espinofilina, tanto a nivel proteico como a nivel de ARNm, en sujetos con esquizofrenia. Estos estudios no van todos en la misma dirección. Por una parte, existen estudios que no han descrito variaciones en el ARNm de espinofilina en CPF de sujetos con esquizofrenia (Catts & Weickert, 2012; Ide & Lewis, 2010; Weickert et al, 2004). Otros han observado un descenso de expresión del ARNm de espinofilina en esquizofrenia en la corteza entorrinal, el subiculum o en el hipocampo (Law et al, 2004a; Weickert et al, 2008). Por último, otros estudios han descrito un incremento de espinofilina en la CPF (Baracksay et al, 2006) o en el tálamo (Clinton et al, 2005). En estos últimos estudios han observado una expresión heterogénea del ARNm, puesto que en la

CPF describieron niveles más elevados en las capas II, V y VI que en el resto de capas (Baracksay et al, 2006) y, en el tálamo observaron bajos niveles en los núcleos reticular y ventral, y una elevada expresión en el núcleo medial (Clinton et al, 2005). Por otra parte, los estudios de expresión proteica de espinofilina han visto una disminución en la capa III de la corteza auditiva (Sweet et al, 2009) o en la capa glomerular del bulbo olfatorio (Egbujo et al, 2015). Por el contrario, otros estudios describieron que no había alteraciones en los niveles de expresión proteica de espinofilina en la corteza auditiva (Deo et al, 2013) o en la CPF (Koh et al, 2003).

También se ha estudiado la expresión de espinofilina o de su ARNm en modelos animales de esquizofrenia. Se ha descrito una disminución en el ARNm en el núcleo estriado (Beraki et al, 2009) y un aumento su expresión proteica en el área tegmental ventral (Aguilar-Valles et al, 2012). Además, en un modelo animal de déficits sinápticos asociados a cambios de comportamiento, han observado una disminución de la expresión de ARNm de espinofilina en la corteza occipital, el hipocampo y el cerebelo, mientras que en la corteza frontoparietal se ha visto un aumento (Eastwood et al, 2007).

Ha habido varios estudios en los que se ha analizado el efecto de antipsicóticos, tanto típicos como atípicos, sobre la expresión de espinofilina. Varios estudios describieron que no existía ninguna alteración en la expresión del ARNm de espinofilina en ninguna región cerebral de ratas, tras tratarlas con diferentes antipsicóticos típicos (haloperidol o clorpromazina) o atípicos (clozapina, olanzapina o risperidona) (Baracksay et al, 2006; Law et al, 2004b). Sin embargo, en otro estudio con tratamiento antipsicótico en células provenientes de hipocampo de rata, se observó que la clozapina provocaba un incremento de la expresión proteica de espinofilina, mientras que el haloperidol causaba una disminución (Critchlow et al, 2006). Esto mismo se ha descrito para la expresión proteica de espinofilina en corteza de ratón tras someterlo a un tratamiento crónico con haloperidol o clozapina (Kabbani & Levenson, 2006). En tratamientos con antipsicóticos en primates también existe una discordancia en los estudios de expresión de espinofilina. Una investigación describió la ausencia de cambios en la expresión proteica de espinofilina en la corteza auditiva tras realizar un tratamiento crónico de haloperidol (Sweet et al, 2009). No obstante, otro estudio observó un aumento de la expresión proteica de espinofilina en CPF de primates tratados con haloperidol de manera crónica (Koh et al, 2003). En contraposición, varios estudios describieron la disminución de transcritos génicos o de la proteína en la corteza (Clinton et al, 2005; Lidow et al, 2001; Weickert et al, 2004) tras un tratamiento crónico con haloperidol.

Como se puede observar a partir de todos estos estudios, no hay un consenso relativo a la expresión de espinofilina en la esquizofrenia, ni cómo afectan los diferentes antipsicóticos a dicha expresión.







# Hipótesis y objetivos

---



## HIPÓTESIS

La hipótesis de la presente Tesis Doctoral defiende que los receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$  expresados en la región postsináptica de las células piramidales de la CPFDL son hipofuncionantes en sujetos con esquizofrenia. Esa hipofunción conllevaría déficits cognitivos propios de la enfermedad que pueden ser agravados por los tratamientos antipsicóticos actualmente vigentes. Esta alteración puede darse a través de mecanismos de regulación epigenética que contribuyen a una menor expresión de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ .

El déficit de funcionalidad de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$  puede tener un sustrato anatómico en la reducción de las espinas dendríticas sobre las que se expresan estos receptores, como se ha observado ya en cerebro de esquizofrénicos, pero también podría representar un desacople funcional entre el receptor y sus sistemas de señalización celular.

## OBJETIVOS

Los objetivos abordados en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Caracterizar la distribución de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2C}$  en las fracciones presináptica y postsináptica de la CPFDL humana *postmortem*.
2. Cuantificar la expresión proteica y la funcionalidad de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2C}$  en la CPFDL humana *postmortem* de sujetos con esquizofrenia y sus controles emparejados, y observar la influencia del tratamiento antipsicótico sobre dichos parámetros.
3. Cuantificar la expresión de varios subtipos de proteínas G $\alpha$  en la CPFDL humana *postmortem* de sujetos con esquizofrenia y sus controles emparejados, analizando el impacto de los antipsicóticos sobre dicha expresión.
4. Evaluar la expresión génica y las modificaciones epigenéticas de los genes ADRA2A y ADRA2C en la CPFDL humana *postmortem* de sujetos con esquizofrenia y sujetos control emparejados, y determinar la posible influencia de los antipsicóticos en estos genes.
5. Caracterizar la expresión de la proteína espinofilina, implicada en la formación de espinas dendríticas, en diferentes regiones del encéfalo humano *postmortem*, y en distintas fracciones celulares de CPFDL humana *postmortem*.
6. Cuantificar la expresión proteica de la espinofilina en la CPFDL humana *postmortem* de sujetos con esquizofrenia y sus controles emparejados, analizando el impacto que tiene el tratamiento antipsicótico sobre esta expresión.





# **Sujetos, material y métodos**

---



## 1. MUESTRAS CEREBRALES HUMANAS *POSTMORTEM*

Las muestras humanas utilizadas a lo largo de esta Tesis Doctoral procedieron de cerebros humanos *postmortem* obtenidos tras la realización de la autopsia en el Instituto Vasco de Medicina Legal (IVML) entre los años 1994 y 2012. Todo el procedimiento se realizó de acuerdo con la legislación vigente sobre investigación y aspectos éticos con respecto al uso de muestras humanas *postmortem* en estudios de investigación, recogida en el Real Decreto 1716/2011.

Los fallecimientos de los sujetos incluidos en esta Tesis se produjeron por causas naturales, accidentales o suicidas. Tras confirmar el deceso, el cuerpo se mantuvo a 4°C hasta el momento de realizar la autopsia, en la cual se diseccionaron las diferentes áreas del cerebro utilizadas en esta Tesis Doctoral. Posteriormente, las muestras se guardaron a -70°C hasta el momento de su procesamiento para la realización de los diferentes estudios. A todos los sujetos se les extrajo sangre durante la autopsia para someterla a un análisis toxicológico con el fin de detectar la presencia de antidepresivos, antipsicóticos (AP), etanol, opioides y/u otros fármacos psicotrópicos. Estos análisis fueron realizados en el Instituto Nacional de Toxicología (Madrid, España) o en el propio IVML mediante técnicas de radioinmunoensayo, análisis inmunoenzimático, cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases-espectrometría de masas.

En este estudio se utilizaron muestras de 48 sujetos de los cuales se realizó una búsqueda retrospectiva del historial clínico *antemortem* en ambulatorios, hospitales y centros de Salud Mental. Se incluyeron 24 sujetos con diagnóstico de esquizofrenia (SZ), de acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales (DSM-4 y DSM-5) (*American Psychiatric Association*, 1952; 2013) y/o la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD-10) (*World Health Organization*, 1992). Dependiendo de la presencia o ausencia de antipsicóticos en sangre en el momento del fallecimiento se establecieron dos grupos: 12 sujetos con esquizofrenia sin presencia de antipsicóticos en sangre en el momento de la muerte (a los cuales denominaremos *AP-free*) y 12 sujetos con esquizofrenia con antipsicóticos en sangre (los cuales se nombrarán como *AP-treated*). Estos 24 sujetos SZ fueron emparejados con 24 sujetos controles (C), es decir, sujetos sin ninguna patología psiquiátrica *antemortem*. Este emparejamiento se realizó teniendo en cuenta la edad, el sexo y el intervalo *postmortem* (PMD, tiempo que transcurre entre el fallecimiento y la obtención de las muestras) de los sujetos como se puede observar en la siguiente tabla:

Estudio de  $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

	Diagnóstico	Sexo (H/M)	Edad (años)	PMD (h)	Causa de muerte	Niveles sanguíneos de sustancias
SZ1	Esquizofrenia paranoide	H	31	14	Suicidio (precipitación)	Lorazepam
C1	Control	H	32	4	Accidente (atropello)	(-)
SZ2	Esquizofrenia paranoide	H	48	20	Suicidio (tren)	(-)
C2	Control	H	47	17	Natural (ICR)	Nordiazepam
SZ3	Esquizofrenia paranoide	H	45	3	Suicidio (precipitación)	Nordiazepam
C3	Control	H	48	7	Accidente (tráfico)	(-)
SZ4	Esquizofrenia paranoide	M	37	58	Suicidio (ingesta de fármacos)	Heroína Diazepam
C4	Control	M	36	38	Homicidio	Diazepam Heroína Cocaína
SZ5	Esquizofrenia paranoide	H	46	22	Suicidio (precipitación)	Biperideno
C5	Control	H	46	24	Natural (infarto)	(-)
SZ6	Esquizofrenia paranoide	M	37	26	Suicidio (precipitación)	Lorazepam
C6	Control	M	38	22	Accidente (atropello)	
SZ7	Esquizofrenia paranoide	H	48	11	Suicidio (precipitación)	(-)
C7	Control	H	49	8	Natural (ICR)	
SZ8	Esquizofrenia paranoide	H	35	5	Suicidio (ahorcadura)	(-)
C8	Control	H	37	6	Accidente (tráfico)	Etanol (2.2)
SZ9	Esquizofrenia paranoide	M	59	9	Natural (ICR)	(-)
C9	Control	M	57	4	Accidente (tráfico)	(-)
SZ10	Esquizofrenia paranoide	H	45	18	Suicidio (precipitación)	(-)
C10	Control	H	47	15	Accidente (tráfico)	
SZ11	Esquizofrenia paranoide	H	34	15	Natural (ICR)	(-)
C11	Control	H	34	17	Accidente (tráfico)	(-)
SZ12	Esquizofrenia paranoide	H	52	7	Suicidio (precipitación)	Lormetazepam
C12	Control	H	51	13	Accidente (tráfico)	Etanol (2.13)
SZ13	Esquizofrenia paranoide	H	44	7	Natural (ICR)	<b>Clotiapina</b> <b>Levomepromazina</b> Nordiazepam Biperideno
C13	Control	H	44	23	Accidente (atropello)	(-)
SZ14	Esquizofrenia paranoide	M	30	28	Suicidio (ingesta de fármacos)	<b>Haloperidol</b> Lorazepam Procainamida Metamizol Lidocaína Mepivacaína
C14	Control	M	30	18	Accidente (tráfico)	(-)
SZ15	Esquizofrenia paranoide	H	35	11	Natural (ICR)	<b>Clozapina</b> Clomipramina Nordiazepam Paracetamol
C15	Control	H	36	18	Accidente (laboral)	Benzoilecgonina Etanol (1.69)



SZ16	Esquizofrenia paranoide	M	60	23	Natural (peritonitis)	<b>Amisulpirida</b> <b>Clozapina</b> Lorazepam
C16	Control	M	60	48	Natural (hemorragia cerebral)	Carbamacepina Fenitoína Fenobarbital
SZ17	Esquizofrenia paranoide	H	56	12	Natural (ICR)	<b>Olanzapina</b> <b>Clotiapina</b>
C17	Control	H	54	16	Accidente (laboral)	Etanol (0.58)
SZ18	Esquizofrenia paranoide	H	41	17	Homicidio (arma blanca)	<b>Clozapina</b> Alprazolam
C18	Control	H	40	18	Accidente (laboral)	Etanol (0.56)
SZ19	Esquizofrenia paranoide	H	41	11	Suicidio (arma blanca)	<b>Quetiapina</b> <b>Clotiapina</b> Lorazepam Paracetamol
C19	Control	H	41	14	Natural (infarto)	(-)
SZ20	Esquizofrenia paranoide	H	42	14	Suicidio (ingesta de tóxicos)	<b>Risperidona</b> Nordiazepam
C20	Control	H	43	20	Natural (ICR)	Ibuprofeno
SZ21	Esquizofrenia paranoide	H	36	8	Suicidio (ingesta de tóxicos)	<b>Olanzapina</b>
C21	Control	H	36	23	Accidente (aplastamiento)	(-)
SZ22	Esquizofrenia paranoide	M	28	22	Suicidio (precipitación)	<b>Risperidona</b>
C22	Control	M	32	19	Accidente (tráfico)	Etanol (1.21)
SZ23	Esquizofrenia paranoide	M	48	17	Suicidio (precipitación)	<b>Olanzapina</b> <b>Clotiapina</b>
C23	Control	M	50	11	Natural (ICR)	(-)
SZ24	Esquizofrenia paranoide	M	42	14	Suicidio (ingesta de tóxicos)	<b>Clozapina</b> <b>Sulpirida</b> <b>Quetiapina</b> Nordiazepam
C24	Control	M	41	22	Accidente (aplastamiento)	(-)

*Tabla 1. Variables demográficas de los sujetos incluidos en esta tesis doctoral. Los antipsicóticos presentes en sangre en el momento de la muerte están resaltados en negrita. En la tabla el sexo se indica con H para hombre y M para mujer. ICR indica muerte por insuficiencia cardiorrespiratoria aguda. Los niveles de etanol se indican en g/l.*

## 2. MATERIALES

### 2.1. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los experimentos de Western Blot fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios						
Diana	Descripción	Casa comercial	Nº catálogo	Conc SPM	Conc PSD	Conc Pre
$\alpha_{2A}$ -AR	Anti- $\alpha_{2A}$ -adrenérgico policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-1478	1:1000	1:1000	
$\alpha_{2A}$ -AR	Anti- $\alpha_{2A}$ -adrenérgico policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-28983	1:1000		
$\alpha_{2C}$ -AR	Anti- $\alpha_{2C}$ -adrenérgico policlonal de conejo	Elabscience	ENT0300	1:1000	1:1000	1:1000
$\alpha_{2C}$ -AR	Anti- $\alpha_{2C}$ -adrenérgico policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-30439	1:1000		
$\alpha_{2C}$ -AR	Anti- $\alpha_{2C}$ -adrenérgico policlonal de conejo	Thermo Fisher Scientific	PA1-46149	1:1000		
$\alpha_{2C}$ -AR	Anti- $\alpha_{2C}$ -adrenérgico policlonal de conejo	Thermo Fisher Scientific	PA5-27166	1:1000		
$G\alpha_{i1}$	Anti- $G\alpha_{i1}$ monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-56536		1:200	
$G\alpha_{i2}$	Anti- $G\alpha_{i2}$ policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-7276		1:250	1:500
$G\alpha_{i3}$	Anti- $G\alpha_{i3}$ policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-262		1:200	1:100
$G\alpha_o$	Anti- $G\alpha_o$ monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-393874		1:200	1:500
$G\alpha_s$	Anti- $G\alpha_s$ policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-383		1:200	1:500
$G\alpha_{q/11}$	Anti- $G\alpha_{q/11}$ policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-392		1:200	
$G\alpha_{12/13}$	Anti- $G\alpha_{12/13}$ policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-28588		1:200	
$G\alpha_z$	Anti- $G\alpha_z$ policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-388		1:200	
Espinofilina	Anti-espinofilina policlonal de conejo	LifeSpan BioSciences	LSC162085	1:1000		

<b>Espinofilina</b>	Anti-espinofilina monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology, inc	sc-373974	1:250		
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Anti- $\beta$ -actina monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	A1978	1:500 000	1:500 000	1:50 000/ 1:10 000
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Anti- $\beta$ -actina policlonal de conejo	Abcam	ab8227			1:5000
Anticuerpos secundarios						
Diana	Descripción	Casa comercial	Nº catálogo	Con SPM	Conc PSD	ConcPre
<b>Cabra</b>	Alexa Fluor 680 mono anti-cabra	Invitrogen	A21084	1:4000	1:4000	
<b>Ratón</b>	Alexa Fluor 680 cabra anti-ratón	Invitrogen	A21057	1:4000	1:4000	1:3000
<b>Ratón</b>	IRDye800 mono anti-ratón	Rockland	610-745-002	1:6000	1:6000	
<b>Conejo</b>	Alexa Fluor 680 cabra anti-conejo	Invitrogen	A21076	1:4000	1:4000	1:3000
<b>Conejo</b>	IRDye800 mono anti-conejo	Rockland	611-745-127	1:6000	1:6000	1:4000

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados en los experimentos de Western Blot indicando su casa comercial y la concentración utilizada en cada una de las fracciones subcelulares. Los huecos en blanco en las concentraciones de algunas fracciones se deben a la ausencia de su uso en dichas fracciones.

A continuación se muestra en una tabla los anticuerpos utilizados para los ensayos de proximidad de centelleo (scintillation proximity assay, SPA):

Anticuerpos primarios				
Diana	Descripción	Casa comercial	Nº catálogo	Conc
<b>G<math>\alpha</math><sub>i1</sub></b>	Anti-G $\alpha$ <sub>i1</sub> monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology,inc	sc-56536	1:20
<b>G<math>\alpha</math><sub>i2</sub></b>	Anti-G $\alpha$ <sub>i2</sub> policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology,inc	sc-7276	1:20
<b>G<math>\alpha</math><sub>i3</sub></b>	Anti-G $\alpha$ <sub>i3</sub> policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology,inc	sc-262	1:30
<b>G<math>\alpha</math><sub>o</sub></b>	Anti-G $\alpha$ <sub>o</sub> monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology,inc	sc-393874	1:40
<b>G<math>\alpha</math><sub>s</sub></b>	Anti-G $\alpha$ <sub>s</sub> policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology,inc	sc-383	1:20
<b>G<math>\alpha</math><sub>q/11</sub></b>	Anti-G $\alpha$ <sub>q/11</sub> policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology,inc	sc-392	1:20
<b>G<math>\alpha</math><sub>12/13</sub></b>	Anti-G $\alpha$ <sub>12/13</sub> policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology,inc	sc-28588	1:20
<b>G<math>\alpha</math><sub>z</sub></b>	Anti-G $\alpha$ <sub>z</sub> policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology,inc	sc-388	1:20

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados en los experimentos de ensayos de proximidad de centelleo indicando su casa comercial y la concentración utilizada en cada una de la fracción enriquecida de membranas.

Los anticuerpos utilizados para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) fueron:

Anticuerpos primarios				
Diana	Descripción	Casa comercial	Nº catálogo	Conc
<b>H3K4me3</b>	Anti-trimetilación en la lisina 4 de la histona 3 policlonal de conejo	Merck Millipore	07-473	1:333
<b>H3K27me3</b>	Anti-trimetilación en la lisina 27 de la histona 3 policlonal de conejo	Merck Millipore	07-449	1:200
<b>AcH3</b>	Anti- histona 3 policlonal de conejo	Merck Millipore	06-559	1:200
<b>AcH3K9</b>	Anti-lisina 9 de la histona 3 policlonal de conejo	Merck Millipore	07-352	1:200
<b>AcH3K27</b>	Anti-lisina 27 de la histona 3 policlonal de conejo	Merck Millipore	07-360	1:167
<b>AcH4K5</b>	Anti-lisina 5 de la histona 4 policlonal de conejo	Merck Millipore	07-327	1:100
<b>AcH4K16</b>	Anti-lisina 16 de la histona 4 policlonal de conejo	Merck Millipore	07-329	1:200
<b>IgG</b>	Anti-IgG policlonal de conejo	Merck Millipore	12-370	1:333

**Tabla 4.** Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina indicando su casa comercial y la concentración utilizada.

## 2.2. Péptido bloqueante

El péptido bloqueante frente a la proteína espinofilina (LS-E4298, LifeSpan Bioesciences) fue usado a una concentración 1:500.

## 2.3. Líneas celulares

Células CHO que sobreexpresan en sus membranas el  $\alpha_{2A}$ -AR (ES-030-M400UA, Perkin Elmer, MA, USA) o el  $\alpha_{2C}$ -AR (ES-032-M400UA, Perkin Elmer, MA, USA) humanos.

## 2.4. Radioligando

[<sup>35</sup>S]-Guanosín 5'-O-( $\gamma$ -tio)trifosfato ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S) (NEG030H250UC, Perkin Elmer, MA, USA) con una actividad específica de 1250 Ci/mmol.

## 2.5. Primers o cebadores y sondas

Los *primers* utilizados para realizar qRT-PCR se diseñaron con las herramientas que ofrece la empresa Integrated DNA Technologies (IDT) y se compraron a esta misma. A continuación se detalla la información de dichos *primers*:

Muestra	Gen diana	Tipo de primer	Secuencia
ADNc humano	ADRA2A	Forward	5' -GAGCAAGCACTGGACTACAA-3'
		Reverse	5' -AGAGAGAGAGTTGGGAATGGA-3'
	ADRA2C	Forward	5' -TTCACCTTTGTGCTGGCT-3'
		Reverse	5' - CAGGCTGTAGCTGAAGAAGAA-3'
ADNc rata	ADRA2A	Forward	5' -TCCTGAGAGGGAAGGGATTT-3'
		Reverse	5' -GTCTTGGTCCATCGCTGTAATA-3'
	ADRA2C	Forward	5' -CTCTGGCTGCCTGGACTT-3'
		Reverse	5' -GTTGGTCCCCCTATGTACCC-3'
ADN genómico	ADRA2A	Forward	5' -TAACTCACACCGGAGGTTACT-3'
		Reverse	5' -ACGGAGCAGAACGCAAC-3'
	ADRA2C	Forward	5' -TGGTGACTTTGAACACCTCTC-3'
		Reverse	5' -TGCTGGAGCATGAATCATAACTA-3'
	GAPDH	Forward	5' -TACTAGCGGTTTTACGGGCG -3'
		Reverse	5' -TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA -3'

**Tabla 5. Primers utilizados en los experimentos de qRT-PCR con la secuencia diseñada para los diferentes genes.**

Los detalles de las sondas utilizadas para realizar qRT-PCR se encuentran en la siguiente tabla:

Muestra	Gen	Nombre del gen	ID ensayo Taqman
ADNc humano	GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	43333762F
	RPS13	Proteína ribosomal S13	Hs01945436_u1
ADNc rata	GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	4352932E
	RPS29	Proteína ribosomal S29	Mm02342448_gH

**Tabla 6. Sondas utilizadas en los experimentos de qRT-PCR con el número de referencia para los diferentes genes.**

## 2.6. Fármacos y productos utilizados

A continuación se mencionan los diferentes compuestos químicos utilizados en esta tesis doctoral, agrupados por su casa comercial:

Applied Biosystem (Foster City, CA, USA): Fast SybrGreen Master Mix, Fast Taqman™ fast universal PCR Master Mix.

Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA): Ensayo de proteínas de Bradford; kit de ensayo de proteínas DC; persulfato de amonio (APS); N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina (TEMED); marcador de peso molecular para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

Carlo Erba Reagents (Barcelona, España): Metanol.

GE Healthcare (Buckinghamshire, UK): Membranas de nitrocelulosa (tamaño del poro: 0,45 µm) y los papeles de celulosa Whatman™ 3MM.

Estudio de  $\alpha 2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

Honeywell Fluka™ Chemicals (Charlotte, NC, USA): Glicerol y sacarosa.

Invitrogen (Barcelona, España): DL-Ditiotreitol (DTT).

Laboratorios Lassa (Barcelona, España): RX 821002.

Life Technologies (Carlsbad, CA, USA): H<sub>2</sub>O molecular.

Merck (Darmstadt, Germany): Cloruro sódico (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), dihidrato de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O), hexahidrato de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Merck Milipore (Burlington, MA, USA): Bolas magnéticas para ChIP recubiertas de proteína A.

National Diagnostics (Atlanta, GA, USA): Acrilamida 30%- bisacrilamida 0,8%.

Panreac química S.A.U. (Barcelona, España): Ácido acético glacial, ácido clorhídrico y sacarosa.

Perkin Elmer (Waltham, MA, USA): Bolas para SPA de polivinil tolueno (PVT) recubiertas por proteína A.

Quimivita (Barcelona, España): Etanol.

Sigma Aldrich® (Saint Louis, MO, USA): Albumina sérica bovina (BSA), Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro (Tris HCl), glicina, sodio dodecilsulfato (SDS), monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano (Tween 20), Ponceau S, azul de bromofenol, azul de Coomassie, guanosín difsfato (GDP), guanosín 5'-O-( $\gamma$ -tio)trifosfato (GTP $\gamma$ S), Tricina NaOH, etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter) ácido *N, N, N', N'*-tetraacético (EGTA), igepal, cóctel de inhibidores de proteasas, ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), fluoruro sódico (NaF), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Triton X-100, cloruro de litio (LiCl), ácido desoxicólico, benzamidina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), proteinasa K, dimetil sulfóxido (DMSO), MNAsa.

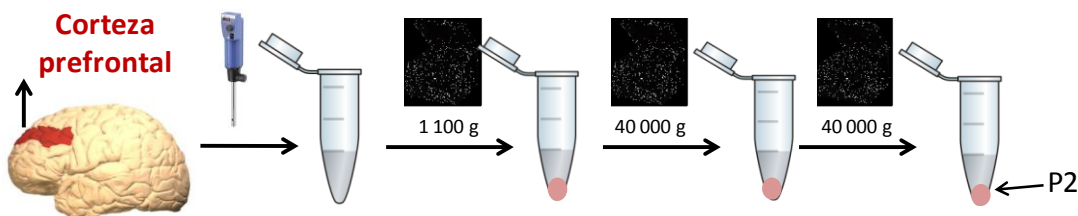
Tocris Bioscience (Bristol, UK): UK 14304.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Western Blot

##### 3.1.1. Preparación de la fracción subcelular enriquecida en membranas (fracción P2)

Se pesaron 0.2-0.3 g de tejido de cada uno los sujetos control utilizados (descartando las meninges, sustancia blanca y vasos sanguíneos en la medida de lo posible) para hacer la muestra de referencia (pool) y se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón de homogeneización (sacarosa 0.32 M, Tris HCl 5 mM, pH 7.4) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (50 µl/g de cocktail con inhibidores de proteasas Sigma, NaVO<sub>4</sub> 5mM, NaF 10 mM). Se centrifugaron a 1100 g durante 5 min a 4°C (centrífuga Sorvall RC-5C, rotor SM-24, FisherScientific, Madrid, España), se descartaron los *pellets* y los sobrenadantes se sometieron a una centrifugación de 40 000 g durante 10 min a 4°C (centrífuga Sorvall RC-5C, rotor SM-24, FisherScientific, Madrid, España). Los *pellets* se resuspendieron en 5 volúmenes de tampón de resuspensión (Tris HCl 5 mM; pH 7.4 con inhibidores de proteasas y fosfatasa [50 µl/g de cocktail con inhibidores de proteasas Sigma, NaVO<sub>4</sub> 5 mM, NaF 10 mM]) y se centrifugaron a 40 000 g durante 10 min a 4°C (centrífuga Sorvall RC-5C, rotor SM-24, FisherScientific, Madrid, España). Los *pellets* se resuspendieron en 5 volúmenes de tampón de resuspensión (Tris HCl 5 mM; pH 7.4 con inhibidores de proteasas y fosfatasa [50 µl/g de cocktail con inhibidores de proteasas Sigma, NaVO<sub>4</sub> 5mM, NaF 10mM]) y se guardaron a -80°C hasta su uso. El contenido proteico fue determinado por el método de Bradford utilizando BSA como estándar.



**Figura 1.** Esquema de los principales pasos de la preparación de fracciones subcelular rica en membranas de las muestras de sujetos controles que conforman el pool para la técnica de Western Blot.

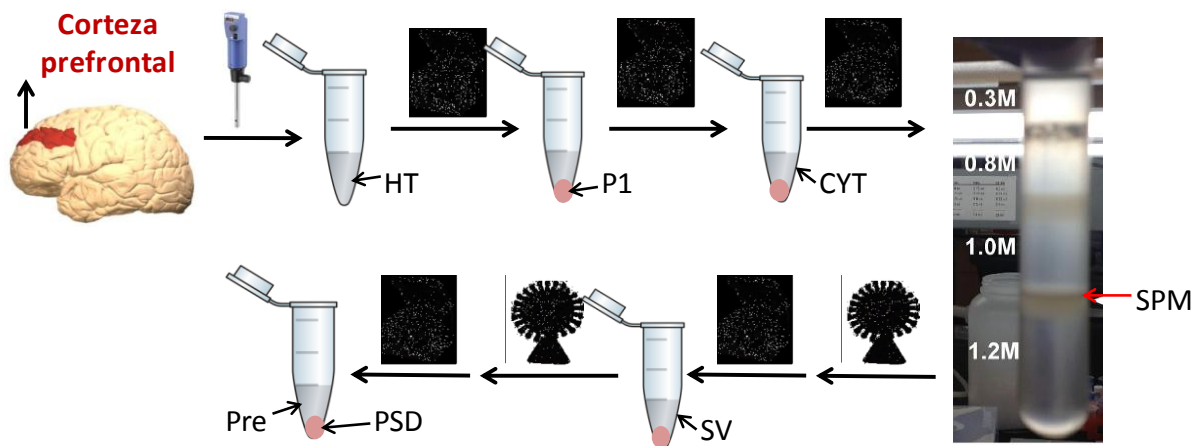
##### 3.1.2. Preparación de fracciones subcelulares, fracción presináptica (Pre) y fracción postsináptica (PSD)

Se pesó 1 g de corteza prefrontal de cada uno las de los sujetos (descartando las meninges, sustancia blanca y vasos sanguíneos en lo posible) y se homogeneizó en 30 ml de tampón de homogeneización (sacarosa 0.32 M, Tris HCl 5 mM; pH 7.4) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (50 µl/g de cocktail con inhibidores de proteasas Sigma, NaVO<sub>4</sub> 5 mM, NaF 10 mM), obteniendo el preparado denominado como homogeneizado total (HT). Los HT se dividieron en 4 tubos y se centrifugaron a 1100 g durante 15 min a 4°C (centrífuga Sorvall RC-5C, rotor SM-24, FisherScientific, Madrid, España), se separaron los sobrenadantes (S1, *supernatant 1*) a nuevos

## Estudio de $\alpha 2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

tubos y los *pellets* se guardaron como fracción nuclear (P1, *pellet 1*) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los sobrenadantes se sometieron a una centrifugación de 40 000 g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  (centrífuga Sorvall RC-5C, rotor SM-24, FisherScientific, Madrid, España). Se guardaron los nuevos sobrenadantes resultantes como fracción citosólica (CYT o S2, *supernatant2*) a  $-80^{\circ}\text{C}$  y los *pellets* se resuspendieron en 3 ml de tampón de homogeneización y se echaron sobre un gradiente de sacarosa (3 ml de sacarosa a 1.2 M, 1.0 M y 0.85 M con Tris HCl 5 mM; pH 7.4 con inhibidores de proteasas y fosfatasas). Este gradiente fue ultracentrifugado a 100 000 g durante 2 h a  $4^{\circ}\text{C}$  (ultracentrífuga Beckman XE-90, rotor SW 32.1) y se recogió, con ayuda de una jeringuilla, la interfase situada entre los gradientes de 1.2 M y 1.0 M de sacarosa (alrededor de 500  $\mu\text{l}$ ), que corresponde a los sinaptosomas (SPM). Los SPM fueron lavados con 5 volúmenes (2 ml por SPM) de tampón Tris HCl 5 mM, pH 7.4 (con inhibidores de antiproteasas y antifosfatasas) y se centrifugaron a 40 000 g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  (centrífuga Sorvall RC-5C, rotor SM-24, FisherScientific, Madrid, España). Los *pellets* resultantes fueron resuspendidos en 1 ml de tampón Tris HCl 5 mM; pH 7.4 con inhibidores de antiproteasas y antifosfatasas, se hicieron alicuotas y se centrifugaron a 21 000 g durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  (centrífuga Eppendorf 5810R, Eppendorf, Madrid, España). Se eliminó el sobrenadante de cada tubo y los *pellets*, correspondientes a la fracción SPM, se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente una parte de los *pellets* fueron descongelados en hielo (otra parte se queda congelada para realizar experimentos en fracción SPM). Cada *pellet* descongelado se resuspendió en 20 ml de tampón Tris HCl 20 mM, pH 6.0 (con Triton X-100 1% con inhibidores de antiproteasas y antifosfatasas), se incubó en un agitador durante 30 min y se centrifugó a 35 000 g durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  (centrífuga Sorvall RC-5C, rotor SM-24, FisherScientific, Madrid, España). Los sobrenadantes resultantes son la fracción sináptica vesicular (SV), que se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y los *pellets* se resuspendieron en 8 ml de tampón Tris HCl 20 mM, pH 8.0 (con Triton X-100 1% con inhibidores de antiproteasas y antifosfatasas). Tras ello se incubaron en un agitador durante 60 min y se ultracentrifugaron a 140 000 g durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  (ultracentrífuga Kontrol, Centrikon T-2070, rotor de ángulo fijo TFT 55,38). Los sobrenadantes se corresponden con la fracción presináptica (Pre) y fueron guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los *pellets* corresponden a la fracción postsináptica (PSD) y se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de tampón Tris HCl 50 mM, pH 7.4 y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .





**Figura 2.** Esquema de los principales pasos de la preparación de fracciones subcelulares de las muestras de sujetos con esquizofrenia y de sus respectivos controles para la técnica de Western Blot. En la foto de la derecha de la figura se observa el gradiente de sacarosa y la flecha roja señala los SPM que se extrajeron.

Las muestras emparejadas de sujetos con esquizofrenia y sujetos control fueron procesadas de manera simultánea. De todas las fracciones se guardaron pequeñas alícuotas para realizar la cuantificación proteica. Para esta cuantificación se usó el kit de ensayo de proteínas DC y se utilizó BSA como estándar.

En algunos de los ensayos de caracterización fue necesario preparar las muestras sin inhibidores de proteasas ni fosfatasa para estudiar la degradación de la muestra (ver apartado 3.1.3, *estudio de proteólisis*).

### 3.1.3. Preparaciones de las muestras para ensayos de caracterización

Para algunos ensayos de caracterización de la expresión de espinofilina se utilizaron preparaciones de muestra específicas. Estos estudios se realizaron en una mezcla o pool de cortezas prefrontales humanas *postmortem* de 4-5 sujetos sin ninguna patología psiquiátrica (descartando las meninges, sustancia blanca y vasos sanguíneos en la medida de lo posible).

- **Ensayo de inmunoprecipitación**

Se realizó el lisado del homogeneizado total de cortezas prefrontales humanas utilizando un tampón de lisis (Tris HCl 10mM, Tris-ton X-100 1% con inhibidores de proteasas y fosfatasa). Las muestras lisadas se incubaron en rotación durante 3 horas a 4°C con bolas de agarosa recubiertas por proteína A/G (Santa Cruz, sc-2003) para eliminar todo lo que se une a estas bolas de manera inespecífica (proceso denominado *pre-clearing*). Posteriormente se eliminaron estas bolas, precipitándolas con una centrifugación a 12 000 g durante 2 min, y los sobrenadantes fueron incubados con el anticuerpo correspondiente anti-espinofilina (LifeSpan BioSciences, LS-C162085 o Santa Cruz, sc-373974) a 4°C durante la noche en rotación. Al día siguiente se añadieron bolas de agarosa recubiertas por proteína A/G y se incubaron las

## Estudio de $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

muestras durante 3 h más a 4°C. El inmunoprecipitado se obtuvo mediante centrifugación de la muestra a 12 000 g durante 2 min, realizándose 3 lavados consecutivos con tampón de lisis y centrifugación. La elusión de las muestras se realizó durante 5 min a 95°C en tampón de muestras para electroforesis (DTT 100 mM, SDS 2%, glicerol 8% y azul de bromofenol 0.01%). Las muestras fueron centrifugadas a 12 000 g durante 5 min para separar las bolas de los sobrenadantes, que se guardaron a -80°C para analizarlos mediante la técnica de Western Blot.

- **Estudio de proteólisis**

Para este ensayo se utilizaron muestras procesadas hasta la fracción subcelular enriquecida en membranas. Algunas muestras se procesaron con inhibidores de proteasas y fosfatasa y otras sin estos inhibidores para poder ver la degradación.

Para realizar un estudio **tiempo dependiente de la posible proteólisis**, las muestras fueron incubadas a 37°C durante diferentes tiempos, entre 0 y 180 min. Las muestras sin inhibidores de fosfatasa y proteasas se incubaron durante 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min, mientras que las muestras con inhibidores de proteasas y fosfatasa se incubaron durante 0 y 180 min. Al finalizar la incubación, se guardaron las diferentes muestras procesadas a -80°C hasta su uso en experimentos de Western Blot.

Para realizar un estudio **temperatura dependiente** las muestras, procesadas sin inhibidores de proteasas y de fosfatasa, fueron incubadas durante 15 min a diferentes temperaturas, entre 4°C y 95°C. Las muestras se incubaron a 4°C, 30°C, 37°C, 50°C, 65°C, 80°C y 95°C. Al finalizar la incubación, se guardaron las diferentes muestras procesadas a -80°C hasta su uso en experimentos de Western Blot.

Para estudiar el **efecto de la congelación y descongelación** de las muestras (con inhibidores de proteasas) se realizaron 5 ciclos completos de ambas fases donde se realizó una primera fase de congelación a -80°C durante 20 min y una segunda fase a 4°C hasta que se producía la descongelación total de la muestra. Al finalizar la incubación, se guardaron las diferentes muestras procesadas a -80°C hasta su uso en experimentos de Western Blot.

- **Ensayo de degradación dependiente de calcio**

Para este estudio se utilizaron muestras procesadas hasta la fracción subcelular rica en membranas. Dentro de este estudio las muestras fueron incubadas a 37°C durante 5, 30 o 60 min en 6 condiciones diferentes. Las condiciones fueron las siguientes: ausencia o presencia de  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM, presencia o ausencia de EDTA 1 mM y presencia o ausencia de EGTA 1 mM. Al finalizar la incubación, se guardaron las diferentes muestras procesadas a -80°C hasta su uso en experimentos de Western Blot.

- **Ensayo de desfosforilación**

Muestras procesadas hasta la fracción subcelular rica en membranas se incubaron con dos fosfatasas por separado, Lambda (Santa Cruz, sc-200312) y fosfatasa alcalina con rápida termosensibilidad (Thermo Scientific, EF0654) siguiendo las instrucciones comerciales. Las muestras se incubaron con los tampones correspondientes y en presencia o ausencia de cada una de estas fosfatasas durante 1 h (a 30°C para la fosfatasa Lambda y a 37°C para la fosfatasa alcalina). La reacción se paró al añadir EDTA 50 mM y se calentaron las muestras a 65°C durante 1 h para la fosfatasa Lambda y a 75°C durante 5 min para la fosfatasa alcalina. Al finalizar la incubación, se guardaron las diferentes muestras procesadas a -80°C hasta su uso en experimentos de Western Blot.

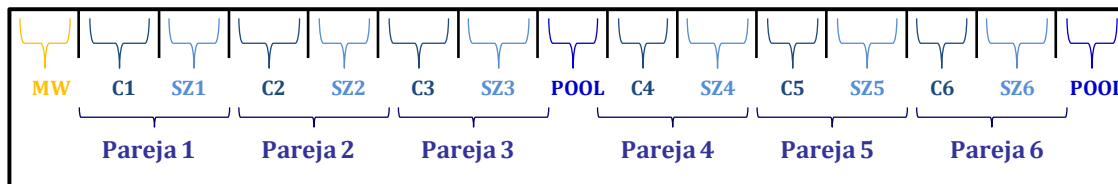
#### 3.1.4. Técnica de Western Blot

Las muestras tuvieron que prepararse con el tampón para electroforesis con condiciones desnaturalizantes y reductoras, de modo que cada muestra tuviera una concentración final de DTT 100 mM, SDS 2%, glicerol 8% y azul de bromofenol 0.01% y, posteriormente, se calentaron a 95°C durante 5 min.

- **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Para separar las proteínas en función de su peso molecular fue utilizada la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Estos geles de poliacrilamida constan de una parte superior que se llama gel de acumulación (*stacking gel*) con un 5% de poliacrilamida y una parte inferior llamada gel separador (*resolving gel*) con un 10%-12% de poliacrilamida. Tras cargar las muestras (cantidad de  $\mu\text{g}$  dependiente de la fracción de estudio y del ensayo, en la gran mayoría se cargaron 20  $\mu\text{g}$ ), se conectaron a la corriente eléctrica 30 min a 60V para que todas las proteínas se concentraran en el gel de acumulación. Posteriormente se aumentó a 120V durante aproximadamente 2 h para que las proteínas se separaran por su peso molecular a lo largo del gel separador (este paso finaliza cuando el frente azul abandona el gel separador). El tampón de electroforesis está formado por SDS 0.1%, glicina 192 mM, Tris HCl 25 mM; pH 8.3.

En todos los geles se cargó un marcador de peso molecular (*Dual color* 161-0374, BioRad, CA, USA). En los ensayos comparativos entre sujetos con esquizofrenia y sus controles, se cargó una muestra de referencia externa (pool) y las muestras emparejadas siempre se cargaron en el mismo gel y de manera contigua.

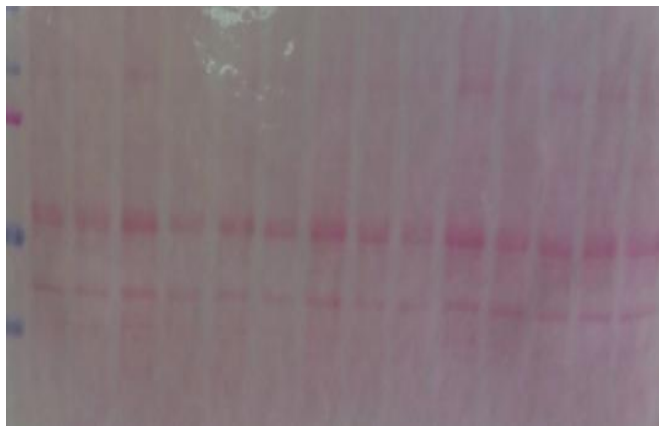


**Figura 3.** Esquema de la forma en la que fueron cargados todos los geles SDS-PAGE con las muestras de sujetos con esquizofrenia (SZ) y sus respectivos controles (C) emparejados y la muestra de referencia (pool).

- **Transferencia a membranas de nitrocelulosa**

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa gracias a un campo eléctrico. Los geles de poliacrilamida y dichas membranas de nitrocelulosa se pusieron en contacto directo rodeadas de papeles de filtro Whatman (3 MM) y esponjas para mantener el contacto y tenerlos bajo presión dentro del cassette. La transferencia se llevó a cabo durante 60 min a 110V, en hielo y con agitación constante en el tampón. El tampón de transferencia está compuesto por metanol 20%, glicina 192 mM, Tris HCl 25 mM; pH 8.3.

Posteriormente se sumergieron las membranas en Ponceau S (Ponceau S rojo 0.5% y ácido acético 1%) para comprobar que se produjo bien el traspaso de proteínas de los geles a las membranas. Después se lavaron las membranas a temperatura ambiente durante 30 min (3 lavados de 10 min) en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.38 mM; pH 7.4) para eliminar el metanol que pudiera quedar en las membranas.

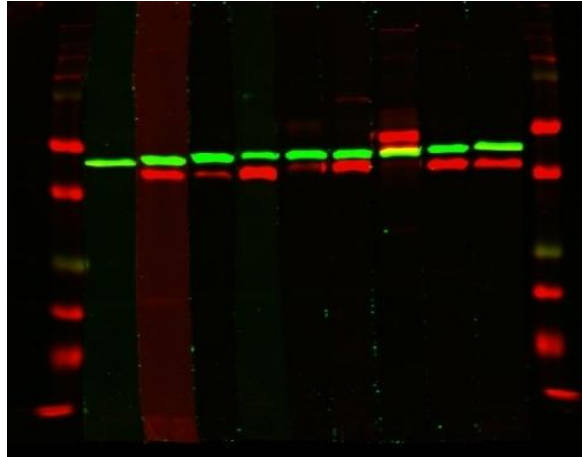


**Figura 4.** Membrana de nitrocelulosa tras la tinción con Ponceau S.

- **Bloqueo e inmunodetección**

Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con la solución de bloqueo (leche desnatada 5%, Tween 20 0.1% en PBS) para reducir la señal inespecífica. Posteriormente las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con agitación constante y con el anticuerpo correspondiente (diluidos en leche desnatada 5%, Tween 20 0.1% en PBS) (indicados en la tabla de la sección 2.1). Al día siguiente las membranas se lavaron durante 30 min (3 lavados de 10 min) a temperatura ambiente con PBS. Tras estos lavados las membranas

fueron incubadas con anticuerpos secundarios fluorescentes conjugados anti-IgG (diluidos en leche desnatada 5%, Tween 20 0.1% en PBS) (indicados en la tabla de la sección 2.1) durante 90-120 min a temperatura ambiente con agitación constante. Al finalizar esta incubación las membranas se volvieron a lavar durante 30 min (3 lavados de 10 min) a temperatura ambiente con PBS. La señal inmunoreactiva y los valores de intensidad integrada fueron detectados utilizando el sistema de imagen infrarroja Odyssey (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA).



*Figura 5. Inmunodetección de diferentes anticuerpos en el sistema Odyssey tanto primarios como secundarios con diferentes fluroforos que actúan a longitudes de onda diferentes. Los rojos que se ven en rojo emiten a una longitud de onda óptima a 680nm y los que observamos en verde lo hacen a una longitud de onda de 800nm.*

- **Cuantificación de la señal inmunoreactiva**

La cuantificación de las señales se realizó mediante el programa Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA). Los valores fueron corregidos por los valores de inmunoreactividad de  $\beta$ -actina y, en los casos de estudio de sujetos con esquizofrenia frente a controles también se corrigió por el valor de la muestra referencia (pool). Todas las muestras fueron evaluadas mínimo por triplicado.

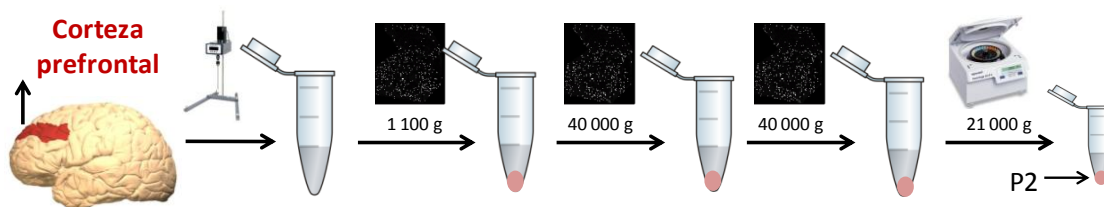
### **3.2. Ensayo de proximidad de centelleo (SPA)**

#### **3.2.1 Preparación de la fracción subcelular enriquecida en membranas (P2) para SPA**

Se pesó 1 g de corteza prefrontal de cada uno las de los sujetos (descartando las meninges, sustancia blanca y vasos sanguíneos en lo posible) y se homogeneizaron (10 pulsos a máxima velocidad) en 20 volúmenes de tampón de homogeneización (Tris HCl 5 mM con 0.32 M de sacarosa; pH 7.4). Los homogeneizados fueron centrifugados a 1100 g a 4°C durante 15 min (centrífuga Sorvall RC-5C, rotor SM-24, FisherScientific, Madrid, España). Los sobrenadantes se volvieron a centrifugar a 40 000 g a 4°C durante 10 min. Los *pellets* se resuspendieron en 10 volúmenes de tampón de homogeneización y fueron centrifugados a 40

## Estudio de $\alpha_2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

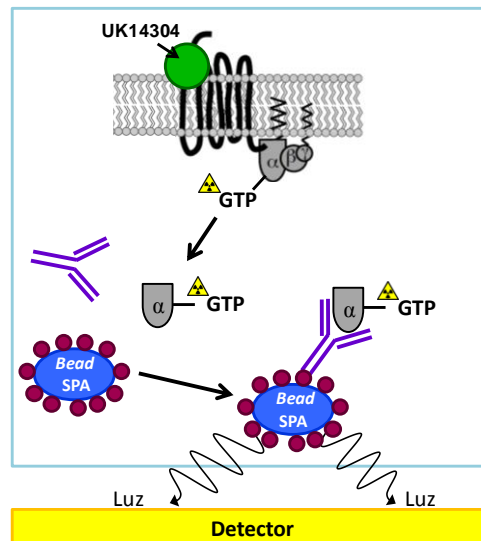
000 g a 4°C durante 10 min. Los *pellets* resultantes se resuspendieron en 5 volúmenes de tampón de centrifugación (Tris HCl 50 mM, EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 1 mM; pH 7.4). El contenido proteico fue determinado por el método de Bradford utilizando BSA como estándar. Se realizaron alícuotas de 0.6 mg y fueron centrifugadas a 21 000 g a 4°C durante 10 min (centrífuga Eppendorf 5810R, Eppendorf, Madrid, España). Los sobrenadantes fueron descartados y se guardaron los pellets secos a -80°C hasta realizar los ensayos. Las muestras emparejadas fueron procesadas de manera simultánea.



**Figura 6.** Esquema de los principales pasos de la preparación de fracciones subcelular rica en membranas de las muestras de sujetos con esquizofrenia y sus respectivos controles para la técnica de SPA.

### 3.2.2. Técnica de SPA

El estudio de la actividad específica de los diferentes subtipos de proteínas G $\alpha$  se realizó mediante la técnica denominada ensayo de proximidad de centelleo (SPA). Esta técnica consiste en una combinación de la técnica de unión de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S con la inmunoprecipitación de anticuerpos específicos de los diferentes subtipos de proteínas G $\alpha$ . Estos ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos (Perkin Elmer, LifeSciences, Maanstraat, Germany) con un volumen final de 200  $\mu$ l que contiene EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NaCl 100 mM, DTT 0.2 mM, Tris HCl 50 mM pH 7.4, [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S 0.4 nM, 12  $\mu$ g de proteína por pocillo, diferentes concentraciones de GDP según el subtipo de proteína G $\alpha$  (50  $\mu$ M para las subunidades G $\alpha_{i2}$ , G $\alpha_o$  y G $\alpha_{q/11}$ , 100  $\mu$ M para todos los demás subtipos) y el fármaco agonista, en este caso UK14304 a una concentración 10  $\mu$ M. Las placas se sometieron a una incubación de 2 h y media a 30°C con agitación (400 rpm), después se añadieron 20  $\mu$ l de Igepal al 1% y SDS al 10% por pocillo y las placas se pusieron de nuevo a 30°C con agitación durante 2 h (400 rpm). Posteriormente, fueron añadidos los anticuerpos específicos para los diferentes subtipos de proteínas G $\alpha$  diluidos en BSA 15% (G $\alpha_{i3}$  a una concentración 1:30, G $\alpha_o$  a una concentración 1:40 y todos los demás anticuerpos a la concentración 1:20) y se pusieron las placas en una incubación durante hora y media a 22°C con agitación (350 rpm). Tras este tiempo fueron añadidas las *beads* para SPA de polivinil tolueno (PVT) recubiertas por proteína A (0.75 mg por pocillo) y las placas se sometieron a una última incubación durante 3 h a 22°C con agitación (350 rpm). Por último, las placas se centrifugaron a 1000 g durante 5 min a temperatura ambiente (Centrífuga Eppendorf 5810R, Eppendorf, Madrid, España) y la radiación unida se detectó con el contador de centelleo MicroBeta Trilux (Perkin elmer S.L., Madrid, España). Los sujetos con esquizofrenia y sus controles emparejados se evaluaron de manera simultánea y todas las muestras fueron evaluadas por triplicado.



**Figura 7.** Representación gráfica de un pocillo de la placa óptica en el contador de centelleo, donde se detecta la señal tras unirse el radioligando a la proteína G $\alpha$ , el anticuerpo contra dicha proteína G $\alpha$  y las beads de SPA.

La concentración elegida del agonista  $\alpha$ 2-AR, UK14304, fue 10  $\mu$ M diluido 1:1 en DMSO y tampón de incubación (EGTA 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 30 mM, NaCl 100 mM, Tris HCl 500 mM pH 7.4). Con esta concentración se obtienen los valores de unión para el efecto máximo ( $E_{MAX}$ ) en todas las subunidades G $\alpha$ . Para probar que la estimulación de los diferentes subtipos de proteínas G $\alpha$  era mediada por los  $\alpha$ 2-AR se utilizó el antagonista RX821002 a 10  $\mu$ M, diluido en tampón de incubación (EGTA 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 30 mM, NaCl 100 mM, Tris HCl 500 mM pH 7.4) e incubado junto con el agonista. La unión inespecífica se establece como la unión de [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S que permanece en presencia de 10 mM GTP $\gamma$ S no marcado radiactivamente.

### 3.3. Expresión génica

#### 3.3.2. Extracción de ARN y purificación

La extracción y purificación de ARN de las muestras de corteza prefrontal *postmortem* de sujetos con esquizofrenia y sus controles se realizó siguiendo las instrucciones del kit comercial RiboPure™ (Thermo Fisher, MA, USA).

Para romper las células se homogeneizaron aproximadamente 100 mg de tejido de cada muestra (descartando las meninges, sustancia blanca y vasos sanguíneos en la medida de lo posible) en 10 volúmenes de TRIzol (Tiocianato de guanidinio y fenol en una solución monofásica), se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12 000 g durante 10 min a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5810R, Eppendorf, Madrid, España). Posteriormente se añadió a cada muestra 100  $\mu$ l de BCP (1-bromo-3-cloropropano), los tubos fueron agitados en un vórtex, se dejaron incubar durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12 000 g durante 15 min a 4°C. Tras este paso se observaron 3 fases en los tubos, una inferior roja que corresponde con la fase orgánica, una interfase y una fase superior incolora que corresponde a la

## Estudio de $\alpha 2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

fase acuosa donde se encuentra el ARN. Se transfirieron 400  $\mu$ l de la fase acuosa a unos tubos libres de ARNasa y se añadió a cada tubo 400  $\mu$ l de etanol al 70% y dichos tubos se agitaron en un vórtex. Las muestras se traspasaron a unos tubos recolectores y se centrifugaron a 12 000 g durante 30 s a temperatura ambiente (microcentrífuga Eppendorf AG 22331, Eppendorf, Hamburg, Germany). Se descartó el líquido, se añadieron 700  $\mu$ l de tampón de lavado I a cada tubo y se centrifugaron a 12 000 g durante 30 s a temperatura ambiente. Se descartó la parte inferior del tubo colector, la parte superior se metió en una parte inferior nueva, se añadieron 500  $\mu$ l de tampón de lavado II a cada tubo y se centrifugaron a 12 000 g durante 30 s a temperatura ambiente. Se descartó el líquido, se volvió a lavar con el tampón de Lavado II y se volvieron a centrifugar las muestras en las mismas condiciones. Se descartó la parte inferior de los tubos y la superior se metió dentro de un tubo recolector, se añadieron 100  $\mu$ l de agua libre de ARNasa a cada tubo y se incubaron 1 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron durante 2 min a 12 000 g a temperatura ambiente y de aquí obtuvimos el ARN purificado que se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La concentración de ARN y su calidad (medida a partir de los ratios de observancia 260/280 y 260/230) fueron determinadas en el espectómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher, MA, USA). El RIN (número de integridad de ARN, otro indicativo de la calidad del ARN) fue determinado mediante el aparato Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, CA, USA) utilizando el kit Agilent RNA 6000 Nano y los chips RNA Nano siguiendo las instrucciones comerciales.

### 3.3.3. Transcripción inversa

La transcripción inversa se realiza para obtener ADNc a partir del ARN purificado, para ello se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher, MA, USA) siguiendo sus instrucciones.

Previamente a realizar esta transcripción inversa, las muestras de ARN se sometieron a un tratamiento con ADNasa para eliminar los restos de ADN genómico que pudieran quedar en dichas muestras y contaminar los pasos siguientes. Para ello, se cogió 1  $\mu$ g de ARN de cada muestra y se le añadió 1  $\mu$ l de tampón de reacción de ADNasa 10X, 1  $\mu$ l de ADNasa y se completó con H<sub>2</sub>O molecular hasta tener un volumen final de 10  $\mu$ l. Estas muestras se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se les añadió 1  $\mu$ l EDTA 25 mM para frenar la actividad de la ADNasa. Finalmente, las muestras se calentaron durante 10 min a  $65^{\circ}\text{C}$ .

De las muestras de ARN tratadas con ADNasa se cogieron 10  $\mu$ l (1  $\mu$ g de ARN) y se mezclaron con 10  $\mu$ l de la Master Mix de transcripción inversa 2X (contiene cebadores o *primers*, nucleótidos, transcriptasa inversa y tampón). El proceso de transcripción inversa se realizó en el

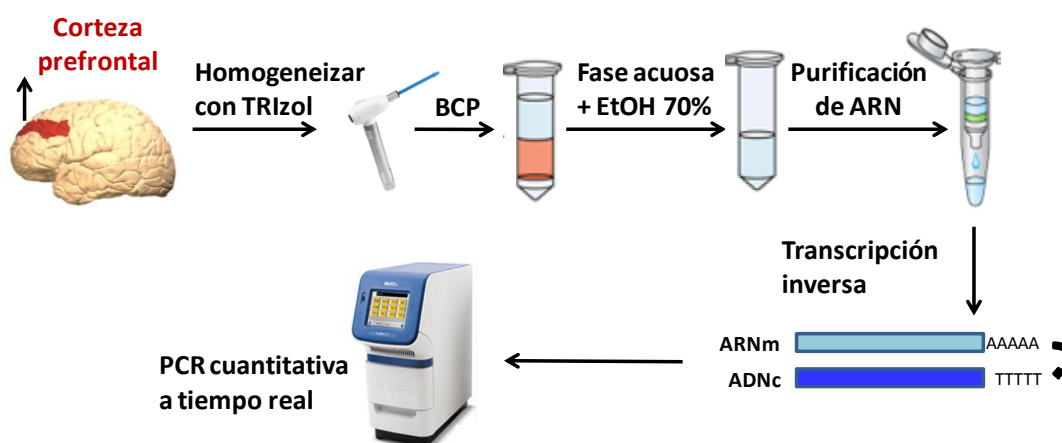


sistema StepOne™ (Applied Biosystems™, CA, USA) en placas ópticas de 96 pocillos (Applied Biosystem™, California, USA) con las siguientes condiciones:

	Activación enzimática	Retrotranscripción	Inactivación enzimática	Mantenimiento
<b>Temperatura</b>	25°C	37°C	85°C	4°C
<b>Tiempo</b>	10 minutos	2 horas	5 segundos	∞

**Tabla 7. Condiciones utilizadas para realizar la transcripción inversa de ARN a ADNc.**

Todas las muestras emparejadas fueron procesadas en paralelo y, en este último paso se utilizó como control negativo H<sub>2</sub>O molecular. El ADNc resultante se diluyó a una concentración de 5 ng/μl con H<sub>2</sub>O molecular y se guardó a -20°C hasta su uso.



**Figura 8. Esquema de los principales pasos de la extracción y cuantificación de ARN de las muestras de corteza prefrontal humana postmortem de sujetos con esquizofrenia y sus controles emparejados.**

### 3.3.4. Cuantificación de ADNc mediante RT-qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) fue utilizada para cuantificar el ADNc de los genes seleccionados (ADRA2A y ADRA2C) en muestras de corteza prefrontal humana *postmortem* y en muestras de corteza de rata.

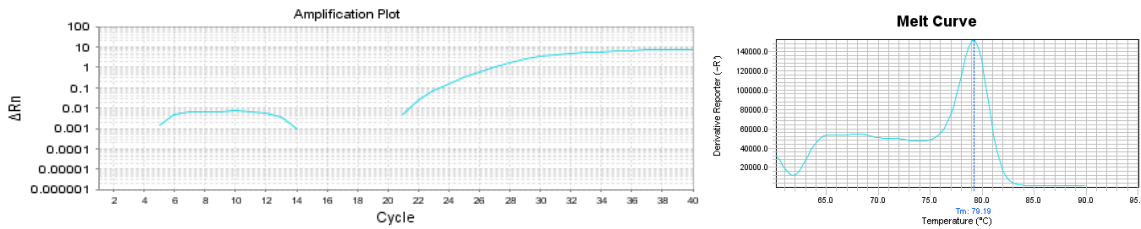
Estos experimentos se realizaron en placas ópticas de 96 pocillos (Applied Biosystem™, California, USA), las reacciones qPCR se llevaron a cabo con Fast SybrGreen Master Mix (Thermo Fisher, MA, USA) para los genes de estudio y con Taqman® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem™, California, USA) para los genes de referencia. Todas las placas se midieron con StepOne™ system (Applied Biosystem™, California, USA).

El volumen final de la reacción llevada a cabo con Fast SybrGreen Master Mix contenía 10 μl, de los cuales 4 μl son de ADNc (20 ng las muestras humanas y 4 ng las muestras de rata) y los 6 μl restantes corresponden a la Master Mix que contiene Fast SybrGreen, los *primers* del gen de estudio (ADRA2A o de ADRA2C a una concentración final de 0.8 μM para muestras humanas, y de ADRA2A o de ADRA2C a una concentración final de 0.4 μM para muestras de rata) y H<sub>2</sub>O

Estudio de  $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

molecular. Las curvas de disociación se produjeron en el último paso de la PCR para verificar que el producto amplificado era el deseado.

El volumen final de la reacción hecha con Taqman® Fast Universal PCR Master Mix contenía 5  $\mu$ l, de los cuales 2  $\mu$ l eran de ADNc (20 ng de las muestras humanas y 4 ng de las muestras de rata) y los 3  $\mu$ l restantes correspondían a la Master Mix que contiene Taqman® Fast Universal PCR, las sondas de los genes de referencia (GAPDH y RSP13 para muestras humanas, GAPDH y RSP29 para muestras de rata) y H<sub>2</sub>O molecular.



**Figura 9.** La figura de la izquierda muestra una curva de amplificación de una muestra representativa, y la figura de la derecha muestra la curva de disociación de la misma muestra (solamente se puede obtener cuando usamos Fast SybrGreen Master Mix).

Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado, y las muestras de los sujetos emparejados siempre se analizaron en la misma placa. En cuanto a las muestras de rata, fueron evaluadas en la misma placa óptica las ratas control (pinchadas con salino) y los 3 grupos tratados con antipsicóticos (risperidona, clozapina y haloperidol) de manera crónica y, en otra placa, las ratas tratadas de forma aguda con los fármacos antipsicóticos y sus respectivos controles (salino). Como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O molecular en todos los casos.

Las condiciones utilizadas para realizar la RT-qPCR con Fast SybrGreen Master Mix fueron las siguientes:

	Desnaturalización inicial	40 ciclos		Curva de disociación			
		Desnaturalización	Amplificación	95°C	60°C	+0.3°C	95°C
<b>Temperatura</b>	95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	+0.3°C	95°C
<b>Tiempo</b>	20 segundos	3 segundos	30 segundos	15 segundos	1 minuto	10 segundos	15 segundos

**Tabla 8.** Condiciones utilizadas para la RT-qPCR usadas en los primers y MasterMix SybrGreen para las muestras de ADNc.

Las condiciones utilizadas para realizar la RT-qPCR con las Taqman® Fast Universal PCR Master Mix fueron las siguientes:

	Desnaturalización inicial	40 ciclos	
		Desnaturalización	Amplificación
<b>Temperatura</b>	95°C	95°C	65°C
<b>Tiempo</b>	20 segundos	1 segundos	20 segundos

**Tabla 9.** Condiciones utilizadas para la RT-qPCR usadas con las sondas y MasterMix Taqman.

La cantidad de ARNm de los genes de estudio, ADRA2A y ADRA2C, fue corregida por una muestra de referencia (pool), y los genes de referencia GAPDH y RSP13 en las muestras de corteza prefrontal humana y, por GAPDH y RSP29 en muestras de corteza de rata. Para este análisis se utilizó el método  $\Delta\Delta Ct$ :

$$\Delta\Delta Ct = (Ct(\text{gen diana})_{\text{muestra}} - Ct(\text{gen de referencia})_{\text{muestra}}) - (Ct(\text{gen diana})_{\text{muestra de referencia}} - Ct(\text{gen de referencia})_{\text{muestra de referencia}}).$$

### 3.4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

#### 3.4.2. Extracción de ADN

- **Digestión de la cromatina por la nucleasa microcócica (MNAsa)**

Se pesaron 120 mg de corteza prefrontal *postmortem* de cada sujeto (descartando las meninges, sustancia blanca y vasos sanguíneos en lo posible) y se homogeneizaron en tampón de homogeneización (MgCl<sub>2</sub> 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, Tris HCl 10 mM; pH 7.5). A continuación, se echó 1 U/ml de nucleasa microcócica (MNAsa) incubando las muestras durante 10 min a 37°C. La actividad de esta enzima se paró añadiendo EDTA 10 mM. Después, a cada muestra se le añadieron 9 volúmenes de tampón hipotónico de lisis (benzamidina 0.1 mM, PMSF 0.1 mM, DTT 1.5 mM y EDTA 0.2 mM; pH 8.0) y se incubaron durante 1 h en hielo, con agitación cada 10 min. Las muestras se centrifugaron a 1000 g (Centrífuga Eppendorf 5810R, Eppendorf, Madrid, España) durante 10 min a 4°C y se descartó el material no solubilizado. La cromatina solubilizada se diluyó en 10 volúmenes de tampón de incubación (EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, Tris HCl 200 mM; pH 7.5). Se hicieron varias alícuotas de 1 ml y 2 alícuotas de 60 µl, estas últimas son las denominadas muestras input (o ADN nativo), y se guardaron todas ellas a 4°C hasta el paso de elusión.

- **Inmunoprecipitación**

Los anticuerpos correspondientes (concentraciones indicadas en la tabla 4 de la sección 2.1.) y las *beads* magnéticas para ChIP recubiertas de proteína A fueron añadidos a las alícuotas y se pusieron a incubar con rotación a 4°C hasta el día siguiente. Los complejos proteína/ADN/bolas magnéticas se separaron del sobrenadante utilizando un imán magnético, y se hicieron una serie de lavados de los complejos diluyéndolos en diferentes tampones. Estos lavados se hicieron en el siguiente orden: tampón de bajo contenido en sales (NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, SDS 0.1%, Triton X-100 1%, Tris HCl 20 mM; pH 8.1), tampón con alto contenido en sales (NaCl 500 mM, EDTA 2 mM, SDS 0.1%, Triton X-100 1%, Tris HCl 20 mM; pH 8.1), tampón de lavado del complejo inmune con LiCl (LiCl 250 mM, EDTA 1 mM, IGEPAL 0.01%, ácido

Estudio de  $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

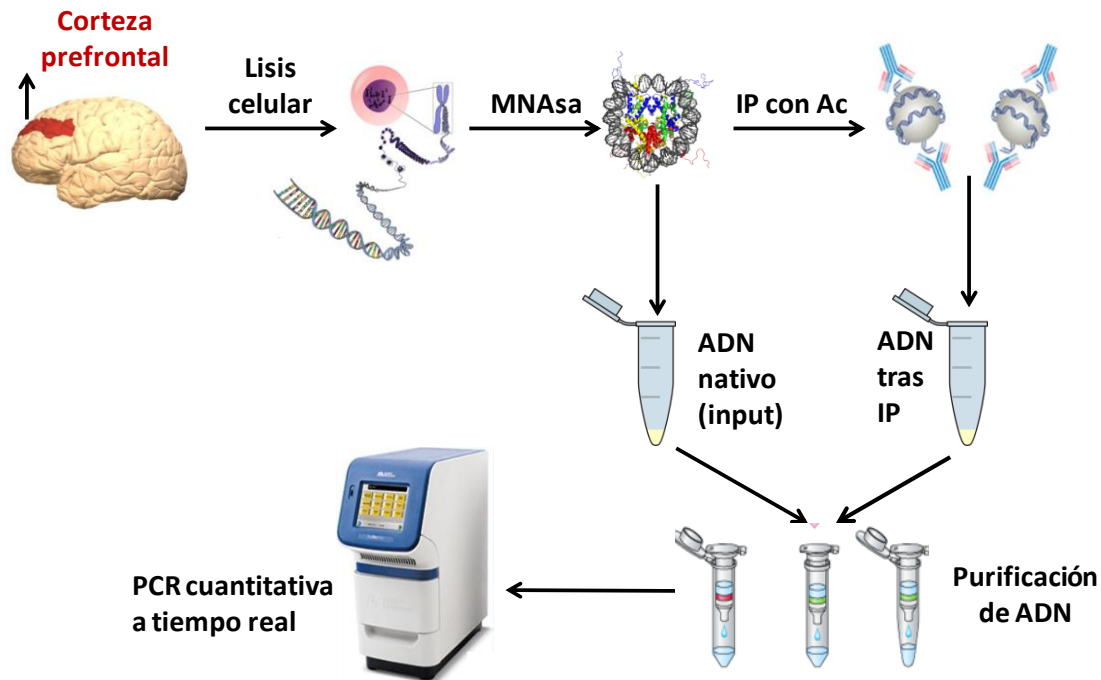
desoxicólico 0.01%, Tris HCl 10 mM; pH=8.1) y tampón TE (EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM; pH=8.1). Tras diluirlas en cada uno de estos tampones, las muestras fueron incubadas con rotación durante 20 min a 4°C. Tras ello, se pusieron en los imanes magnéticos, se eliminaron los sobrenadantes y se añadió el siguiente tampón de lavado.

- **Elusión y desunión del complejo proteína/ADN**

Los complejos proteína/ADN se rompieron gracias a la actuación del tampón de elusión para ChIP (NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M, SDS 1%) con proteinasa K (100 µg/ml), cuyo fin es liberar el ADN. Este tampón fue añadido a todas las muestras, las sometidas a inmunoprecipitación y las denominadas inputs, y se mantuvieron durante 2 h a 62°C. Tras este paso se realizó una incubación de 10 min a 95°C. A continuación, las muestras se pusieron en los imanes magnéticos y los sobrenadantes se pasaron a otros tubos, adecuados para purificar el ADN libre.

- **Purificación de ADN**

La purificación del ADN se llevó a cabo a temperatura ambiente en columnas con el kit de purificación para PCR de QIAquick (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo sus instrucciones. Se añadió el tampón PB a las columnas con las muestras, se les dio una centrifugación de 1 min a 11740 g (microcentrífuga Eppendorf AG 22331, Eppendorf, Hamburg, Germany) y se descartó el líquido de la parte inferior de las columnas. Después se añadió el tampón PE y se hicieron dos centrifugaciones seguidas de 1 min a 11740 g, descartando el líquido de la parte inferior de la columna entre ambas. Posteriormente se metió la parte superior de las columnas en tubos eppendorfs de 1.5 ml y se añadió el tampón EB, se cerraron las columnas, se incubaron durante 1 min y se realizó una centrifugación de 1 min a 11740 g. El líquido que pasó a los tubos es el ADN purificado y se diluyó 1:4 con H<sub>2</sub>O molecular. Se guardaron todas las muestras a -20°C hasta su uso.



**Figura 10.** Esquema de los principales pasos de la inmunoprecipitación de cromatina e input de las muestras de corteza prefrontal postmortem de pacientes con esquizofrenia y sus controles, y de la purificación de su ADN.

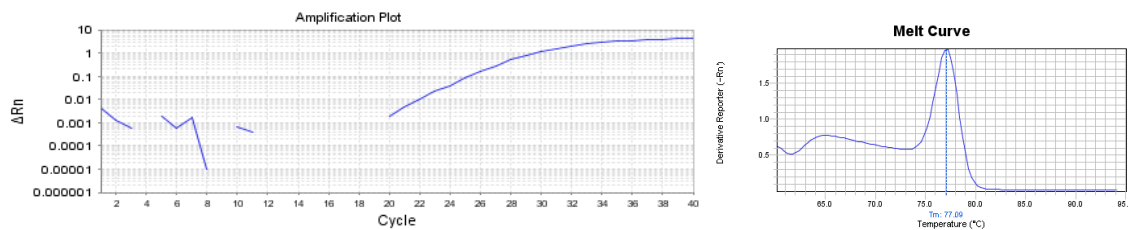
### 3.4.3. Cuantificación del ADN inmunoprecipitado mediante RT-qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) fue utilizada para cuantificar las diferentes marcas epigenéticas en los promotores de los genes seleccionados (ADRA2A y ADRA2C) en muestras de corteza prefrontal humana *postmortem*.

Estos experimentos se realizaron en placas ópticas de 96 pocillos (Applied Biosystem™, California, USA), las reacciones qPCR se llevaron a cabo con Fast SybrGreen Master Mix (Thermo Fisher, MA, USA) y se midieron con StepOne™ system (Applied Biosystem™, California, USA).

El volumen final de la reacción contenía 10  $\mu$ l, de los cuales 4  $\mu$ l eran de ADN genómico obtenido a través de las inmunoprecipitaciones y los 6  $\mu$ l restantes correspondían a la Master Mix que constaba de Fast SybrGreen, los *primers* del promotor de estudio (ADRA2A a una concentración final de 0.1  $\mu$ M o ADRA2C a una concentración final de 0.2  $\mu$ M) y H<sub>2</sub>O molecular. Las curvas de disociación se produjeron en el último paso de la PCR para verificar que el producto amplificado era el deseado. Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado. Todas las marcas epigenéticas correspondientes a un sujeto se evaluaron en la misma placa óptica y siempre junto con las muestras de su sujeto emparejado. Como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O molecular.

## Estudio de $\alpha 2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ



**Figura 11.** La figura de la izquierda muestra una curva de amplificación de una muestra representativa y la figura de la derecha muestra la curva de disociación de la misma muestra.

Para comprobar que las inmunoprecipitaciones fueron llevadas a cabo de manera adecuada, todas las muestras se evaluaron con un promotor de un gen de referencia (GAPDH a una concentración final de 0.1  $\mu$ M).

Las condiciones utilizadas para realizar la RT-qPCR con Fast SybrGreen Master Mix fueron las siguientes:

	Desnaturalización inicial	40 ciclos		Curva de disociación			
		Desnaturalización	Amplificación				
Temperatura	95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	+0.3°C	95°C
Tiempo	20 segundos	3 segundos	30 segundos	15 segundos	1 minuto	10 segundos	15 segundos

**Tabla 10.** Condiciones utilizadas para la RT-qPCR usadas en los primers y MasterMix SybrGreen para las muestras de ADN genómico.

Cada inmunoprecipitación se analizó en función del aumento con respecto a la muestra input de su sujeto. Para esto se utilizó el método comparativo de las Ct:

$$\Delta Ct = Ct (\text{promotor del gen diana})_{\text{muestra ADN inmunoprecipitado}} - Ct (\text{promotor del gen diana})_{\text{6\% ADN input}}$$

### 3.5. Análisis estadístico

Todos los valores se sometieron al test de Grubbs para detectar valores atípicos. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) y en todos los casos la significancia se consideró a partir de  $p < 0.05$ .

Se realizó una regresión lineal múltiple entre edad, sexo, PMD, RIN, los valores de ADNc de cada gen y todas las marcas epigenéticas, mediante el programa SPSS 26.0 (IL, USA). Posteriormente para las variables que dieron significativas se hizo un análisis de covarianza (ANCOVA) utilizando el programa InVivoStat. El efecto de la edad, el PMD y el tiempo de almacenamiento en la conservación de la proteína se analizó mediante una correlación de Pearson de dos colas.

Las comparaciones estadísticas de los estudios tiempo y temperatura dependiente se realizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test *post hoc* Dunnett. El análisis de las diferentes subunidades de proteínas G $\alpha$  se realizó mediante el test T de Student para una muestra. El resto de comparaciones de las medias se realizaron con el test T de Student

de dos colas (pareado en los estudios de sujetos con esquizofrenia frente a controles). La comparativa entre las muestras de ratas controles y ratas tratadas con diferentes antipsicóticos (risperidona, clozapina y haloperidol) de manera crónica o aguda se realizó mediante el test ANOVA de una vía. Todos estos análisis estadísticos y su representación gráfica se realizaron con el programa GraphPad Prism 8® (GraphPad Software, Inc., CA, USA).







# Resultados





## **ARTÍCULO 1**

### **Differential $\alpha_{2A}$ - and $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor protein expression in presynaptic and postsynaptic density fractions of postmortem human prefrontal cortex**

Amaia M Erdozain, Iria Brocos-Mosquera, Ane M Gabilondo,  
J Javier Meana and Luis F Callado

Journal of Psychopharmacology (2019)  
33, 244-249

DOI: <https://doi.org/10.1177/0269881118798612>




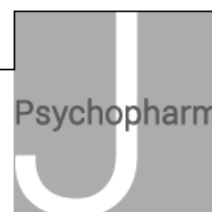
## **ARTÍCULO 1**

Los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ -AR) son receptores de membrana acoplados a proteínas G. Existen tres subtipos, con una elevada homología entre ellos:  $\alpha_{2A}$ -AR,  $\alpha_{2B}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR. Los diferentes subtipos se distribuyen de manera diferente a lo largo del encéfalo. El subtipo  $\alpha_{2A}$ -AR es el mayoritario en casi todas las regiones cerebrales, mientras que el  $\alpha_{2C}$ -AR está altamente expresado en el caudado y, aparece también en otras zonas como la corteza prefrontal (CPF). Por su parte, la expresión del subtipo  $\alpha_{2B}$ -AR se da de manera casi exclusiva en el tálamo. Estos receptores participan en diversas funciones fisiológicas, como son el control de la liberación de neurotransmisores (DA, 5HT y NA) o la cognición. La integración de las funciones cognitivas humanas se realiza en la CPFDL. Por lo tanto, para poder determinar el rol diferente de cada uno de los subtipos en dichas funciones fisiológicas, es importante conocer la localización de los subtipos  $\alpha_{2A}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR en la CPFDL. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue determinar la distribución de los subtipos  $\alpha_{2A}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR en la CPFDL humana. En este trabajo se cuantificó mediante la técnica de Western Blot la expresión proteica de ambos subtipos de  $\alpha_2$ -AR en las fracciones subcelulares presináptica (Pre) y postsináptica (PSD) de muestras de CPFDL humana *postmortem* de sujetos controles sin ninguna patología psiquiátrica. Además se quiso evaluar el posible efecto de variables demográficas (intervalo *postmortem*, tiempo de almacenamiento, sexo y edad) en la expresión proteica de los  $\alpha_{2A}$ -AR y los  $\alpha_{2C}$ -AR. Debido a la gran homología que existe entre los  $\alpha_2$ -AR, se realizó una caracterización previa de los anticuerpos para escoger aquellos más específicos para cada subtipo de  $\alpha_2$ -AR. Esta validación se realizó utilizando células que sobreexpresan  $\alpha_{2A}$ -AR o  $\alpha_{2C}$ -AR, y dos regiones cerebrales humanas con diferente expresión para estos subtipos de  $\alpha_2$ -AR, la CPFDL (región con elevada expresión de  $\alpha_{2A}$ -AR) y el caudado (región con elevada expresión de  $\alpha_{2C}$ -AR). Como resultado de este estudio se observó que un 5% de los  $\alpha_{2A}$ -AR se encontraban distribuidos en la fracción Pre y un 95% en la PSD. Por contra, los  $\alpha_{2C}$ -AR mostraron una distribución mucho más homogénea con un 60% en la fracción Pre y un 40% en la PSD. Además, se vio que el intervalo *postmortem* puede afectar a la expresión de los  $\alpha_{2A}$ -AR en la fracción PSD. Estos resultados demuestran que los subtipos  $\alpha_{2A}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR están presentes en diferente proporción en ambas partes de la sinapsis neuronal en CPFDL humana. Estos datos podrían explicar los resultados aparentemente contradictorios producidos por fármacos agonistas y antagonistas de los  $\alpha_2$ -AR en esta región clave en funciones como la cognición.

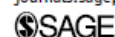


# Differential $\alpha_{2A}$ - and $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor protein expression in presynaptic and postsynaptic density fractions of postmortem human prefrontal cortex

Amaia M Erdozain<sup>1,2</sup>, Iria Brocos-Mosquera<sup>1</sup>, Ane M Gabilondo<sup>1,2,3</sup>, J Javier Meana<sup>1,2,3</sup> and Luis F Callado<sup>1,2,3</sup> 



*Journal of Psychopharmacology*  
2019, Vol. 33(2) 244–249  
© The Author(s) 2018  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/0269881118798612  
journals.sagepub.com/home/jop



## Abstract

**Background:** Three different  $\alpha_2$ -adrenoceptor ( $\alpha_2$ -AR) subtypes have been described. The  $\alpha_{2A}$ -AR and  $\alpha_{2C}$ -AR subtypes are highly expressed in the human prefrontal cortex, where they modulate neurotransmission. However, due to the lack of subtype-selective ligands, the physiological relevance of both subtypes has not been fully resolved.

**Aims:** In this context, the aim of the present study was to characterize the protein expression of both  $\alpha_2$ -AR subtypes, in different synaptic fractions of postmortem human prefrontal cortex.

**Methods:** A subcellular fractionation of the samples was performed and the protein expression of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -ARs was measured in presynaptic membranes and postsynaptic density fractions by Western blot.

**Results:** The results revealed that the  $\alpha_{2A}$ -AR subtype is mainly located postsynaptically (95±3%) whereas the remaining 5±3% is in the presynapse. Conversely, the  $\alpha_{2C}$ -AR subtype showed a similar distribution between pre- and postsynaptic membranes, with a slightly higher percentage present in the presynapse (60±2% vs. 40±2%).

**Conclusions:** These findings could explain some contradictory effects reported for  $\alpha_2$ -AR agonists and antagonists in the human prefrontal cortex. Furthermore, the present data could contribute to elucidating the therapeutic potential of selectively targeting  $\alpha_{2A}$ - or  $\alpha_{2C}$ -AR subtypes.

## Keywords

$\alpha_{2A}$ -Adrenoceptors,  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors, presynaptic, postsynaptic, human brain

## Introduction

The existence of three different  $\alpha_2$ -adrenoceptor ( $\alpha_2$ -AR) subtypes in mammals –  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  and  $\alpha_{2C}$  – is now well accepted. ADRA2A, ADRA2B and ADRA2C genes for the three distinct but related receptor proteins exist on three separate human chromosomes, C10, C2 and C4 (for  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - and  $\alpha_{2C}$ -AR, respectively), and when expressed in heterologous systems exhibit different pharmacological profiles (Hein and Kobilka, 1995; Kobilka et al., 1987; Lomasney et al., 1990; Regan et al., 1988). The three  $\alpha_2$ -ARs share a high level of homology in the transmembrane domains, whereas heterogeneous amino acid sequences appear in the intra- and extracellular domains (Raymond et al., 1990).

The three  $\alpha_2$ -AR subtypes are present in the central nervous system. However, whereas  $\alpha_{2A}$ -AR and  $\alpha_{2C}$ -AR subtypes are localized in numerous cerebral regions, the  $\alpha_{2B}$ -AR subtype is weakly expressed – mainly in the thalamus – and does not seem to contribute to the negative feedback effect on noradrenaline synthesis and release (Trendelenburg et al., 2001). Conversely, the presynaptic  $\alpha_{2A}$ -ARs and  $\alpha_{2C}$ -ARs are directly involved in mediating the inhibitory effects of exogenous agonists (Trendelenburg et al., 2001). Nevertheless, diverse works have attributed specific functions to the different  $\alpha_2$ -AR subtypes. Thus,  $\alpha_{2A}$ -AR has been related to the

negative regulation of noradrenaline release in the locus coeruleus (Callado and Stamford, 1999; Fernández-Pastor and Meana, 2002). On the other hand, whereas  $\alpha_{2A}$ -AR subtype plays a role in the control of serotonin synthesis, the control of noradrenaline synthesis is exerted by the  $\alpha_{2C}$ -ARs (Esteban et al., 1996). Moreover,  $\alpha_{2C}$ -ARs could have a more relevant effect on dopamine signalling being activated by dopamine in mouse striatum (Zhang et al., 1999) and regulating extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex (PFC) (Ihalainen and Tanila, 2002).

In this context, it has been suggested that the  $\alpha_{2C}$ -AR plays a very distinct and specific role in memory, cognition and mood disorders, in a manner different from that of the  $\alpha_{2A}$ -AR (Uys

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

<sup>3</sup>Biocruces Health Research Institute, Barakaldo, Spain

## Corresponding author:

Luis F Callado, Department of Pharmacology, Medical School, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n 48940 Leioa, Bizkaia E-48940, Spain.

Email: LF.callado@ehu.eus

et al., 2017). This fact could be due to a different synaptic location of both receptor subtypes in the human PFC, a key brain region that has been involved in the control of cognitive functions and emotions. Consequently, the understanding of the specific location of  $\alpha_2$ -AR subtypes in this brain area is clearly important, particularly from a pharmacological point of view.

Accordingly, the aim of the present study was to characterize the protein expression of  $\alpha_{2A}$ -AR and  $\alpha_{2C}$ -AR subtypes in pre-synaptic membranes and postsynaptic density (PSD) fractions of postmortem human PFC.

## Materials and methods

### Postmortem human brain samples

Human brain samples from subjects who died by sudden and violent causes (motor-vehicle accidents) were obtained at autopsy in the Basque Institute of Legal Medicine, Bilbao, Spain. All the subjects were free of psychiatric or neurological disorders based on medical history, postmortem tissue examinations and a negative toxicological screening on blood at autopsy (detection of antidepressants, antipsychotics, other psychotropic drugs and ethanol). Samples from the PFC (Brodmann's area 9) and caudate nucleus were dissected at the time of autopsy and immediately stored at  $-70^\circ\text{C}$  until assay.

The validation of the subcellular fractionation of postmortem PFC samples, the testing of the selected antibodies and the study of the relative expression of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -ARs in pre- and post-synaptic fractions were performed in preparations from a unique pool sample containing tissue from four different control subjects (two male/two female, age  $41 \pm 5$  years (range 32–54); post-mortem delay (PMD)  $16 \pm 4$  h (range 4–22); storage time  $58 \pm 6$  months (range 42–69). The potential bias effects of the variables gender, age, PMD and storage time on the immunoreactive signal of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -ARs were evaluated in 24 samples from control subjects (16 male/8 female; age  $43 \pm 2$  years (range 30–60); PMD  $18 \pm 2$  h (range 30–60); storage time  $102 \pm 12$  months (range 40–254) analysed individually.

The study was developed in compliance with policies of research and ethical review boards for postmortem brain studies.

### Subcellular fractionation of postmortem human PFC

Postmortem human PFC samples were fractionated following the methods described by Hahn et al., 2009 (method n.3) and Bermejo et al., 2014 with minor modifications. One gram of postmortem brain tissue from each subject was homogenized in a glass-Teflon tissue homogenizer containing 30 mL of cold Tris-sucrose buffer (0.32 M sucrose in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (50  $\mu\text{L/g}$  of Sigma protease inhibitor Cocktail, 5 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , and 10 mM NaF) and centrifuged at  $1100 \times g$  for 15 min (Sorvall RC-5C centrifuge, SM-24 rotor) to remove the nuclear fraction (P1). The supernatants were recentrifuged at  $40,000 \times g$  for 10 min. The new supernatants corresponded to the cytosolic fraction (cyt). The remaining membrane pellets (P2 membranes) – which contain the crude synaptosomal fraction – were resuspended in 3 mL of the same 0.32 M Tris-sucrose buffer and overlaid on a three layer discontinuous

sucrose gradient that consisted of 3 mL of each 1.2 M, 1.0 M and 0.85 M sucrose in 5 mM Tris HCl pH 7.4 buffer (supplemented with the above mentioned antiproteases/phosphatases). The gradient was ultracentrifuged at  $100,000 \times g$  for 2 h in a swinging bucket rotor (Beckman XE-90 Ultracentrifuge, SW 32.1 rotor) and the layer in the interphase between 1.0 and 1.2 M Tris-buffered sucrose solutions – corresponding to the synaptosomal plasma membrane (SPM) fraction – was collected. In order to partially remove the glucose in the samples, each SPM fraction was washed with 8 mL of 5 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer (+antiproteases/phosphatases) and centrifuged at  $40,000 \times g$  for 10 min (Sorvall RC-5C, SM-24 rotor). The resulting SPM pellets were resuspended in 1 mL of 5 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer (+antiproteases/phosphatases), centrifuged at  $21,000 \times g$  for 15 min (Eppendorf 5810R centrifuge), the supernatants were eliminated and the washed SPM pellets (corresponding to each gram of initial tissue) were stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Next day, each SPM pellet was thawed on ice, resuspended in 20 mL of 20 mM Tris-HCl pH 6.0 buffer with 1% Triton X-100 (+antiproteases/phosphatases), rotated in a rocker for 30 min and centrifuged at  $35,000 \times g$  for 20 min (Sorvall RC-5C, SM-24 rotor). These supernatants (Triton X-100 soluble fraction) corresponded to the synaptic vesicular fraction. The resulting pellets were resuspended in 5 mL of 20 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer with 1% Triton X-100 (+antiproteases/phosphatases), rotated on a rocker for 60 min and ultracentrifuged at  $140,000 \times g$  for 30 min (Kontron ultracentrifuge Centrikon T-2070, fixed angle rotor TFT 55,38). The supernatants were stored at  $-80^\circ\text{C}$  as the presynaptic membrane fraction (Pre) and the final pellets corresponding to the PSD fraction were resuspended in 900  $\mu\text{L}$  of 50 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer, aliquoted and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until assay. All steps were performed at  $4^\circ\text{C}$ . A small aliquot from each step was separated and used for protein quantification using a Bio-Rad DC Protein Assay Kit with BSA as standard.

For the validation of the antibodies selected to detect  $\alpha_{2A}$ -AR and  $\alpha_{2C}$ -AR proteins, P2 membranes from human PFC and caudate nucleus tissues were prepared as previously described (Erdozain et al., 2015).

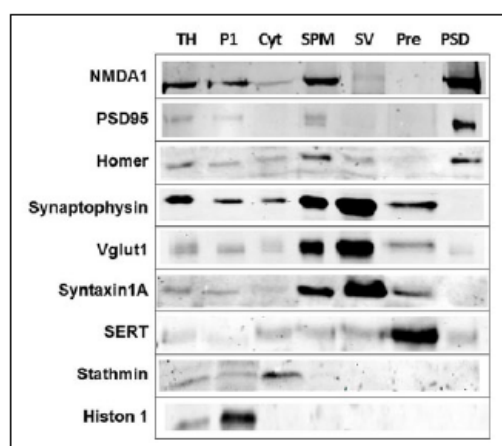
### Cells expressing human $\alpha_{2A}$ - or $\alpha_{2C}$ -ARs

Cellular membranes of CHO cells selectively expressing human  $\alpha_{2A}$ - or  $\alpha_{2C}$ -ARs were purchased from Perkin Elmer (ES-030-M400UA and ES-032-M400UA, respectively). According to manufacturer instructions, cells were kept at  $-80^\circ\text{C}$  and small aliquots were prepared in order to minimize negative impact of freeze-thawing. A volume of 10  $\mu\text{L}$  of these commercial preparations was used in Western blot assays for the validation of antibodies.

### Western blot

Western blot assays were performed as previously described (Erdozain et al., 2015). Samples were prepared in electrophoresis buffer in reducing and denaturing conditions (100 mM DTT, 2% SDS, 8% glycerol, 0.01% bromophenol blue, and heated at  $95^\circ\text{C}$  for 5 min). Denatured proteins (10–20  $\mu\text{g}$ ) were resolved on 12% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham<sup>TM</sup> Protran<sup>TM</sup> 0.45  $\mu\text{m}$  NC). After blockage for 1 h at room temperature with 5% non-fat dry milk in phosphate-buffered





**Figure 1.** Subcellular fractionation in postmortem human prefrontal cortex. Representative Western blots show the expression of different proteins that should be enriched in each fraction. These experiments were performed in a pool preparation containing samples from four subjects.

Cyt: cytosol; P1: nuclear fraction; Pre: presynaptic membrane fraction; PSD: postsynaptic density; SPM: synaptosomal plasma membrane; SV: synaptic vesicles; TH: Total homogenate.

saline (PBS), the membranes were incubated overnight at 4°C with constant agitation with the primary antibodies against: glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 (NMDA-1, Santa Cruz sc-1468, 1:1000), postsynaptic density protein 95 (PSD-95, Millipore MAB1596, 1:1000), Homer (Synaptic Systems 160 002, 1:1000), synaptophysin (Dako, 1:200), syntaxin1A (Millipore MAB336, 1:2000), vesicular glutamate transporter 1 (Vglut1, donated by Salah El Mestikawy, 1:1000), serotonin transporter (SERT, Millipore AB10514P, 1:1000), stathmin (Cell Signaling 3352, 1:200), histone1 (Santa Cruz sc-8030, 1:250),  $\alpha_{2A}$ -AR (Santa Cruz, sc-1478, 1:500),  $\alpha_{2C}$ -AR (Elabscience ENT0300, 1:1000) or  $\beta$ -actin (Sigma A1978, 1:100,000). Next morning, membranes were washed again with PBS and incubated for 1 h at room temperature with the fluorescent secondary antibodies (IRDye™ 800 or Alexa Fluor® 680 conjugated). The immunoreactive signal (integrated intensity values) was detected and quantified using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA). For the quantification analysis the immunoreactivity values were normalized for the  $\beta$ -actin signal.

### Data analysis

The analyses were carried out with GraphPad Prism 5® and results expressed as means  $\pm$  standard error of the mean. For the relative expression of the receptor subtypes in the presynaptic and PSD fractions, the relative percentage of the  $\beta$ -actin-normalized signal was calculated for each experiment. The effects of age, PMD and storage time in the study were analysed by two-tailed Pearson's correlation test and  $p$  values  $<0.05$  were considered as being statistically significant. The effect of gender was calculated by the statistical comparison between means with a two-tailed Student's  $t$ -test and  $p$  values  $<0.05$  were considered as being statistically significant. Multiple regression analysis, by means of SPSS 15.0 software, was used to confirm the contribution of nominal predictor variables (gender) and continuous

predictor variables (age, PMD, storage time) to the  $\alpha_2$ -ARs' immunoreactivity.

## Results

### Validation of the subcellular fractionation of postmortem PFC samples

In order to validate the fractionation method used, the expression of different proteins that should be enriched in each fraction was assessed by Western blot (Figure 1). As expected, the postsynaptic proteins NMDA-1, PSD-95 and Homer were strongly enriched in the PSD fraction and nearly absent in the Pre fraction. Conversely, the presynaptic proteins synaptophysin, syntaxin1A and Vglut1 were enriched in both the Pre and the synaptic vesicles fractions, whereas SERT was mainly detected in the Pre fraction. All these presynaptic proteins were almost not present in the PSD. SPM fraction showed immunoreactive signal for both the pre- and postsynaptic proteins. The cytoplasmic protein stathmin and the nuclear protein histone1 were enriched in the cyt and nuclear (P1) fractions, respectively. The proper location of all these proteins validates the correct fractionation in all the steps (Figure 1).

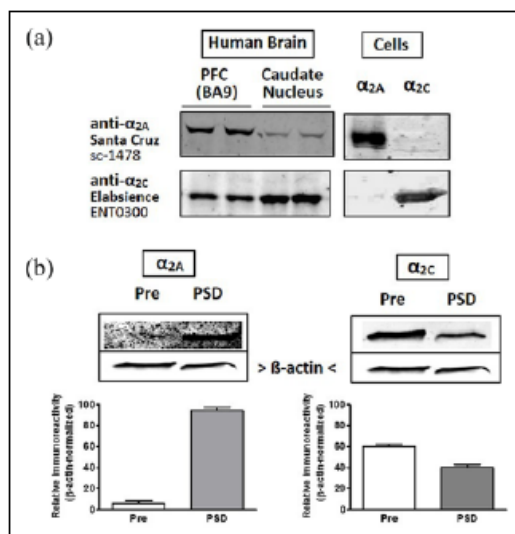
### Relative protein expression of $\alpha_{2A}$ - and $\alpha_{2C}$ -ARs in presynaptic and PSD fractions of postmortem human PFC

First, the adequacy of the selected antibodies to specifically label human  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -ARs was assessed. For this purpose, P2 membranes from two different regions of the human brain were used (PFC and caudate nucleus) where the relative amounts of both  $\alpha_2$ -AR subtypes are known to be different ( $\alpha_{2C}$ -AR protein expression is higher in the caudate nucleus compared with the PFC, and inversely for  $\alpha_{2A}$ -AR). In addition, the specificity of the antibodies was also validated using commercial cells that express either the human  $\alpha_{2A}$ - or the human  $\alpha_{2C}$ -AR. After testing several commercial antibodies, two of them were considered satisfactory. As shown in Figure 2(a), the selected anti human  $\alpha_{2A}$ -AR antibody (Santa Cruz, sc-1478) showed a stronger expression in the PFC compared with the caudate nucleus and only labelled the membranes from cells expressing the human  $\alpha_{2A}$ -AR. On the contrary, the selected  $\alpha_{2C}$ -AR antibody (Elabscience, ENT0300) showed a stronger signal in the caudate nucleus and labelled only the membranes from cells expressing human  $\alpha_{2C}$ -AR subtype.

Using these antibodies, the relative amount of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -ARs was studied in the Pre and PSD fractions characterized in the present study using Western blot. As shown in Figure 2(b),  $\alpha_{2A}$ -AR seems to be mainly postsynaptic in the human PFC, with a relative amount of  $95 \pm 3\%$  present in the postsynapse and the remaining  $5 \pm 3\%$  in the presynapse. On the other hand, the  $\alpha_{2C}$ -AR subtype showed a more equal distribution between the pre- and postsynaptic membranes, with a higher relative amount in the presynapse ( $60 \pm 2\%$  vs.  $40 \pm 2\%$ ).

### Effects of age, gender, PMD and storage time on $\alpha_{2A}$ - and $\alpha_{2C}$ -ARs' immunoreactivity

The hypothetical influence of age at death, gender, PMD and the storage time on  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -ARs' immunoreactivity was analysed in synaptosomal, Pre and PSD fractions of 24 control



**Figure 2.** Protein expression of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -adrenoreceptors (ARs) in presynaptic (Pre) and postsynaptic density (PSD) fractions of postmortem human prefrontal cortex (PFC) by Western blot. (a) Validation of the selected antibodies using P2 membranes from two different brain regions (PFC and caudate nucleus) and membranes from commercial CHO cells expressing human  $\alpha_{2A}$ -AR or  $\alpha_{2C}$ -AR. (b) Representation and quantification of the relative amounts of  $\beta$ -actin-normalized immunoreactive signal for each receptor subtype in the Pre and PSD fractions. The experiments in human brain were performed in a pool preparation containing samples from four subjects (run 3–6 times). Bars represent the mean  $\pm$  SEM values.

samples.  $\alpha_{2A}$ -ARs' immunoreactivity significantly decreased with the PMD (4–48 h) in synaptosomes (slope =  $-2.5\%$  of basal values per hour,  $p=0.030$ ) and PSD (slope =  $-2.93\%$  of basal values per hour,  $p=0.014$ ). A multiple regression analysis confirmed these data. For the  $\alpha_{2A}$ -ARs' immunoreactivity in synaptosomes, a significant model emerged ( $F_{1,22}=5.382$ , adjusted (adj)  $R^2=0.160$ ,  $p=0.03$ ). According to this model the best predictor of  $\alpha_{2A}$ -ARs' immunoreactivity is the PMD of the subjects ( $\beta=-0.443$ ,  $p=0.003$ ), regardless of age and gender of the subjects and storage time of the samples. In the same way, for the  $\alpha_{2A}$ -ARs' immunoreactivity in PSD, a significant model emerged ( $F_{1,22}=7.150$ , adj  $R^2=0.211$ ,  $p=0.014$ ). According to this model the best predictor of  $\alpha_{2A}$ -ARs' immunoreactivity is the PMD of the subjects ( $\beta=-0.495$ ,  $p=0.014$ ), regardless of age and gender of the subjects and storage time of the samples. No significant correlation was observed with any of the other variables. These results indicate the impact of PMD over  $\alpha_{2A}$ -ARs and highlight the need for properly matching subjects for this variable when different groups are compared.

## Discussion

The present study demonstrates, for the first time, a different synaptic location of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -AR subtypes in the human PFC. These data could explain the distinct roles previously described for both receptor subtypes in modulating the function of this brain area.

Both  $\alpha_{2A}$ -AR and  $\alpha_{2C}$ -AR subtypes are expressed in the human PFC. Several studies have described that the majority of the  $\alpha_2$ -ARs in human PFC belong to the  $\alpha_{2A}$ -AR subtype (Grijalba et al., 1996; Ordway et al., 1993; Sastre and Garcia Sevilla, 1994). Sastre and Garcia Sevilla (1994) estimated by radioligand binding experiments that the  $\alpha_{2A}$ -AR subtype could represent approximately 87% of the total  $\alpha_2$ -AR population in the human PFC. In the present work, we observed that a great majority of  $\alpha_{2A}$ -ARs are located postsynaptically ( $95\pm 3\%$ ) while  $\alpha_{2C}$ -AR subtype would be distributed more homogeneously in both pre- and postsynaptic locations ( $60\pm 2\%$  vs.  $40\pm 2\%$ , respectively). That means that the presynaptic  $\alpha_2$ -AR population could represent approximately 12% of the total  $\alpha_2$ -AR population, with a similar proportion of  $\alpha_{2A}$  and  $\alpha_{2C}$  subtypes ( $\sim 4\%$  and  $8\%$ , respectively). By contrast, the majority of  $\alpha_2$ -AR populations would be located postsynaptically ( $\sim 88\%$  of total  $\alpha_2$ -AR), most of them belonging to the  $\alpha_{2A}$  subtype ( $\sim 83\%$   $\alpha_{2A}$  vs.  $\sim 5\%$   $\alpha_{2C}$  of total  $\alpha_2$ -ARs).

Regarding the subcellular location of  $\alpha_2$ -ARs, immunohistochemistry studies in animals have revealed their presence in the cellular soma, dendrites and axon terminals (Aoki et al., 1994). In accordance with the present results in human PFC,  $\alpha_{2A}$ -AR presence has been demonstrated on postsynaptic densities of the PFC dendritic spines of pyramidal cells in monkeys (Aoki et al., 1998; Wang et al., 2007). Conversely, it has been shown that hippocampal  $\alpha_{2A}$ -ARs in rat are located predominantly in the presynapse despite being also found in the postsynapse (Milner et al., 1998). Furthermore, a prominent postsynaptic location of  $\alpha_{2C}$ -ARs has also been reported in catecholaminergic dendrites in the rat locus coeruleus (Lee et al., 1998a). Nevertheless, in other rat brain regions,  $\alpha_{2C}$ -ARs seem to have a presynaptic location (Lee et al., 1998b). All these data suggest a different synaptic distribution of  $\alpha_2$ -AR subtypes among brain regions and probably also between species.

It is well known that presynaptically located  $\alpha_2$ -ARs act as autoreceptors and/or heteroreceptors, negatively regulating noradrenaline (Bucheler et al., 2002; Trendelenburg et al., 2001), serotonin, acetylcholine and dopamine release (Anden and Grabowska, 1976; Beani et al., 1978; Numazawa et al., 1995). The function of postsynaptically located  $\alpha_2$ -ARs is less known. It has been suggested that postsynaptic  $\alpha_2$ -ARs could bi-directionally modulate excitatory synaptic transmission of PFC pyramidal cells, depending on the noradrenergic tone. Under normal physiological status,  $\alpha_2$ -AR activation would facilitate excitatory inputs in pyramidal cells through  $G_i$ -cAMP-HCN signalling (Wang et al., 2007). By contrast, in conditions of insult or stress, when noradrenaline is extensively released,  $\alpha_2$ -ARs could protect PFC functions by the restriction of the excitatory inputs via  $G_i$ -cAMP-PKA-CaMKII-AMPA signalling (Yi et al., 2013). Additionally, postsynaptic  $\alpha_2$ -ARs mediate physiological functions, such as mydriasis in the rat, that can be modulated by antidepressant drugs (Menargues et al., 1990).

A genetic dissection (using transgenic mice) of  $\alpha_2$ -ARs' functions in adrenergic versus non-adrenergic cells has shown that only a few functions previously ascribed to  $\alpha_2$ -ARs were mediated by receptors on adrenergic neurons. All other tested effects, including analgesia, hypothermia, sedation and anaesthetic sparing, required the presence of  $\alpha_2$ -ARs as heteroreceptors on non-adrenergic cells (Gilsbach et al., 2009).

Several behavioural, pharmacological and electrophysiological studies in transgenic mice, monkeys and humans have proposed distinct and sometimes opposing roles for both  $\alpha_2$ -AR subtypes in the dorsolateral PFC. In this way, it has been suggested that noradrenaline stimulation of postsynaptic  $\alpha_{2A}$ -ARs in the PFC is critical for different cognitive processes such as working memory (Armsten and Wang, 2016). Likewise, it has been demonstrated that stimulation of postsynaptic  $\alpha_{2A}$ -ARs in dorsolateral PFC improves working memory performance in aging monkeys and humans (Jäkälä et al., 1999; Ramos et al., 2006). Moreover,  $\alpha_{2A}$ -AR agonists such as guanfacine can improve cognitive deficits in patients suffering from various brain disorders, such as ADHD and Tourette's syndrome (Armsten and Wang, 2016). This effect would be mediated by the inhibition of cAMP production induced by  $\alpha_{2A}$ -ARs agonists that would reduce the opening of HCN channels, promoting neuronal activity and increasing the efficacy of nearby synaptic inputs (Armsten and Wang, 2016). In contrast, overexpression of  $\alpha_{2C}$ -ARs in mice disrupts execution of spatial and non-spatial cognitive tasks (Björklund et al., 1999) and both preclinical and clinical studies have shown that the blockade of  $\alpha_{2C}$ -ARs by selective antagonists can improve cognitive performance. These data suggest a therapeutic potential of  $\alpha_{2C}$ -AR antagonists in neuropsychiatric disorders associated with cognitive impairments, such as depression, schizophrenia and Alzheimer's disease (Uys et al., 2017). These apparently opposite effects ( $\alpha_{2A}$ -AR agonists and  $\alpha_{2C}$ -AR antagonists improving cognition) could be explained by a different synaptic location of both  $\alpha_2$ -AR subtypes as here reported. Thus, the blockade of presynaptic  $\alpha_{2C}$ -ARs would reduce the negative feedback of these receptors on noradrenaline release. Conversely, the stimulation of the postsynaptic  $\alpha_{2A}$ -ARs would increase neuronal excitability supporting cognitive processes.

Some authors have suggested the hypothesis that an elevated noradrenergic activity in the PFC may be involved in the symptoms of schizophrenia (Ozcutin et al., 2016). Support for this hypothesis would be the disruption of the prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle response in schizophrenic patients, which is also observable in  $\alpha_{2C}$ -AR knock-out mice (Sallinen et al., 1998). The involvement of the PFC in the modulation of PPI has been suggested (Tóth et al., 2017). Thus, the previous data could be explained by a reduction in the negative feedback on noradrenaline release induced by presynaptic  $\alpha_{2C}$ -ARs present in the PFC. Conversely, the PPI was increased in  $\alpha_{2A}$ -AR knock-out mice (Sallinen et al., 1998), supporting the main postsynaptic location of this subtype suggested by the results of our study. The different synaptic location of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -AR subtypes in the human PFC could also explain that both  $\alpha_2$ -AR agonists, such as clonidine, and atypical antipsychotics that behave as  $\alpha_2$ -AR antagonists, such as clozapine or risperidone, are able to reverse PPI deficits (Le Pen and Moreau, 2002; Oranje and Glenthøj, 2013).

In conclusion, the present study demonstrates that  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -AR subtypes are present in a different proportion in both synaptic sides in the human PFC. These new data could explain some conflicting effects reported for  $\alpha_2$ -AR agonists and antagonists in this key brain region. Moreover, our present data could contribute to elucidating the therapeutic potential of selectively targeting each  $\alpha_2$ -AR subtype for the pharmacological treatment of neuropsychiatric disorders.

## Acknowledgements

The authors thank Olga Peñagarikano for her support, Amaia Nuñez del Moral for her assistance with some of the Western blot experiments and the Department of Physiology (UPV/EHU) for the access to their facilities. The authors would like to thank the staff members of the Basque Institute of Legal Medicine for their cooperation in the study.


## Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Spanish MINECO (grant number SAF2013-48586-R) and the Basque Government (grant number IT616/13 and postdoctoral fellowship to AME).

## ORCID iD

Luis F Callado  <https://orcid.org/0000-0001-9941-012X>

## References

- Anden N and Grabowska M (1976) Pharmacological evidence for a stimulation of dopamine neurons by noradrenaline neurons in the brain. *Eur J Pharmacol* 39: 275–282.
- Aoki C, Go CG, Venkatesan C, et al. (1994) Perikaryal and synaptic localization of  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor-like immunoreactivity. *Brain Res* 650: 181–204.
- Aoki C, Venkatesan C, Go CG, et al. (1998) Cellular and subcellular sites for noradrenergic action in the monkey dorsolateral prefrontal cortex as revealed by the immunocytochemical localization of noradrenergic receptors and axons. *Cereb Cortex* 8: 269–277.
- Armsten AF and Wang M (2016) Targeting prefrontal cortical systems for drug development: Potential therapies for cognitive disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56: 339–360.
- Beani L, Bianchi C, Giacomelli A, et al. (1978) Noradrenaline inhibition of acetylcholine release from guinea-pig brain. *Eur J Pharmacol* 48: 179–193.
- Bermejo MK, Milenkovic M, Salahpour A, et al. (2014) Preparation of synaptic plasma membrane and postsynaptic density proteins using a discontinuous sucrose gradient. *J Vis Exp* 91: e51896.
- Björklund M, Sirviö J, Sallinen J, et al. (1999) Alpha2C-adrenoceptor overexpression disrupts execution of spatial and non-spatial search patterns. *Neuroscience* 88: 1187–1198.
- Bucheler MM, Hadamek K and Hein L (2002) Two  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes,  $\alpha_{2A}$  and  $\alpha_{2C}$ , inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* 109: 819–826.
- Callado LF and Stamford JA (1999)  $\alpha_{2A}$ - But not  $\alpha_{2B/C}$ -adrenoceptors modulate noradrenaline release in rat locus coeruleus: Voltammetric data. *Eur J Pharmacol* 366: 35–39.
- Erdozain AM, Rubio M, Valdizan EM, et al. (2015) The endocannabinoid system is altered in the post-mortem prefrontal cortex of alcoholic subjects. *Addict Biol* 20: 773–783.
- Esteban S, Llado J and García-Sevilla JA (1996)  $\alpha_2$ -Autoreceptors and  $\alpha_2$ - heteroreceptors modulating tyrosine and tryptophan hydroxylase activity in the rat brain in vivo: An investigation into the  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353: 391–399.
- Fernández-Pastor B and Meana JJ (2002) In vivo tonic modulation of the noradrenaline release in the rat cortex by locus coeruleus somatodendritic alpha(2) adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 442: 225–229.

- Gilsbach R, Röser C, Beetz N, et al. (2009) Genetic dissection of  $\alpha_2$ -adrenoceptor functions in adrenergic versus nonadrenergic cells. *Mol Pharmacol* 75: 1160–1170.
- Grijalba B, Callado LF, Meana JJ, et al. (1996)  $\alpha_2$ -Adrenoceptor subtypes in the human brain: A pharmacological delineation of [<sup>3</sup>H]RX-821002 binding to membranes and tissue sections. *Eur J Pharmacol* 310: 83–93.
- Hahn C-G, Banerjee A, Macdonald ML, et al. (2009) The post-synaptic density of human postmortem brain tissues: An experimental study paradigm for neuropsychiatric illnesses. *PLoS One* 4: e5251.
- Hein L and Kobilka BK (1995) Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology* 34: 357–366.
- Ihalainen JA and Tanila H (2002) In vivo regulation of dopamine and noradrenaline release by  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors in the mouse prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 15: 1789–1794.
- Jäkälä P, Riekkinen M, Sirviö J, et al. (1999) Guanfacine, but not clonidine, improves planning and working memory performance in humans. *Neuropsychopharmacology* 20: 460–470.
- Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, et al. (1987) Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 238: 650–656.
- Lee A, Rosin DL and Van Bockstaele EJ (1998a) Ultrastructural evidence for prominent postsynaptic localization of  $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptors in catecholaminergic dendrites in the rat nucleus locus coeruleus. *J Comp Neurol* 394: 218–229.
- Lee A, Wissekerke AE, Rosin DL, et al. (1998b) Localization of  $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptor immunoreactivity in catecholaminergic neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 84: 1085–1096.
- Le Pen G and Moreau J-L (2002) Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia: Reversal by clozapine, olanzapine and risperidone but not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology* 27: 1:11.
- Lomasney JW, Lorenz W, Allen LF, et al. (1990) Expansion of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor family: Cloning and characterization of a human  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5094–5098.
- Menargues A, Obach R and Garcia-Sevilla A (1990) Modulation by antidepressant drugs of CNS postsynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors mediating mydriasis in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 341: 101–107.
- Milner TA, Lee A, Aicher SA, et al. (1998) Hippocampal  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptors are located predominantly presynaptically but are also found postsynaptically and in selective astrocytes. *J Comp Neurol* 395: 310–327.
- Numazawa R, Yoshioka M, Matsumoto M, et al. (1995) Pharmacological characterization of  $\alpha_2$ -adrenoceptor regulated serotonin release in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 192: 161–164.
- Oranje B and Glenthøj BY (2013) Clonidine normalizes sensorimotor gating deficits in patients with schizophrenia on stable medication. *Schizophr Bull* 39: 684–691.
- Ordway GA, Jaconetta SM and Halaris AE (1993) Characterization of subtypes of alpha-2 adrenoceptors in the human brain. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 967–976.
- Ozcutin A, Cevreli B and Uzbay T (2016) Investigation of the role of alpha-2 adrenergic receptors on prepulse inhibition of acoustic startle reflex in rats. *Synapse* 70: 501–507.
- Ramos BP, Stark D, Verduzco L, et al. (2006)  $\alpha_2A$ -adrenoceptor stimulation improves prefrontal cortical regulation of behavior through inhibition of cAMP signaling in aging animals. *Learn Mem* 13: 770–776.
- Raymond JR, Hnatowich M, Lefkowitz RJ, et al. (1990) Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes. *Hypertension* 15: 119–131.
- Regan JW, Kobilka TS, Yang-Feng TL, et al. (1988) Cloning and expression of a human kidney cDNA for an  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6301–6305.
- Sallinen J, Haapalinna A, Viitamaa T, et al. (1998) Adrenergic alpha2C-receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. *J Neurosci* 18: 3035–3042.
- Sastre M and Garcia-Sevilla JA (1994)  $\alpha_2$ -Adrenoceptor subtypes identified by [<sup>3</sup>H]RX821002 binding in the human brain: The agonist guanoxabenz does not discriminate different forms of the predominant  $\alpha_{2A}$  subtype. *J Neurochem* 63: 1077–1085.
- Tóth A, Petykó Z, Gálósi R, et al. (2017) Neuronal coding of auditory sensorimotor gating in medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 326: 200–208.
- Trendelenburg AU, Klebroff W, Hei L, et al. (2001) A study of presynaptic alpha2-autoreceptors in alpha2A/D-, alpha2B- and alpha2C-adrenoceptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364: 117–130.
- Uys MM, Shahid M and Harvey BH (2017) Therapeutic potential of selectively targeting the  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor in cognition, depression, and schizophrenia-New developments and future perspective. *Frontiers in Psychiatry* 8: 144.
- Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, et al. (2007)  $\alpha_2A$ -Adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* 129: 397–410.
- Yi F, Liu SS, Luo F, et al. (2013) Signaling mechanism underlying  $\alpha_{2A}$ -adrenergic suppression of excitatory synaptic transmission in the medial prefrontal cortex of rats. *Eur J Neurosci* 38: 2364–2373.
- Zhang W, Klimek V, Farley J, et al. (1999)  $\alpha_{2C}$  Adrenoceptors inhibit adenylyl cyclase in mouse striatum: Potential activation by dopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1286–1292.

## **ARTÍCULO 2**

### **$\alpha$ 2A- and $\alpha$ 2C-adrenoceptor expression and functionality in postmortem prefrontal cortex of schizophrenia subjects**

Iria Brocos-Mosquera, Ane M. Gabilondo, Rebeca Diez-Alarcia,  
Carolina Muguruza, Amaia M. Erdozain, J. Javier Meana and  
Luis F. Callado

European Neuropsychopharmacology

Aceptado 26 de mayo 2021



## **ARTÍCULO 2**

El tratamiento farmacológico actual de la esquizofrenia no es capaz de mejorar los déficits cognitivos de la misma e incluso puede llegar a empeorarlos. Los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ -AR) son los encargados de la regulación fina de la cognición, y alteraciones de los mismos se han relacionado con la esquizofrenia. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión proteica y la funcionalidad de los subtipos  $\alpha_{2A}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR en la corteza prefrontal dorsolateral (CPF DL) *postmortem* de sujetos con esquizofrenia y sus controles. Asimismo, se valoró si el tratamiento antipsicótico pudiera tener algún efecto sobre ellos. En este estudio se incluyeron 24 sujetos con esquizofrenia (12 con antipsicóticos en sangre en el momento de la muerte y 12 sujetos sin antipsicóticos en sangre) y 24 controles (sin patología psiquiátrica *antemortem*). Estos sujetos fueron emparejados por sexo, edad, intervalo *postmortem* y tiempo de almacenamiento. Se determinó la expresión proteica de los subtipos de  $\alpha_2$ -AR y de algunas proteínas  $G\alpha$  mediante Western Blot en las fracciones subcelulares presináptica (Pre), postsináptica (PSD) y rica en sinaptosomas (SPM). Además, se evaluó la funcionalidad de estos receptores a través de diferentes tipos de proteínas  $G\alpha$ , en una fracción rica en membranas. Este objetivo se realizó mediante experimentos de fijación de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S estimulada por el agonista UK14304, combinado con la inmunoprecipitación por anticuerpos de las distintas proteínas  $G\alpha$  (*scintillation proximity assay, SPA*). Los resultados obtenidos para los  $\alpha_{2A}$ -AR muestran un aumento en la expresión proteica, tanto en SPM como en PSD, en los sujetos con esquizofrenia con antipsicóticos en sangre; mientras que los  $\alpha_{2C}$ -AR no mostraron ningún cambio significativo. En cuanto a la funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR, se vio que había una disminución del efecto mediado a través de las proteínas  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  y  $G\alpha_o$  en los sujetos con esquizofrenia con antipsicóticos en sangre. La señalización a través de las proteínas  $G\alpha_o$  también estaba disminuida de manera significativa en los sujetos con esquizofrenia sin antipsicóticos en sangre. Además se midió la expresión de las proteínas  $G\alpha$  para comprobar que no hubiera ninguna alteración que guardara relación con las alteraciones funcionales observadas. Los resultados mostraron un aumento de la expresión de las proteínas  $G\alpha_{i2}$  y  $G\alpha_o$  en los sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre en la fracción PSD, mientras que en la fracción Pre solo se vio un aumento de las  $G\alpha_o$  en los sujetos con esquizofrenia sin presencia de antipsicóticos en sangre. Las proteínas  $G\alpha_{i3}$  no mostraron ningún cambio de expresión significativo en estas fracciones. Los presentes resultados demuestran que el tratamiento antipsicótico es capaz de modificar en sentido contrario tanto la expresión como la funcionalidad de los  $\alpha_{2A}$ -AR en la CPF DL de sujetos con esquizofrenia. Por el contrario, el subtipo  $\alpha_{2C}$ -AR no parece estar afectado ni por la patología ni por la acción del tratamiento antipsicótico.





## $\alpha$ 2A- and $\alpha$ 2C-adrenoceptor expression and functionality in *postmortem* prefrontal cortex of schizophrenia subjects

Iria Brocos-Mosquera<sup>1,2</sup>, Ane M. Gabilondo<sup>1,2,3</sup>, Rebeca Diez-Alarcia<sup>1,2,3</sup>, Carolina Muguruza<sup>1,2</sup>, Amaia M. Erdozain<sup>1,2</sup>, J. Javier Meana<sup>1,2,3</sup>, Luis F. Callado<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

<sup>3</sup>Biocruces Bizkaia Health Research Institute, Barakaldo, Bizkaia, Spain

\*Corresponding author: Department of Pharmacology, Medical School, University of the Basque Country (UPV/EHU). Barrio Sarriena s/n 48940 Leioa, Bizkaia. Spain

Email: LF.callado@ehu.eus; telephone: (+34) 94 6015704; fax: (+34) 94 6013220

### ABSTRACT

Previous evidence suggests that  $\alpha$ <sub>2</sub>-adrenoceptors ( $\alpha$ <sub>2</sub>-AR) may be involved in the pathophysiology of schizophrenia. However, postmortem brain studies on  $\alpha$ <sub>2</sub>-AR expression and functionality in schizophrenia are scarce. The aim of our work was to evaluate  $\alpha$ <sub>2A</sub>-AR and  $\alpha$ <sub>2C</sub>-AR expression in different subcellular fractions of prefrontal cortex postmortem tissue from antipsychotic-free (absence of antipsychotics in blood at the time of death) (n=12) and antipsychotic-treated (n=12) subjects with schizophrenia, and matched controls (n=24). Functional coupling of  $\alpha$ <sub>2</sub>-AR to G $\alpha$  proteins induced by the agonist UK14304 was also tested. Additionally, G $\alpha$  protein expression was also evaluated. In antipsychotic-free schizophrenia subjects,  $\alpha$ <sub>2A</sub>-AR and  $\alpha$ <sub>2C</sub>-AR protein expression was similar to controls in all the subcellular fractions. Conversely, in antipsychotic-treated schizophrenia subjects, increased  $\alpha$ <sub>2A</sub>-AR expression was found in synaptosomal plasma membrane and postsynaptic density (PSD) fractions (+60% and +79% vs controls, respectively) with no significant changes in  $\alpha$ <sub>2C</sub>-AR. [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S SPA experiments showed a significant lower stimulation of G $\alpha$ <sub>i2</sub> and G $\alpha$ <sub>i3</sub> proteins by UK14304 in antipsychotic-treated schizophrenia subjects, whereas stimulation in antipsychotic-free schizophrenia subjects remained unchanged. G $\alpha$ <sub>o</sub> protein stimulation was significantly decreased in both antipsychotic-free and antipsychotic-treated schizophrenia subjects compared to controls. Expression of G $\alpha$ <sub>i3</sub> protein did not differ between groups, whereas G $\alpha$ <sub>i2</sub> levels were increased in PSD of schizophrenia subjects, both antipsychotic-free and antipsychotic-treated. G $\alpha$ <sub>o</sub> protein expression was increased in PSD of antipsychotic-treated subjects and in the presynaptic fraction of antipsychotic-free schizophrenia subjects. The present results suggest that antipsychotic treatment is able to modify in opposite directions both the protein expression and the functionality of  $\alpha$ <sub>2A</sub>-AR in the cortex of schizophrenia patients.

### Keywords

$\alpha$ 2A-Adrenoceptors,  $\alpha$ 2C-adrenoceptors, human brain, schizophrenia, antipsychotic treatment.

### INTRODUCTION

Schizophrenia is a chronic, disabling and early-onset disease affecting around 1% of the population worldwide (McCutcheon et al., 2019). The core features of schizophrenia are positive symptoms (i.e. hallucinations and delusions), negative symptoms (i.e. social withdrawal and lack of motivation) and cognitive deficits (i.e. disturbances in selective attention, working memory and learning). Several hypotheses have

proposed a role for noradrenergic system and  $\alpha$ 2-adrenoceptors ( $\alpha$ 2-AR) in the pathophysiology and treatment of schizophrenia (Maletic et al., 2017).

The  $\alpha$ 2-AR family consists of three receptor subtypes ( $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B, and  $\alpha$ 2C), all of them present in the central nervous system, that mainly couple to G $\alpha$ <sub>i</sub>, G $\alpha$ <sub>o</sub> and G $\alpha$ <sub>s</sub> proteins (Qu et al., 2019). The  $\alpha$ 2A-AR and  $\alpha$ 2C-AR subtypes are widely distributed through the brain, whereas the  $\alpha$ 2B-AR subtype is weakly expressed

and, unlike the  $\alpha 2A$  and  $\alpha 2C$  subtypes, does not seem to participate in the negative feedback control on noradrenaline synthesis and release (Trendelenburg et al., 2001). In regard to  $\alpha 2A$ -AR and  $\alpha 2C$ -AR subtypes, it has been suggested that they could play a very distinct and specific role in controlling memory and cognition in mental disorders such as schizophrenia (Uys et al., 2017). Thus, it has been demonstrated that selective  $\alpha 2A$ -AR agonists and  $\alpha 2C$ -AR antagonists are able to improve schizophrenia cognitive symptoms (Betti et al., 2019; Uys et al., 2017). Moreover, selective  $\alpha 2C$ -AR antagonists show antipsychotic-like effects and ameliorate also social interaction deficits in animal models of schizophrenia (Savolainen et al., 2019; Uys et al., 2016). These differential subtype-selective effects may be related to a different synaptic location of both  $\alpha 2$ -AR subtypes in the human dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC), a key brain region that has been involved in the control of cognitive functions and emotions. Thus, while presynaptic  $\alpha 2$ -AR could affect neuropsychiatric symptoms through effects on neurotransmitter release regulation, postsynaptic  $\alpha 2$ -AR could induce a critical regulation of cognitive processes as working memory (Arnsten 2011). In this line, we have previously demonstrated a differential  $\alpha 2A$ -AR and  $\alpha 2C$ -AR expression in presynaptic membranes (Pre) and postsynaptic density (PSD) fractions of postmortem human prefrontal cortex, where  $\alpha 2A$ -AR is predominantly postsynaptic, whereas  $\alpha 2C$ -AR is expressed in a similar extent in both fractions (Erdozain et al., 2019). Specific alterations in the expression and/or functionality of each  $\alpha 2$ -AR subtype in the DLPFC could be directly involved in the different symptoms that appear in schizophrenia.

Thus, the aim of the present study was to assess the protein expression of  $\alpha 2A$ -AR and  $\alpha 2C$ -AR subtypes in different

subcellular fractions of postmortem DLPFC of schizophrenia subjects. Moreover, we also analysed the functionality of different  $G\alpha$  protein subtypes mediated by  $\alpha 2$ -AR activation. Finally, we evaluated  $G\alpha$  protein subtypes protein expression in the same samples.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Postmortem* human brain samples

Human brain samples were obtained at autopsy in the Basque Institute of Legal Medicine, Bilbao, Spain. Samples from the DLPFC (Brodmann's area 9) were dissected at the time of autopsy and immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay. A toxicological screening on blood at the time of death (detection of antidepressants, antipsychotics, psychotropic drugs and ethanol) was performed at the National Institute of Toxicology, Madrid, Spain. All the reported results of drugs and psychotropic drugs were confirmed by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem (UPLC-MSMS). This study included samples from 48 subjects, 24 subjects with an antemortem diagnosis of schizophrenia based on DSM and ICD criteria, and 24 control subjects (with no antemortem diagnosis of neurological or psychiatric disorders) carefully matched for age, sex, storage time and postmortem delay (time interval between death and autopsy, PMD). All of these parameters were not statistically different between groups, as shown in table 1 ( $p > 0.05$ , two tailed  $t$ -test). The schizophrenia subjects were divided into 12 antipsychotic-free (AP-free) and 12 antipsychotic-treated (AP-treated) subjects according with the presence or absence of antipsychotics in blood at the time of death.

**Table 1:** Sex, age, PMD and storage time of subjects included in the study. Quantitative variables are expressed as mean $\pm$ SEM (standard error of the mean).

	ALL		AP-free		AP-treated	
	24 C	24 S	12 C	12 S	12 C	12 S
Sex (M/F)	16/8	16/8	9/3	9/3	7/5	7/5
Age (years)	43 $\pm$ 2	43 $\pm$ 2	44 $\pm$ 2	43 $\pm$ 2	42 $\pm$ 3	42 $\pm$ 3
PMD (hours)	18 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2	15 $\pm$ 3	17 $\pm$ 4	21 $\pm$ 3	15 $\pm$ 2
Storage time (months)	102 $\pm$ 12	98 $\pm$ 6	112 $\pm$ 21	96 $\pm$ 8	92 $\pm$ 11	100 $\pm$ 10

All demographic characteristics of subjects are shown in supplementary table 1. The study was developed in compliance with policies of research and ethical review boards for postmortem brain studies.

#### Preparation of subcellular fractions for Western Blot assays

Human postmortem samples were fractionated as previously described (Erdozain et al., 2019) to obtain synaptosomal plasma membrane (SPM), postsynaptic density (PSD), and presynaptic membrane (Pre) fractions. The protein concentration of each sample was quantified using a Bio-Rad DC Protein Assay Kit with BSA as standard. Pairs of samples (1g of DLPFC tissue from each subject) from schizophrenia subjects and matched controls were always simultaneously processed. All steps were performed at 4°C and obtained fractions of each subject were stored at -80°C until assay.

#### Preparation of membrane enriched fractions for functional assays

Human postmortem membrane enriched fraction (P2 fraction) was obtained as previously described (Diez-Alarcia et al., 2016) with minor modifications. Postmortem brain samples were thawed at 4°C and homogenized (10 strokes maximum speed glass/Teflon potter) in 20 volumes of homogenization buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT and 0.32 M sucrose; pH 7.4).

The homogenates were centrifuged at 1,000 x g for 15 min at 4°C (Sorvall RC-5C centrifuge, SM-24 rotor; Fisher Scientific, Madrid, Spain). The supernatants were recentrifuged at 40,000 x g for 10 min at 4°C and the pellets were resuspended in 10 volumes of homogenization buffer and recentrifuged at 40,000 x g for 10 min at 4°C. The pellets were resuspended in 5 volumes of centrifugation buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT; pH 7.4). The P2 membranes were aliquoted (0.6 mg of protein each aliquot) and centrifuged (Eppendorf 5810R centrifuge; Eppendorf, Madrid, Spain) at 21,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatants were discarded and the pellets stored at -80°C until assay. Protein content was determined by the method of Bradford with BSA as standard. Pairs of samples from schizophrenia subjects and their matched controls were always simultaneously processed.

#### Western blot

Western blot assays were performed as previously described (Brocos-Mosquera et al., 2018) with minor modifications. Samples were prepared in reducing and denaturing conditions (100 mM DTT, 2% SDS, 8% glycerol, 0.01% bromophenol blue and heated at 95°C for 5 min). Denatured samples were resolved on 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham™ Protran™ 0.45 μm NC). Then, membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in phosphate-buffered

saline (PBS) and incubated overnight with the primary antibodies (shown in supplementary table 2) Next day, membranes were incubated with the corresponding fluorescent secondary antibodies (supplementary table 2). The immunoreactive signal was detected using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA) and was quantified (as integrated intensity values) using Image Studio Lite™ 5.2. The immunoreactivity value of the target proteins was corrected by the corresponding value of  $\beta$ -actin; and then, calculated as a percentage of a standard sample pool loaded in every single gel to control for inter-assay variability. Results are expressed as means $\pm$ SEM values, considering the mean value of the control standard sample pool as 100%. The statistical analyses and graphical representations were carried out with GraphPad Prism 8®. Statistical analysis for comparison of the means between control and schizophrenia subjects was performed by a two-tailed paired Student's *t*-test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Before the statistical analyses, the data were inspected for outliers using Grubb's test.

#### **Antibody-capture [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S scintillation proximity assay**

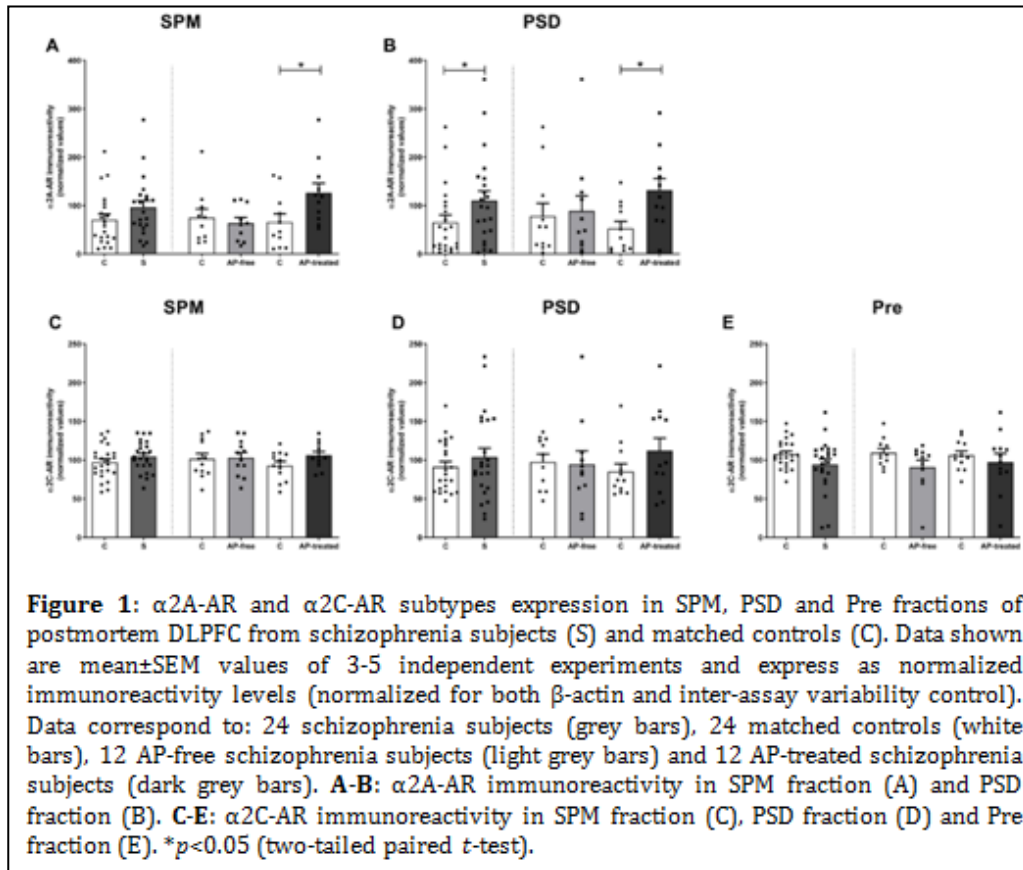
Activation of specific  $G\alpha$  protein subtypes was determined using [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding assays followed by incubation with specific antibodies against each  $G\alpha$  protein subtype of interest and SPA beads. Different concentrations of GDP were used for each  $G\alpha$  subtype assay to optimize the protocol (supplementary table 3). The chosen UK14304 concentration (10  $\mu$ M) corresponds to that promoting maximum effect (*E*<sub>max</sub>) for all the studied subtypes in preliminary concentration/effect studies (data not shown). Nonspecific binding was defined as the remaining [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding in the presence of 10  $\mu$ M of unlabelled GTP $\gamma$ S. To prove that the stimulation of  $G\alpha$  protein subtypes was mediated by  $\alpha$ 2-AR, the specific

antagonist RX821002 (10  $\mu$ M) was used to antagonize the effects. SPA assays were performed as previously described (Diez-Alarcia et al., 2016) with minor modifications. Assays were performed in 96-well IsoPlates (Perkin Elmer LifeSciences, Maanstraat, Germany). The final volume contained 1 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.4 nM [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S, 12  $\mu$ g of protein per well, and different concentrations of GDP. Bound radioactivity was detected on a MicroBeta TriLux scintillation counter (Perkin Elmer S.L., Madrid, Spain). The experiments of each schizophrenia subject and its paired control were performed simultaneously. Specific [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding values were transformed to percentage of basal [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding (binding values in the absence of any exogenous drug) obtained for each  $G\alpha$  protein. Statistical analysis of stimulation over basal binding was performed by one-sample Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). Comparison between control and schizophrenia subjects was performed by two-tailed paired Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ).

## **RESULTS**

### **Quantification of $\alpha$ 2-AR subtypes immunoreactivity in subcellular fractions of *postmortem* brain samples of subjects with schizophrenia and matched controls**

The expression of  $\alpha$ 2A-AR and  $\alpha$ 2C-AR subtypes was measured by western blot in SPM, PSD and Pre fractions. In SPM fraction, the  $\alpha$ 2A-AR immunoreactivity showed no significant difference between schizophrenia subjects and their matched controls. When the schizophrenia group was divided by presence or absence of antipsychotics in blood, a significant increase in the  $\alpha$ 2A-AR level was observed in AP-treated subjects compared with matched controls (+60 $\pm$ 22%,  $p = 0.025$ ) but not in AP-free subjects vs matched controls (Fig. 1A).



In PSD fraction, the  $\alpha 2A$ -AR immunoreactivity showed a significant increase in schizophrenia subjects compared with matched controls ( $+45 \pm 18\%$ ,  $p = 0.026$ ). This increase remained significant in AP-treated subjects vs matched controls ( $+79 \pm 27\%$ ,  $p = 0.015$ ) but not in AP-free subjects (Fig.1B).

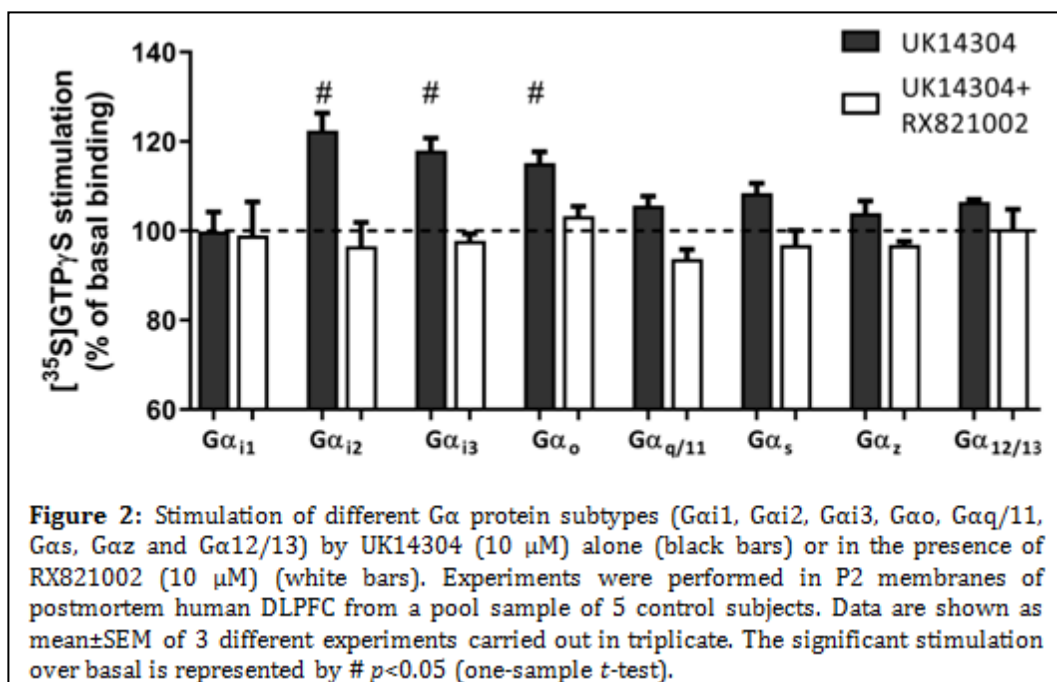
The low expression of  $\alpha 2A$ -AR in Pre fraction, as previously reported (Erdozain et al., 2019), made impossible to quantify the immunodensity of this subtype in the main part of the samples. Thus, these data are not shown and comparison between groups was not performed.

The  $\alpha 2C$ -AR levels were not significantly different between schizophrenia subjects and controls in any of the subcellular fractions analysed (SPM, PSD and Pre). There were also no significant differences in any of the fractions when schizophrenic subjects were divided into AP-treated and AP-free (Fig. 1C-E).

#### Assessment of $G\alpha$ protein subtypes stimulation by UK14304 in postmortem human brain membranes of subjects with schizophrenia and matched controls

Preliminary [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S SPA assays were carried out with the different subcellular fractions (SPM, PSD and Pre) used for western blot experiments, but no [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding was obtained for any of the studied subunits, probably due to technical incompatibilities between the cellular fractioning method and the [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S SPA assays. Thus, membrane enriched fraction preparations (P2) were used for this kind of assays.

Firstly, we characterized the profile of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding stimulation to different  $G\alpha$  protein subtypes by the  $\alpha 2$ -AR agonist UK14304 (10  $\mu$ M) in P2 membranes of postmortem human DLPFC from a pool of 5 control subjects (Fig. 2). UK14304 was only able to significantly stimulate  $G\alpha i 2$  ( $122 \pm 4\%$ ,  $p = 0.030$ ),  $G\alpha i 3$  ( $118 \pm 3\%$ ,  $p = 0.024$ ) and



G $\alpha_o$  (115 $\pm$ 2%,  $p=0.026$ ) proteins, but not any of the other subtypes studied (G $\alpha_{i1}$ , G $\alpha_s$ , G $\alpha_{q/11}$ , G $\alpha_z$  and G $\alpha_{12/13}$ ) (Fig. 2). In order to prove that this G $\alpha$  proteins stimulation was specific and mediated by the  $\alpha_2$ -AR, experiments were repeated in the presence of the  $\alpha_2$ -AR antagonist RX821002 (10  $\mu$ M). Co-incubation with RX821002 antagonized the UK14304 induced stimulation of all G $\alpha$  protein subtypes (Fig. 2).

After this preliminary characterization we proceeded to measure the stimulation of G $\alpha_{i2}$ , G $\alpha_{i3}$  and G $\alpha_o$  proteins by UK14304 (10  $\mu$ M) in P2 membranes of DLPFC samples from schizophrenia subjects and their matched controls.

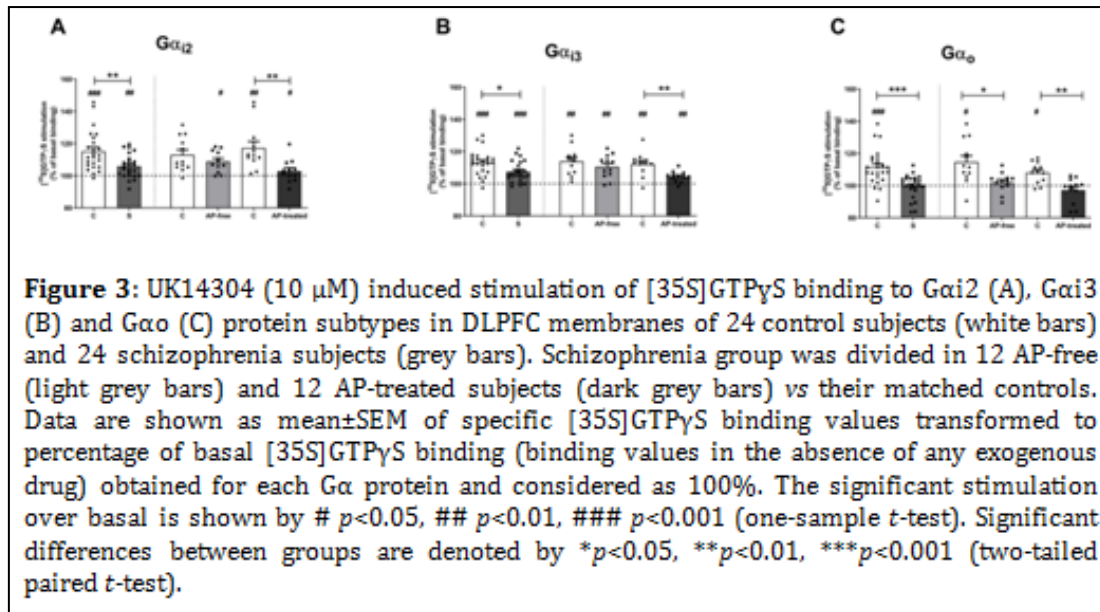
UK14304 induced stimulation of G $\alpha_{i2}$  protein was significantly decreased in schizophrenia subjects (-9 $\pm$ 3%,  $p=0.008$ ) when compared with controls (Fig. 3A). When schizophrenia subjects were divided by the presence or absence of antipsychotic in blood, G $\alpha_{i2}$  stimulation was significantly lower in AP-treated subjects vs their controls (-14 $\pm$ 4%,  $p=0.009$ ) but not in AP-free patients (Fig. 3A).

The G $\alpha_{i3}$  protein was significantly stimulated by UK14304 in all the

experimental groups (Fig. 3B). When the stimulation was compared between groups, there was a significant decrease in total schizophrenia (-6 $\pm$ 2%,  $p=0.019$ ) and AP-treated subjects (-8 $\pm$ 2%,  $p=0.004$ ) compared with their corresponding controls, but not in AP-free subjects (Fig. 3B).

The  $\alpha_2$ -AR agonist UK14304 only stimulated significantly G $\alpha_o$  protein in membranes of control subjects (Fig. 3C). Thus, when compared with controls, schizophrenia subjects showed a significant decrease in G $\alpha_o$  stimulation (-12 $\pm$ 2%,  $p=0.0004$ ). This significant decrease was observed both in AP-free (-13 $\pm$ 5%,  $p=0.029$ ) and AP-treated subjects (-11 $\pm$ 2%,  $p=0.002$ ) regarding their matched controls (Fig. 3C).

No differences were found in [35S]GTP $\gamma$ S basal binding values for any of the G $\alpha$  subunit subtypes between schizophrenia (S) and control (C) subjects (G $\alpha_{i2}$  C: 93 $\pm$ 6 fmol/mg prot.; G $\alpha_{i2}$  S: 99 $\pm$ 5 fmol/mg prot.; G $\alpha_{i3}$  C: 59 $\pm$ 4 fmol/mg prot.; G $\alpha_{i3}$  S: 59 $\pm$ 3 fmol/mg prot.; G $\alpha_o$  C: 156 $\pm$ 7 fmol/mg prot.; G $\alpha_o$  S: 164 $\pm$ 7 fmol/mg prot.), nor even when the presence or absence of antipsychotic drugs in blood at the time of death was considered (data not shown).



### Quantification of G $\alpha$ protein subtypes expression in subcellular fractions of *postmortem* brain samples of subjects with schizophrenia and matched controls

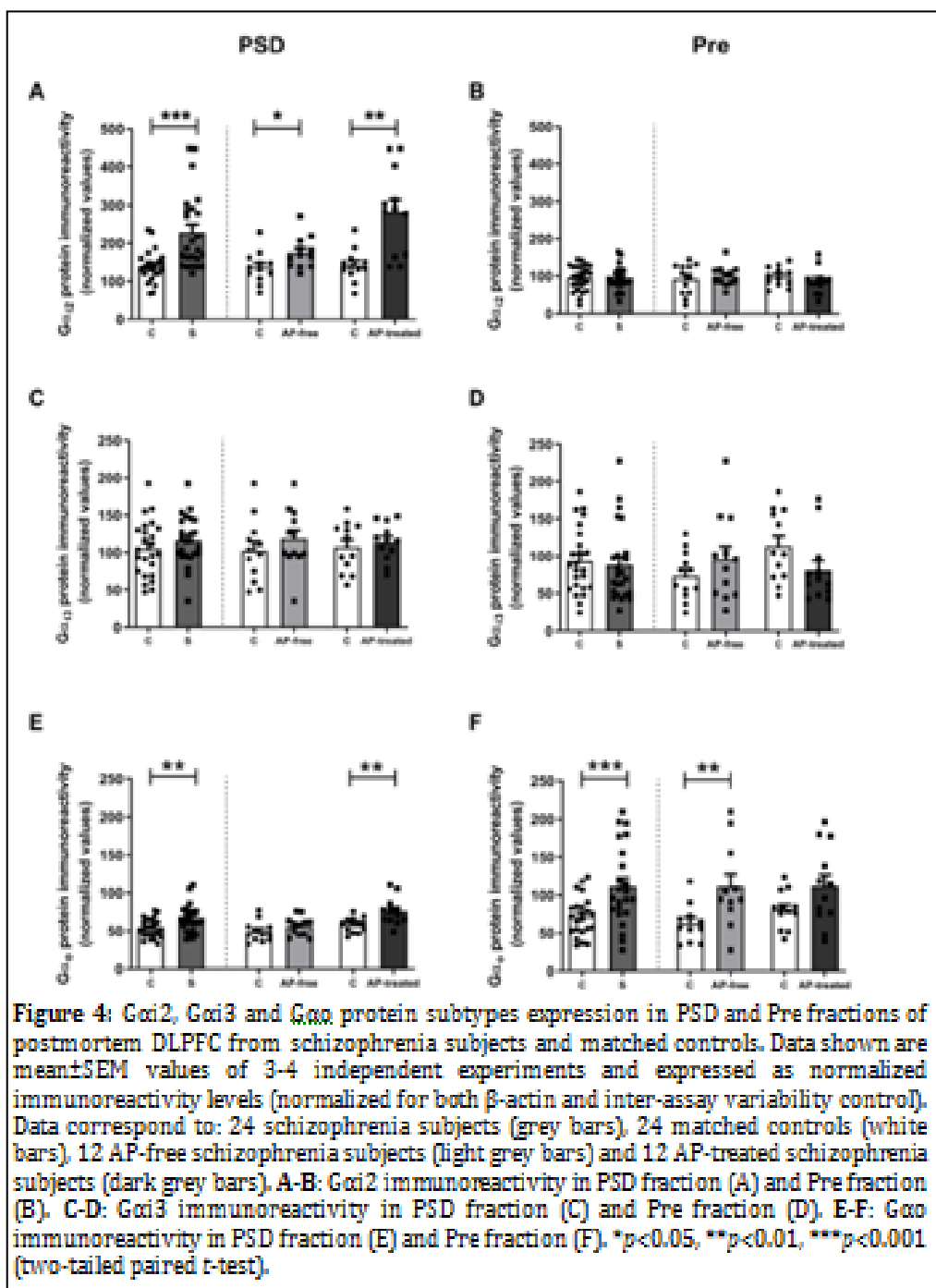
The G $\alpha$ i2, G $\alpha$ i3 and G $\alpha$ o protein subtypes expression was measured by western blot in PSD and Pre fractions. In PSD fraction, the G $\alpha$ i2 protein immunoreactivity showed a significant increase in schizophrenia subjects when compared with matched controls (+89 $\pm$ 22%,  $p$ =0.0006). This significant increase was also observed in both AP-free (+38 $\pm$ 16%,  $p$ =0.035) and AP-treated subjects (+140 $\pm$ 37%  $p$ =0.003) vs their controls (Fig. 4A). In Pre fraction, G $\alpha$ i2 protein levels were similar between the different groups analysed (Fig. 4B).

The immunoreactivity of G $\alpha$ i3 protein subtype showed no differences between schizophrenia subjects and matched controls in any fraction. There were also no differences when schizophrenia subjects were divided by presence or absence of antipsychotic drugs in blood at the time of death (Fig. 4C-D). The G $\alpha$ o protein immunoreactivity was significantly higher in PSD of schizophrenia subjects than in matched

controls (+12 $\pm$ 3%,  $p$ =0.0012). This increase remained significant in AP-treated subjects (+18 $\pm$ 5%,  $p$ =0.006), but not in AP-free subjects (Fig. 4E). In the same way, G $\alpha$ o protein expression was increased in the Pre fraction of schizophrenia subjects (+39 $\pm$ 10%,  $p$ =0.0006) compared to matched controls. However, in this fraction, the increase remained significant in AP-free subjects (+49 $\pm$ 11%,  $p$ =0.002) but not in AP-treated subjects (Fig. 4F).

### DISCUSSION

Schizophrenia is a devastating disease that significantly alters the daily lives of people who suffer from it. Currently available antipsychotics are effective for treating the positive symptoms of the illness and for reducing the risk of relapse. However, antipsychotics not only do not improve the negative and cognitive symptoms of the disease, but could even worsen them in some cases (Husa et al., 2017). Thus, the poor efficacy of antipsychotic drugs to improve cognitive impairments of schizophrenia highlights a current unmet need in the treatment of this psychiatric disorder (Forray and Buller, 2017).



In humans and non-human primates, the DLPFC is the main anatomical substrate for cognitive activities, especially working memory, representing a basic component of executive functions. In this sense, alterations of the DLPFC and its connections have been described in schizophrenia (Lett et al., 2014). The noradrenergic system has a fundamental role in the regulation of cognitive functions in the DLPFC (Robbins and Arnsten, 2009). In this context,  $\alpha 2$ -AR

have been linked with working memory and prefrontal cortex function (Wang et al., 2007, McClure et al., 2007). Under basal conditions, noradrenergic tone on layer III pyramidal cells of the DLPFC is maintained through postsynaptic  $\alpha 2$ -AR (Arnsten and Goldman-Rakic, 1985; Arnsten et al., 2012). Thus, the activation of  $\alpha 2$ -AR by selective agonists such as guanfacine enhances DLPFC-dependent working memory while unspecific activation of all  $\alpha 2$ -AR subtypes with



clonidine has little effect (Arnsten and Goldman-Rakic, 1985). Furthermore, injury to the presynaptic noradrenergic pathways enhances the actions of guanfacine, whereas  $\alpha 2A$ -AR mutations impair its procognitive activity (Arnsten and Goldman-Rakic, 1985; Franowicz et al., 2002). These data suggest that a significant part of the cognitive effects induced by  $\alpha 2A$ -AR agonists is mediated by postsynaptic  $\alpha 2A$ -AR. In this line, it has been suggested that selective  $\alpha 2A$ -AR agonists, such as PT-31, may act via postsynaptic mechanisms to enhance excitatory transmission in cortical circuits (Betti et al., 2019). Accordingly, it has been shown that  $\alpha 2$ -AR agonists increase synaptically evoked excitatory postsynaptic potentials in rat frontal cortical neurons recorded in vitro (Carr et al., 2007). Moreover, postsynaptic  $\alpha 2A$ -AR heteroreceptors stimulation has been associated with working memory and with the functional connectivity of prefrontal cortex networks through a mechanism mediated by inhibition of cAMP production (Wang et al., 2007). Alternatively, inhibition of presynaptic  $\alpha 2C$ -AR may also enhance DLPFC cognitive activity. Therefore,  $\alpha 2C$ -AR selective antagonists have also demonstrated procognitive effects (Uys et al., 2017). In this context, it would be plausible the hypothesis that alterations in the different subtypes of  $\alpha 2$ -AR found in different cell populations and/or synaptic locations in the DLPFC could be implicated in the cognitive symptoms that appear in schizophrenia.

Our present results demonstrate that  $\alpha 2A$ -AR and  $\alpha 2C$ -AR expression is not significantly altered in the DLPFC of schizophrenia subjects without antipsychotic presence in blood, although, as we will discuss further on, a decreased signalling has been detected. Previous binding studies have also reported no changes in total  $\alpha 2$ -AR protein levels in the postmortem brain of schizophrenia subjects (Dean, 2003; Klimek et al., 1999). However, they did not differentiate between  $\alpha 2$ -AR subtypes and their pre- or postsynaptic location nor did take into account the

possible effect of antipsychotic treatment.

In this sense, our results showed that antipsychotic treatment seems to increase  $\alpha 2A$ -AR levels in SPM and PSD fractions. It has been reported that many antipsychotic drugs act as  $\alpha 2$ -AR antagonists. In fact, antagonism at  $\alpha 2$ -AR seems to be more pronounced for atypical than for first-generation antipsychotics with a preference for  $\alpha 2C$ -AR over  $\alpha 2A$ -AR (Brosda et al., 2014). It would be tempting to speculate that this increase in  $\alpha 2A$ -AR expression is due to an adaptive mechanism of the DLPFC that attempts to compensate for continued  $\alpha 2$ -AR blockade caused by chronic antipsychotic treatment. In this line, it has been reported that chronic clozapine treatment significantly increased  $\alpha 1$ -AR density in rat frontal cortex (Cahir et al., 2004). Although we observed a slight trend to increased  $\alpha 2C$ -AR expression in AP-treated subjects, mainly in PSD membranes, changes in  $\alpha 2$ -AR immunodensity only reached a significant level for  $\alpha 2A$ -AR, both in SPM and PSD fractions. This could be explained by the fact that  $\alpha 2A$ -AR subtype represents the majority of  $\alpha 2$ -ARs in DLPFC, especially at postsynaptic location (Erdozain et al., 2019). In this context, it is also noteworthy to remark that all the current AP-free subjects had received antipsychotic prescription and should not be considered never-treated (naïve) subjects.

Suicide is one common confounding factor to be controlled in studies with postmortem human brain tissue. In this sense, it has been reported that  $\alpha 2$ -AR density is increased in the postmortem brain of suicide victims (Pandey and Dwivedi, 2007). In the present work, 17 of the 24 subjects with schizophrenia died by suicide. However, the number of suicide victims was very similar between AP-free (n=10) and AP-treated (n=7) subjects included in our study. This fact makes it difficult that the differences in the expression of  $\alpha 2A$ -AR found between both groups would be due to the suicide

factor. Moreover, there were no statistically significant differences in the expression of  $\alpha 2A$ -AR and  $\alpha 2C$ -AR between suicide and non-suicide patients.

Although coupling of  $\alpha 2$ -AR to G $\alpha$ s has been described in cell lines (Eason et al., 1992, Eason and Liggett, 1995) both with endogenous ligands and synthetic ones, such as UK14304 (Eason et al., 1994), no stimulation of this subunit was observed in *postmortem* human DLPFC membranes under our experimental conditions. In control samples, UK14304 triggered the activation of G $\alpha i 2$ , G $\alpha i 3$  and G $\alpha o$  subunits.

Surprisingly, and in spite of the increase in  $\alpha 2A$ -AR immunodensity, the present study reports for the first time that the  $\alpha 2$ -AR functional coupling to G $\alpha i 2$ , G $\alpha i 3$  and G $\alpha o$  proteins is reduced in the DLPFC of subjects with schizophrenia. Moreover, while the decrease in G $\alpha i 2$  and G $\alpha i 3$  proteins activation seems to be a consequence of antipsychotic treatment, the reduction of the G $\alpha o$  protein pathway activity appears both in AP-free and AP-treated subjects.

The presynaptic  $\alpha 2$ -AR couple to heterotrimeric G $\alpha i/o$  proteins when activated by noradrenaline, leading to inhibition of adenylyl cyclase and voltage-gated calcium channels that inhibit neurotransmitters release. Additionally, it has been suggested that postsynaptic  $\alpha 2$ -AR could bidirectionally modulate excitatory synaptic transmission of PFC pyramidal cells, depending on the noradrenergic tone. Under normal physiological status,  $\alpha 2$ -AR activation would facilitate excitatory inputs in pyramidal cells through G $\alpha i$ -cAMP-Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels signalling (Wang et al., 2007). By contrast, in conditions of insult or stress, when noradrenaline is extensively released,  $\alpha 2$ -AR could protect PFC functions by the restriction of the excitatory inputs via Gi-cAMP-PKA-CaMKII-AMPA signalling (Yi et al., 2013).

The decreased activity through  $\alpha 2$ -AR here reported would alter normal noradrenergic tone and cortical circuitry regulation in the DLPFC and induce some of the cognitive deficits found in schizophrenia patients. In this way, it has been reported that functional loss of the  $\alpha 2A$ -AR subtype, but not of the  $\alpha 2C$ -AR, weakened the performance of frontal cortical tasks in mice (Franowicz et al., 2002).

One of the limitations of our study is that UK14304 is a non-subtype selective agonist. Thus, we cannot determine the contribution of each  $\alpha 2$ -AR subtype to the changes in activity. In this sense, it has been reported that ~90% of the  $\alpha 2$ -AR located in the brain belong to the  $\alpha 2A$ -AR subtype (Grijalba et al., 1996; Bücheler et al., 2002). Thus, it is possible that the  $\alpha 2A$ -AR subtype located postsynaptically, being the main  $\alpha 2$ -AR subtype in the DLPFC (Erdozain et al., 2019), could be responsible for most of the  $\alpha 2$ -AR activity detected in our assays. In this sense, the activation of postsynaptic  $\alpha 2A$ -AR by selective agonists such as guanfacine could be useful to restore its normal functioning in the DLPFC and to improve cognitive function in schizophrenia, as it has been previously described in non-human primates (Arnsten and Goldman-Rakic, 1985).

As our functional assays directly measure the activation of G proteins by GPCRs, changes in the expression level of G $\alpha$  subunits must always be taken into consideration. Although previous data from our group and others, described no changes in the expression level of different G $\alpha$  subunit subtypes in membrane homogenates from DLPFC of subjects with schizophrenia (Okada et al., 1994; García-Bea et al., 2019), in the present work, an increase in expression levels of G $\alpha i 2$ , and G $\alpha o$  but not of G $\alpha i 3$ , was observed in PSD fractions in schizophrenia group. Moreover, this increase was higher in the group of samples from subjects with antipsychotic

drugs in blood at the time of death. In the presynaptic fraction only a higher expression of G $\alpha$  in AP-free subjects was found. These results highlight, again, the relevance of considering the cellular location of receptors, and suggest the existence of different pre- and postsynaptic regulatory processes. In spite of these increases in G $\alpha$  proteins expression level, no changes in [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S basal binding levels were found for any of the studied subunits.

In concordance with our results, a positive and significant correlation between  $\alpha$ 2-AR density and the abundance of G $\alpha$ i1/2, G $\alpha$ i2 and G $\beta$ , but not of G $\alpha$ i3 subunits, has been shown in postmortem human brain, suggesting the existence of a relevant relationship between these receptors and their signalling proteins (Sastre et al., 2001). Moreover, decrease in G $\alpha$ i proteins expression has been described as a primary mechanism for  $\alpha$ 2-AR desensitization processes after long-term agonist exposure (Eason and Liggett, 1992). This regulatory process would be different for  $\alpha$ 2A-AR and  $\alpha$ 2C-AR subtypes, and probably dependent on cellular background and subcellular localization.

In conclusion, our present results demonstrate that the antipsychotic treatment is able to modify both the protein expression and functionality of  $\alpha$ 2A-AR in the DLPFC of schizophrenia patients. Moreover, these changes seem to go in the opposite direction and do not affect the  $\alpha$ 2C-AR subtype. This could be explained as a compensatory mechanism of the brain itself to try to compensate for the changes induced by antipsychotic treatment. Thus, a possible role of selective  $\alpha$ 2-AR drugs in the treatment of cognitive deficits present in patients with schizophrenia or associated with the current antipsychotic treatment could be justified.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the staff members of the Basque Institute of Legal Medicine for their

cooperation in the study.

**CONFLICT OF INTEREST** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### REFERENCES

- Arnsten AF (2011) Catecholamine influences on dorsolateral prefrontal cortical networks. *Biol Psychiatry* 69:e89-99.
- Arnsten AF and Goldman-Rakic PS (1985) Alpha 2-adrenergic mechanisms in prefrontal cortex associated with cognitive decline in aged nonhuman primates. *Science* 230:1273-1276.
- Arnsten AF, Wang MJ and Paspalas CD (2012) Neuromodulation of thought: flexibilities and vulnerabilities in prefrontal cortical network synapses. *Neuron* 76:223-239.
- Betti AH, Antonio CB, Herzfeldt V, et al. (2019) PT-31, a putative  $\alpha$ 2-adrenoceptor agonist, is effective in schizophrenia cognitive symptoms in mice. *Behav Pharmacol* 30: 574-587.
- Brocos-Mosquera I, Nuñez del Moral A, Morentin B, et al. (2018) Characterisation of spinophilin immunoreactivity in postmortem human brain homogenates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 81:236-242.
- Brosda J, Jantschak F and Pertz HH (2014)  $\alpha$ 2-Adrenoceptors are targets for antipsychotic drugs. *Psychopharmacol* 231:801-812.
- Bücheler MM, Hadamek K and Hein L (2002) Two  $\alpha$ 2-adrenergic receptor subtypes,  $\alpha$ 2A and  $\alpha$ 2C, inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* 109:819-826.
- Cahir M, Mawhinney T and King DJ (2004) Differential region-specific regulation of central  $\alpha$ 1-adrenoceptor binding following chronic haloperidol and clozapine administration in the rat. *Psychopharmacol* 172:196-201.
- Carr DB, Andrews GD, Glen WB, et al. (2007) Alpha2-noradrenergic receptors activation enhances excitability and synaptic integration in rat prefrontal cortex pyramidal neurons via inhibition of HCN currents. *J Physiol* 584:437-450.
- Dean B (2003) [<sup>3</sup>H]RX821002 in human dorsolateral prefrontal cortex: no changes in postmortem tissue from subjects with schizophrenia. *Psychiatry Res* 119:25-31.
- Diez-Alarcia R, Ibarra-Lecue I, López-Cardona AP, et al. (2016) Biased Agonism of three different cannabinoid receptor agonists in mouse brain cortex. *Front Pharmacol* 7:415.
- Eason MG, Kurose H, Holt BD, et al. (1992) Simultaneous coupling of alpha 2- adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects.

## Estudio de $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

- Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs. *J Biol Chem* 267:15795-15801.
- Eason MG and Liggett SB (1992) Subtype-selective desensitization of alpha 2- adrenergic receptors. Different mechanisms control short and long term agonist promoted desensitization of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2. *J Biol Chem* 267:25473-25479.
- Eason MG, Jacinto MT and Liggett SB (1994) Contribution of ligand structure to activation of alpha 2-adrenergic receptor subtype coupling to Gs. *Mol Pharmacol* 45:696-702.
- Eason MG and Liggett SB (1995) Identification of a Gs coupling domain in the amino terminus of the third intracellular loop of the alpha 2A-adrenergic receptor. Evidence for distinct structural determinants that confer Gs versus Gi coupling. *J Biol Chem* 270:24753-24760.
- Erdozain AM, Brocos-Mosquera I, Gabilondo AM, et al. (2019) Differential  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2C-adrenoceptor protein expression in presynaptic and postsynaptic density fractions of postmortem human prefrontal cortex. *J Psychopharmacol* 33: 244- 249.
- Franowicz JS, Kessler LE, Borja CL, et al. (2002) Mutation of the alpha2A adrenoceptor impairs working memory performance and annuls cognitive enhancement by guanfacine. *J Neurosci* 22:8771-8777.
- Furray C and Buller R (2017) Challenges and opportunities for the development of new antipsychotic drugs. *Biochem Pharmacol* 143:10-24.
- García-Bea A, Miranda-Azpiazu P, Muguruza C, et al. (2019) Serotonin 5-HT2A receptor expression and functionality in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: Selective biased agonism via G $\alpha$ i1-proteins. *Eur Neuropsychopharmacol* 29:1453-1463.
- Grijalba B, Callado LF, Meana JJ, et al. (1996)  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtypes in the human brain: a pharmacological delineation of [3H]RX-821002 binding to membranes and tissue sections". *Eur J Pharmacol* 310:83-93.
- Husa AP, Moilanen J, Murray GK, et al. (2017) Lifetime antipsychotic medication and cognitive performance in schizophrenia at age 43 years in a general population birth cohort. *Psychiatry Res* 247:130-138.
- Klimek V, Rajkowska G, Luker SN, et al. (1999) Brain noradrenergic receptors in major depression and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 21:69-81.
- Lett TA, Voineskos AN, Kennedy JL, et al. (2014). Treating working memory deficits in schizophrenia: a review of the neurobiology. *Biol Psychiatry* 75:361-370.
- Maletic V, Eramo A, Gwin K, et al. (2017) The role of norepinephrine and its  $\alpha$ -adrenergic receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder and schizophrenia: A systematic review. *Front Psychiatry* 8:42.
- McClure MM, Barch DM, Romero MJ, et al. (2007) The effects of guanfacine on context processing abnormalities in schizotypal personality disorder. *Biol Psychiatry* 61:1157-1160.
- McCutcheon RA, Reis Marques T and Howes OD (2019) Schizophrenia—An Overview. *JAMA Psychiatry* doi: 10.1001/jamapsychiatry.2019.3360.
- Okada F, Tokumitsu Y, Takahashi N, et al. (1994) Reduced concentrations of the alpha subunit of GTP-binding protein Go in schizophrenic brain. *J Neural Transm Gen Sect* 952:95-104.
- Pandey GN and Dwivedi Y (2007) Noradrenergic function in suicide. *Arch Suicide Res* 11:235-246.
- Qu L, Zhou Q, Xu Y, et al. (2019) Structural basis of the diversity of adrenergic receptors. *Cell Rep* 29:2929-2935.
- Robbins TW and Arnsten AF (2009) The neuropsychopharmacology of frontoexecutive function: Monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci* 32:267-287.
- Sastre M, Guimón J and García-Sevilla JA (2001) Relationships between beta- and alpha2-adrenoceptors and G coupling proteins in the human brain: effects of age and suicide. *Brain Res* 898:242-255.
- Savolainen K, Ihalainen J, Jalkanen AJ, et al. (2019) Selective adrenergic alpha2C receptor antagonist ameliorates acute phencyclidine-induced schizophrenia-like social interaction deficits in rats. *Psychopharmacology* 236: 1245-1253.
- Trendelenburg AU, Klebroff W, Hei L, et al. (2001) A study of presynaptic alpha2-autoreceptors in alpha2A/D-, alpha2B- and alpha2C-adrenoceptordeficient mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364: 117-130.
- Uys MM, Shahid M, Sallinen J, et al (2016) The  $\alpha$ 2C-adrenoceptor antagonist, ORM- 10921, has antipsychotic-like effects in social isolation reared rats and bolsters the response to haloperidol. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 71: 108-116.
- Uys MM, Shahid M and Harvey BH (2017) Therapeutic potential of selectively targeting the  $\alpha$ 2C-adrenoceptor in cognition, depression, and

schizophrenia-New developments and future perspective. *Frontiers in Psychiatry* 8: 144.

Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, et al. (2007)  $\alpha$ 2A-Adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* 129: 397–410.

Yi F, Liu SS, Luo F, et al. (2013) Signaling mechanism underlying  $\alpha$ 2A-adrenergic suppression of excitatory synaptic transmission in the medial prefrontal cortex of rats. *Eur J Neurosci* 38: 2364–2373.



## MATERIAL SUPLEMENTARIO

### **$\alpha$ 2A- and $\alpha$ 2C-adrenoceptor expression and functionality in *postmortem* prefrontal cortex of schizophrenia subjects**

**Iria Brocos-Mosquera<sup>1,2</sup>, Ane M. Gabilondo<sup>1,2,3</sup>, Rebeca Diez-Alarcia<sup>1,2,3</sup>, Carolina Muguruza<sup>1,2</sup>, Amaia M. Erdozain<sup>1,2</sup>, J. Javier Meana<sup>1,2,3</sup>, Luis F. Callado<sup>1,2,3\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

<sup>3</sup>Biocruces Bizkaia Health Research Institute, Barakaldo, Bizkaia, Spain

**Tablas suplementarias 1-3**





**Supplementary table 1:** Demographic characteristics, psychiatric diagnosis and toxicological findings of individual subjects included in the study. *M: male; F: female; PMD: postmortem delay; CRF: cardiorespiratory failure.*

Diagnosis	Sex (M/F)	Age (years)	Cause of death	PMD (hours)	Storage time (months)	Antipsychotic drugs in blood
Schizophrenia	M	31	Suicide (jumping)	14	145	(-)
Control	M	32	Accident (hit by a car)	4	42	
Schizophrenia	M	48	Suicide (train)	20	141	(-)
Control	M	47	Natural (CRF)	17	162	
Schizophrenia	M	45	Suicide (jumping)	3	125	(-)
Control	M	48	Accident (traffic)	7	162	
Schizophrenia	F	37	Suicide (drug intoxication)	58	109	(-)
Control	F	36	Homicide	38	233	
Schizophrenia	M	46	Suicide (jumping)	22	100	(-)
Control	M	46	Natural (heart attack)	24	86	
Schizophrenia	F	37	Suicide (jumping)	26	68	(-)
Control	F	38	Accident (hit by a car)	22	65	
Schizophrenia	M	48	Suicide (jumping)	11	69	(-)
Control	M	49	Natural (CRF)	8	62	
Schizophrenia	M	35	Suicide (hanging)	5	71	(-)
Control	M	37	Accident (traffic)	6	254	
Schizophrenia	F	59	Natural (CRF)	9	76	(-)
Control	F	57	Accident (traffic)	4	114	
Schizophrenia	M	45	Suicide (jumping)	18	78	(-)
Control	M	47	Accidental (traffic)	15	63	
Schizophrenia	M	34	Natural (CRF)	15	81	(-)
Control	M	34	Accident (traffic)	17	40	
Schizophrenia	M	52	Suicide (jumping)	7	85	(-)
Control	M	51	Accident (traffic)	13	65	

Alteraciones del sistema noradrenérgico en los déficits cognitivos de la esquizofrenia

<b>Schizophrenia</b>	M	44	Natural (CRF)	7	150	Clotiapine Levomepromazine
<b>Control</b>	M	44	Accidental (hit by a car)	23	69	
<b>Schizophrenia</b>	F	30	Suicide (toxic ingestion)	28	133	Haloperidol
<b>Control</b>	F	30	Accident (traffic)	18	76	
<b>Schizophrenia</b>	M	35	Natural (CRF)	11	89	Clozapine
<b>Control</b>	M	36	Accident (work)	18	159	
<b>Schizophrenia</b>	F	60	Natural (peritonitis)	23	73	Clozapine Amisulpiride
<b>Control</b>	F	60	Natural (cerebral hemorrhage)	48	79	
<b>Schizophrenia</b>	M	56	Natural (CRF)	12	78	Olanzapine Clotiapine
<b>Control</b>	M	54	Accident (work)	16	69	
<b>Schizophrenia</b>	M	41	Homicide (knife)	17	44	Clozapine
<b>Control</b>	M	40	Accident (work)	18	158	
<b>Schizophrenia</b>	M	41	Suicide (knife)	11	45	Clotiapine
<b>Control</b>	M	41	Natural (heart attack)	14	80	
<b>Schizophrenia</b>	M	42	Suicide (toxic ingestion)	14	89	Risperidone
<b>Control</b>	M	43	Natural (CRF)	20	61	
<b>Schizophrenia</b>	M	36	Suicide (toxic ingestion)	8	110	Olanzapine
<b>Control</b>	M	36	Accident (crushed)	23	70	
<b>Schizophrenia</b>	F	28	Suicide (jumping)	22	125	Risperidone
<b>Control</b>	F	32	Accident (traffic)	19	140	
<b>Schizophrenia</b>	F	48	Suicide (jumping)	17	127	Olanzapine Clotiapine
<b>Control</b>	F	50	Natural (CRF)	11	86	
<b>Schizophrenia</b>	F	42	Suicide (toxic ingestion)	14	136	Clozapine Sulpiride
<b>Control</b>	F	41	Accident (crushed)	22	58	

**Supplementary table 2:** Antibodies and different incubation conditions used in Western Blot assays.

Primary antibodies						
Target	Decription	Comercial firm	Catalog #	Ab dilution in SPM	Ab dilution in PSD	Ab dilution in Pre
<b><math>\alpha</math>2A-AR</b>	Polyclonal goat-anti- $\alpha$ 2A-adrenoreceptor	Santa cruz biotechnology,inc	sc-1478	1:1000	1:1000	1:400
<b><math>\alpha</math>2C-AR</b>	Polyclonal Rabbit-anti- $\alpha$ 2C-adrenoreceptor	Elabscience	ENT0300	1:1000	1:1000	1:1000
<b><math>G\alpha_{i2}</math></b>	Polyclonal Rabbit anti- $G_{\alpha i2}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-7276		1:250	1:500
<b><math>G\alpha_{i3}</math></b>	Polyclonal Rabbit anti- $G_{\alpha i3}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-262		1:200	1:100
<b><math>G\alpha_0</math></b>	Monoclonal Mouse anti- $G_{\alpha 0}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-393874		1:200	1:500
<b><math>G\alpha_s</math></b>	Polyclonal Rabbit anti- $G_{\alpha s}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-383		1:200	1:500
<b><math>\beta</math>-actin</b>	Monoclonal Mouse-anti- $\beta$ -actina	Sigma-aldrich	A1978	1:500 000	1:500 000	1:50 000
<b><math>\beta</math>-actin</b>	Polyclonal Rabbit-anti- $\beta$ -actina	Abcam	ab8227		1:20 000	1:5000
Secondary antibodies						
Target	Decription	Comercial firm	Catalog #	Ab dilution		
<b>Goat</b>	Alexa Fluor 680 Donkey anti-goat	Invitrogen	A21084	1:4000		
<b>Mouse</b>	Alexa Fluor 680 Goat anti-mouse	Invitrogen	A21057	1:4000		
<b>Mouse</b>	DyLight 800 Donkey anti-mouse	Rockland	610-745-002	1:6000		
<b>Rabbit</b>	Alexa Fluor 680 Goat anti-rabbit	Invitrogen	A21076	1:4000		
<b>Rabbit</b>	DyLight 800 Donkey anti-rabbit	Rockland	611-745-127	1:6000		

**Supplementary table 3:** Antibodies for  $G\alpha$  protein subtypes and GDP concentrations used in SPA assays.

Primary antibodies					
Target	Decription	Comercial firm	Catalog #	Ab dilution	GDP concentration
<b><math>G\alpha_{i1}</math></b>	Monoclonal Mouse anti- $G_{\alpha i1}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-56536	1:20	100 $\mu$ M
<b><math>G\alpha_{i2}</math></b>	Polyclonal Rabbit anti- $G_{\alpha i2}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-7276	1:20	50 $\mu$ M
<b><math>G\alpha_{i3}</math></b>	Polyclonal Rabbit anti- $G_{\alpha i3}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-262	1:30	100 $\mu$ M
<b><math>G\alpha_0</math></b>	Monoclonal Mouse anti- $G_{\alpha 0}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-393874	1:40	50 $\mu$ M
<b><math>G\alpha_s</math></b>	Polyclonal Rabbit anti- $G_{\alpha s}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-383	1:20	100 $\mu$ M
<b><math>G\alpha_{q/11}</math></b>	Polyclonal Rabbit anti- $G_{\alpha q/11}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-392	1:20	50 $\mu$ M
<b><math>G\alpha_{12/13}</math></b>	Polyclonal Rabbit anti- $G_{\alpha 12/13}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-28588	1:20	100 $\mu$ M
<b><math>G\alpha_z</math></b>	Polyclonal Rabbit anti- $G_{\alpha z}$	Santa cruz biotechnology,inc	sc-388	1:20	100 $\mu$ M



## **ARTÍCULO 3**

### **Differential ADRA2A and ADRA2C gene expression and epigenetic regulation in schizophrenia. Effect of antipsychotic drug treatment**

Iria Brocos-Mosquera, Patricia Miranda-Azpiazu,  
Carolina Muguruza, Virginia Corzo, Benito Morentin,  
J. Javier Meana, Luis F. Callado and Guadalupe Rivero



### **ARTÍCULO 3**

Los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ -AR) participan en la regulación de la liberación de neurotransmisores y de la cognición. En esquizofrenia (SZ) existe una disfunción en la neurotransmisión y déficits cognitivos. La corteza prefrontal dorsolateral (CPFDL) integra las funciones cognitivas en humanos. Los subtipos  $\alpha_2$ -AR presentes en ella son los  $\alpha_{2A}$  y los  $\alpha_{2C}$ , cuyos genes son ADRA2A y ADRA2C. Algunos estudios han sugerido que los  $\alpha_2$ -AR podrían estar alterados en SZ y ser responsables de dichos síntomas cognitivos. El objetivo de este estudio fue determinar la posible existencia de alteraciones en la expresión génica o en las modificaciones epigenéticas de los promotores de los genes ADRA2A y ADRA2C en la CPFDL de sujetos con SZ y, observar si el tratamiento antipsicótico pudiera alterarlos. Se incluyeron 24 sujetos con SZ (12 con antipsicóticos en sangre en el momento de la muerte y 12 sujetos sin antipsicóticos en sangre) y 24 controles (sin patología psiquiátrica *antemortem*). Estos sujetos fueron emparejados por sexo, edad, intervalo *postmortem* y tiempo de almacenamiento. El ARNm se extrajo de la CPFDL y se sometió a una PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). También se realizó una RT-qPCR del ARNm extraído a ratas tratadas de forma aguda o crónica con los antipsicóticos haloperidol, clozapina y risperidona. Para determinar posibles alteraciones en las modificaciones epigenéticas en los sujetos con SZ, se extrajo ADN de la CPFDL, se inmunoprecipitó la cromatina con anticuerpos frente a cada una de las marcas epigenéticas estudiadas y después se realizó una RT-qPCR. La mayoría de las modificaciones epigenéticas estudiadas son permisivas (H3K4me3, AcH3, AcH3K9, AcH3K27, AcH4K5, AcH4K16), pero se incluyó también una represiva (H3K27me3). Los resultados obtenidos fueron un aumento en la expresión del ARNm del gen ADRA2A en sujetos con SZ y antipsicóticos en sangre, mientras que el ARNm de ADRA2C mostró un aumento de expresión en el grupo total de sujetos con SZ. El estudio del ARNm de ratas mostró un aumento del correspondiente al gen ADRA2C en los animales tratados con clozapina (crónico y agudo). En el promotor del gen ADRA2A en sujetos con SSZ, se vio un aumento en la marca represiva (H3K27me3) y en una de las marcas permisivas (H3K4me3). En los sujetos con antipsicóticos en sangre, se mantuvo el aumento de la marca represiva y se vio un aumento de una nueva marca permisiva (AcH4K16). En el promotor del gen ADRA2C también se vio un aumento de la marca represiva (H3K27me3) en los sujetos con SZ, y un aumento de las marcas permisivas AcH3K9 (también observada en sujetos sin antipsicóticos) y AcH4K5 (también visto en los sujetos con antipsicóticos). Estos resultados pueden sugerirnos que los genes ADRA2A y ADRA2C se regulan de manera diferente, tanto a nivel génico como epigenético, y que los antipsicóticos pueden interferir en dicha regulación.





## Differential ADRA2A and ADRA2C gene expression and epigenetic regulation in schizophrenia. Effect of antipsychotic drug treatment

Iria Brocos-Mosquera<sup>1,2</sup>, Patricia Miranda-Azpiazu<sup>1,2</sup>, Carolina Muguruza<sup>1,2</sup>, Virginia Corzo, Benito Morentin<sup>4</sup>, J. Javier Meana<sup>1,2,3</sup>, Luis F. Callado<sup>1,2,3\*</sup>, Guadalupe Rivero<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

<sup>3</sup>Biocruces Bizkaia Health Research Institute, Barakaldo, Bizkaia, Spain

<sup>4</sup>Section of Forensic Pathology, Basque Institute of Legal Medicine, Bilbao, Spain

\*Corresponding author:

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Nursery, University of the Basque Country (UPV/EHU). Barrio

Sarriena s/n 48940 Leioa, Bizkaia. Spain

Email: guadalupe.rivero@ehu.eus; telephone: (+34) 94 6013493; fax: (+34) 94 6013220.

### ABSTRACT

Postsynaptic  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor density is enhanced in the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) of antipsychotic-treated schizophrenia subjects. This alteration might be due to transcriptional activation, and could be regulated by epigenetic mechanisms such as histone posttranslational modifications (PTMs). The aim of this study was to evaluate  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes codifying genes ADRA2A and ADRA2C expression, and permissive and repressive histone PTMs at gene promoter regions in DLPFC of subjects with schizophrenia and matched controls (n=24). We studied the effect of antipsychotic (AP) treatment in AP-free (n=12) and AP-treated (n=12) subgroups of schizophrenia subjects and in rats acutely and chronically treated with antipsychotics. ADRA2A mRNA expression was selectively upregulated in AP-treated schizophrenia subjects (+93%) whereas ADRA2C mRNA expression was upregulated in all schizophrenia subjects (+53%) regardless of antipsychotic treatment. Acute and chronic clozapine treatment in rats did not alter *Adra2a* mRNA expression but increased brain cortex *Adra2c* mRNA expression. Both ADRA2A and ADRA2C promoter regions showed epigenetic regulation by histone methylation and acetylation. The regulation of ADRA2A expression in AP-treated schizophrenia subjects might be related to observed bivalent chromatin at ADRA2A promoter region in schizophrenia (depicted by increased permissive H3K4me3 and repressive H3K27me3) and could be triggered by the enhanced H4K16ac at ADRA2A promoter. In conclusion, epigenetic predisposition differentially modulated ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in DLPFC of schizophrenia subjects.

### Keywords

$\alpha_{2A}$ -Adrenoceptors,  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors, ADRA2A, ADRA2C, human brain, schizophrenia, gene expression, epigenetic.

### INTRODUCTION

Schizophrenia is a chronic, disabling and early-onset disease affecting around 1% of the population worldwide<sup>1</sup>. The core features of schizophrenia are positive symptoms (i.e. hallucinations and delusions), negative symptoms (i.e. social withdrawal and lack of motivation) and cognitive deficits (i.e. disturbances in selective attention, working memory and learning). Several hypotheses have proposed a role for noradrenergic system and its  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the

pathophysiology and treatment of schizophrenia<sup>2</sup>. Among the three  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes in DLPFC (mainly  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor subtype) could induce a critical regulation of cognitive processes as working memory<sup>9</sup>. In this line, we recently reported the upregulation of postsynaptic  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor subtype in schizophrenia subjects (Brocos-Mosquera et al, 2021). This finding was specific for those schizophrenia subjects that were under antipsychotic treatment.

The aetiology of schizophrenia is likely to be multifactorial, with multiple small-effect and fewer large-effect susceptibility genes<sup>10,11</sup>.  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2C-adrenoceptors are codified by ADRA2A and ADRA2C genes, which are located on chromosomes C10 and C4, respectively. Candidate gene studies have not found any association between polymorphisms at ADRA2A/C genes and schizophrenia<sup>12-15</sup>. Environmental factors have also been suggested to contribute to the disorder's aetiology through epigenetic processes<sup>16,17</sup>. Epigenetics refers to the combination of mechanisms that confer short- and long-term changes in gene expression without altering the DNA code itself and include several interrelated mechanisms such as chromatin remodeling, histone post-translational modifications (PTM), DNA methylation and expression of noncoding RNAs. Several evidence suggest that histone PTMs are associated with the development of schizophrenia. These include changes in the expression of several histone modifying enzymes, such as increased expression of histone methyltransferases<sup>18-20</sup>, HDAC1<sup>21,22</sup> and reduced HDAC2<sup>23,24</sup> expression in prefrontal cortex of schizophrenia subjects. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-Seq studies in human brain have found an overrepresentation of open chromatin-associated modifications (histone H3 lysine 4 trimethylation, H3K4me3 and histone H3 lysine 27 acetylation, H3K27ac) in schizophrenia related genes, this finding being specific for neuronal cells<sup>25</sup>. Actually, studies in brain cortex of schizophrenia subjects have identified altered histone H3 acetylation and methylation at promoter regions of certain genes<sup>26-28</sup>. More recently, ChIP-seq evaluation of cell-type H3K4me3

in prefrontal cortex of schizophrenia subjects has revealed individual alterations in neurons<sup>29</sup>. These findings, along with the observation that therapeutic doses of the mood stabilizer valproate act as a HDAC inhibitor in schizophrenia cases<sup>30,31</sup> suggest the importance of histone PTMs in schizophrenia.

The aim of the present study was to assess the mRNA expression of ADRA2A and ADRA2C in postmortem dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) of schizophrenia subjects. Due to the relevance of epigenetics in schizophrenia and given the possibility that histone PTMs at promoter regions could regulate ADRA2A and ADRA2C mRNA expression, we also evaluated PTMs of histone H3 (H3K4me3, H3K27me3, H3ac, H3K9ac, H3K27ac) and H4 (H4K5ac and H4K16ac) at promoter regions of both ADRA2A and ADRA2C genes. In addition, we evaluated the possible modulation of mRNA expression and epigenetic mechanisms by antipsychotic treatment by comparing schizophrenia subjects according to blood presence or not of antipsychotic drugs at the time of death.

## MATERIAL & METHODS

### *Postmortem* human brain samples

Human brain samples were obtained at autopsies in the Basque Institute of Legal Medicine, Bilbao, Spain. Samples from the DLPFC (Brodmann's area 9, BA 9) were dissected at the time of autopsy and immediately stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until assay. The study was developed in compliance with legal policy and ethical review boards for postmortem brain studies. A toxicological screening on blood (detection of antidepressants, antipsychotics,

**Table 1. Sex, age, PMD and storage time of subjects included in the study. Quantitative variables are expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean).**

	ALL		AP-free		AP-treated	
	24 C	24 S	12 C	12 S	12 C	12 S
<b>Sex (M/F)</b>	16/8	16/8	9/3	9/3	7/5	7/5
<b>Age (years)</b>	43 $\pm$ 2	43 $\pm$ 2	44 $\pm$ 2	43 $\pm$ 2	42 $\pm$ 3	42 $\pm$ 3
<b>PMD (hours)</b>	18 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2	15 $\pm$ 3	17 $\pm$ 4	21 $\pm$ 3	15 $\pm$ 2
<b>Storage time (months)</b>	102 $\pm$ 12	98 $\pm$ 6	112 $\pm$ 21	96 $\pm$ 8	92 $\pm$ 11	100 $\pm$ 10

M, male; F, female; C, control subjects; S, schizophrenia subjects; AP-free, antipsychotic-free; AP-treated, antipsychotic-treated.

psychotropic drugs and ethanol) was performed at the National Institute of Toxicology, Madrid, Spain using a variety of standard procedures including radioimmunoassay, enzymatic immunoassay, high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.

Subjects included in the study were selected after retrospective searching for previous medical diagnosis using examiner's information and records of hospitals and mental health centres. Among the 48 subjects included in the study, 24 subjects had an *antemortem* diagnosis of schizophrenia (S) based on DSM-IV and ICD-10 criteria. Control subjects without evidence of any neurological, psychiatric or substance abuse disorder were matched to schizophrenia subjects for sex, age, postmortem delay (time interval between death and autopsy, PMD) and storage time. All of these parameters were not statistically different between groups, as shown in Table 1 ( $p > 0.05$ , two-tailed *t*-test). Schizophrenia subjects were divided in 12 antipsychotic-free (AP-free) and 12 antipsychotic-treated (AP-treated) subjects according to the presence or absence of antipsychotics in blood at the time of death. 17 of the 24 schizophrenia subjects had died by suicide, with a similar distribution in AP-free and -treated subgroups. Samples from matched schizophrenia and control subjects were always processed in parallel. Out of the 24 matched pairs of schizophrenia and control subjects, 5 pairs had to be excluded from the ADRA2A and ADRA2C mRNA expression study due to experimental reasons (low RIN value and/or absence of amplification). Full description of demographic characteristics of all subjects in mRNA and epigenetics study is shown in respective supplementary tables 1 and 2. A summary of demographic characteristics of those schizophrenia subjects that were suicide victims and matched controls is shown in supplementary table 3. A cohort of suicide victims with major depression was used for hypothesis validation (see supplementary table 4 for demographic characteristics).

### Animals and treatments

Male Sprague-Dawley rats (220–320 g) were housed on a 12 h light/dark cycle at room temperature (22°C) and 60% humidity with food and water available *ad libitum*. Animals were obtained and kept at the Animal Facility (SGIker) of the University of the Basque Country. Animal care and experimental protocols were in accordance with European Union regulations and were approved by the UPV/EHU institutional Ethics Committee for animal welfare (CEEA). Acutely treated rats were injected *i.p.* with risperidone (1 mg/kg,  $n=5$ ), clozapine (10 mg/kg,  $n=4$ ; both from Tocris, Bristol, UK) or haloperidol (1 mg/kg,  $n=4$ ; Sigma Aldrich, MO, USA) and sacrificed 3 hours after the injection. Chronically treated rats were injected *i.p.*, every 12 h, during 21 days, with saline (1 ml/kg,  $n=11$ ), risperidone (0.5 mg/kg,  $n=6$ ), clozapine (5 mg/kg,  $n=6$ ) or haloperidol (0.5 mg/kg,  $n=6$ ). Animals were sacrificed 48 h after the last injection of clozapine and 72 h after the last injection of haloperidol or saline. Risperidone, clozapine and haloperidol were selected as representative antipsychotic drugs with atypical and typical profile. Brains were removed and the cortex was dissected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assays.

### mRNA expression and cDNA synthesis

Total RNA extraction was performed using commercial RiboPure™ kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions. RNA concentration and quality (260/280 and 260/230 absorbance ratios) were measured in a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). RNA integrity numbers (RIN) were also assessed for RNA quality in the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) using Agilent RNA 6000 Nano kit and RNA Nano chips following the manufacturer's instructions (see supplementary table 1). Extracted RNA from human samples was subjected to DNase digestion using the Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Thermo Fisher). Single-stranded cDNA was synthesized from 1  $\mu\text{g}$  of total RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher) following the manufacturer's instructions.

### Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Human postmortem brain (120 mg) was homogenized in 810  $\mu$ l of douncing buffer (4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM Tris-HCl; pH 7.5) and then incubated with 1 U/ml of micrococcal nuclease (MNase; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min at 37°C. The MNase activity was stopped by adding 10 mM EDTA. The sample was diluted by adding nine-fold volume excess of hypotonic lysis buffer (0.1 mM benzamidine, 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 1.5 mM 1,4-dithio-dl-threitol (DTT), and 0.2 mM EDTA; pH 8.0) and then incubated on ice for 1 h. The sample was centrifuged at 1000xg (Eppendorf 5810R centrifuge; Eppendorf, Hamburg, Germany) for 10 min at 4°C to remove insoluble material. Soluble chromatin was diluted adding ten times concentrated incubation buffer (50 mM EDTA, 500 mM NaCl, and 200 mM Tris-HCl; pH 7.5). 60  $\mu$ l of diluted chromatin (input sample) were removed and saved at 4°C until elution. Primary antibodies at different concentrations (see supplementary table 5) and 20  $\mu$ l of fully suspended protein A magnetic beads (Millipore, Burlington, MA, USA) were added to aliquots of diluted chromatin and incubated overnight at 4°C with rotation. Protein A magnetic beads were pelleted with the magnetic separator and supernatant removed completely. Then, the protein A bead-antibody/chromatin complexes were washed by resuspending the pelleted beads in 0.5 ml each of the following cold buffers in this order: low salt (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100; pH=8.1); high salt (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100; pH=8.1); and LiCl immune complex wash buffer (250 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.01% IGEPAL CA630, 0.01% deoxycholic acid; pH=8.1) and TE buffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH=8.1). Once resuspended in each washing buffer, beads were incubated for 20 min at 4°C with rotation, followed by magnetic clearance and careful removal of supernatant fraction prior to the addition of next washing buffer. Elution of protein/DNA complexes to free DNA was carried out by incubation of

immune complexes and input samples in ChIP elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) with proteinase K (100  $\mu$ g/ml) at 62°C for 2 h with shaking followed by an incubation at 95°C for 10 min. Magnetic beads were separated of the complex antibody/chromatin and DNA in the supernatant of all samples (input included) was purified with QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Final DNA volume was 1:4 diluted in molecular grade water.

### Quantitative Real-Time PCR

Quantitative real time PCR (qPCR) was performed on cDNA synthesized from isolated mRNA and on genomic DNA obtained from ChIP assays. All samples were run in triplicates. qPCR reactions were carried out using Power or Fast SYBR Green Master Mix (for respective cDNA or genomic DNA amplification; Thermo Fisher, Waltham, MA) on a StepOne™ system (Thermo Fisher) following manufacturer's instructions. The final volume for each reaction was 10  $\mu$ l with either 20 ng of cDNA or 4  $\mu$ l of genomic DNA (obtained from ChIP experiments) and corresponding gene specific primers (see supplementary table 6 for primer sequences and final concentrations). Dissociation curve analyses were carried out at the end of each run for PCR product verification. mRNA expression of housekeeping genes was performed by pre-designed TaqMan® assays (supplementary table 7). A negative water control was included in each run. See supplementary data for more details (see supplementary figures 1-3 for detailed characterization of qPCR assays).

### Data analysis and statistical procedures

The mRNA expression of target genes ADRA2A and ADRA2C was corrected with that of housekeeping genes GAPDH and RSP13, and with a reference sample (pool of control samples) using  $\Delta\Delta$ Ct method:  $\Delta\Delta$ Ct = (Ct (target gene)<sub>sample</sub> - Ct (reference gene)<sub>sample</sub>) - (Ct (target gene)<sub>reference sample</sub> - Ct (reference gene)<sub>reference sample</sub>). The relative amount of mRNA was calculated as  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. In the case of animal data, mRNA expression of *adra2a* and *adra2c* genes was

corrected with that of *gapdh* and *rsp29*. For ChIP data, fold changes relative to 6% of input DNA were determined using the comparative Ct method, where  $\Delta Ct = Ct(\text{target gene})_{\text{immunoprecipitated DNA sample}} - Ct(\text{target gene})_{2\% \text{ input DNA}}$ . The relative amount of immunoprecipitated DNA was calculated as  $2^{-\Delta Ct}$ . Relative amounts of both mRNA and DNA were subjected to Grubbs' test to detect any possible outlier.

The analyses were performed with GraphPad Prism 8<sup>®</sup> (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), SPSS 26.0 (Chicago, IL, USA) and InVivoStat (Clark et al., 2012) programs, and results expressed as means  $\pm$  SEM. Correlations between sex, age, PMD, storage time, RIN and experimental data were determined using multiple regression analysis. When significant, the relationship between numerical variables and experimental data was further studied by simple linear regression analysis. Statistical analysis for comparison of the means between control and schizophrenia subjects, and between males and females was performed by two-tailed paired and unpaired Student's t-test, respectively. *P* values < 0.05 were considered as being statistically significant.

## RESULTS

### Demographic and methodological variables contributing to ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in human DLPFC

First, multiple regression analysis of data from control subjects was performed in order to study the contribution of nominal

predictor variables (sex) and continuous predictor variables (age, PMD, storage time and RIN) to corrected ADRA2A and ADRA2C mRNA expression. A significant model emerged,  $F(1,17)=9.568$ ,  $p=0.007$ . The analysis revealed that corrected ADRA2A mRNA expression was significantly influenced by RIN of the samples ( $\beta=-0.6$ ,  $p=0.007$ ), regardless of sex and age of the subjects and PMD and storage time of the samples. Linear regression analysis showed a negative correlation between RIN and corrected ADRA2A mRNA expression ( $r=-0.6$ ,  $p=0.007$ ; supplementary fig. 4). By contrast, corrected ADRA2C mRNA expression was not influenced by any of the variables. Therefore, when significant differences in ADRA2A mRNA expression between groups were observed, subsequent ANCOVA analyses with RIN as covariate were performed.

### ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in postmortem human DLPFC of subjects with schizophrenia and matched controls

ADRA2A mRNA expression in schizophrenia subjects was not statistically different than that in matched controls ( $\Delta=+25\%$ ,  $n=19$ ,  $p=0.25$ , Fig. 1A). When the schizophrenia group was divided by presence or absence of antipsychotics, a significant increase in ADRA2A mRNA expression was observed in AP-treated subjects ( $\Delta=+93\%$  vs matched controls,  $n=9$ ,  $p=0.042$ , Fig. 1A). As previously mentioned, RIN of the samples negatively influenced corrected ADRA2A

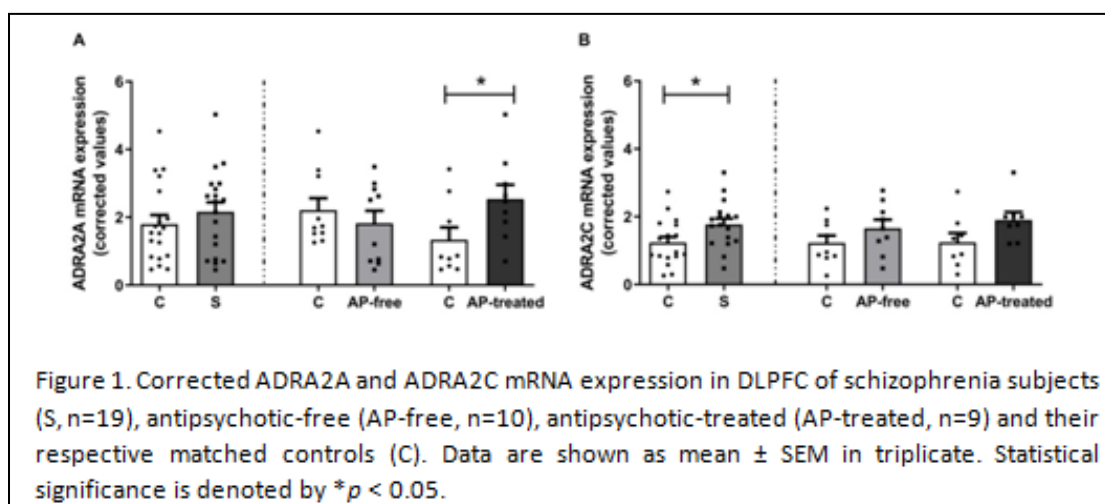


Figure 1. Corrected ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in DLPFC of schizophrenia subjects (S,  $n=19$ ), antipsychotic-free (AP-free,  $n=10$ ), antipsychotic-treated (AP-treated,  $n=9$ ) and their respective matched controls (C). Data are shown as mean  $\pm$  SEM in triplicate. Statistical significance is denoted by  $*p < 0.05$ .

mRNA expression. Although RIN of the samples was not significantly different between AP-treated schizophrenia subjects and matched controls (see supplementary table 1), ANCOVA analysis with RIN as covariate was performed. ANCOVA analysis estimated that ADRA2A mRNA expression in AP-treated schizophrenia subjects was 94% higher than in matched controls but the difference did not reach statistical significance ( $p=0.065$ ).

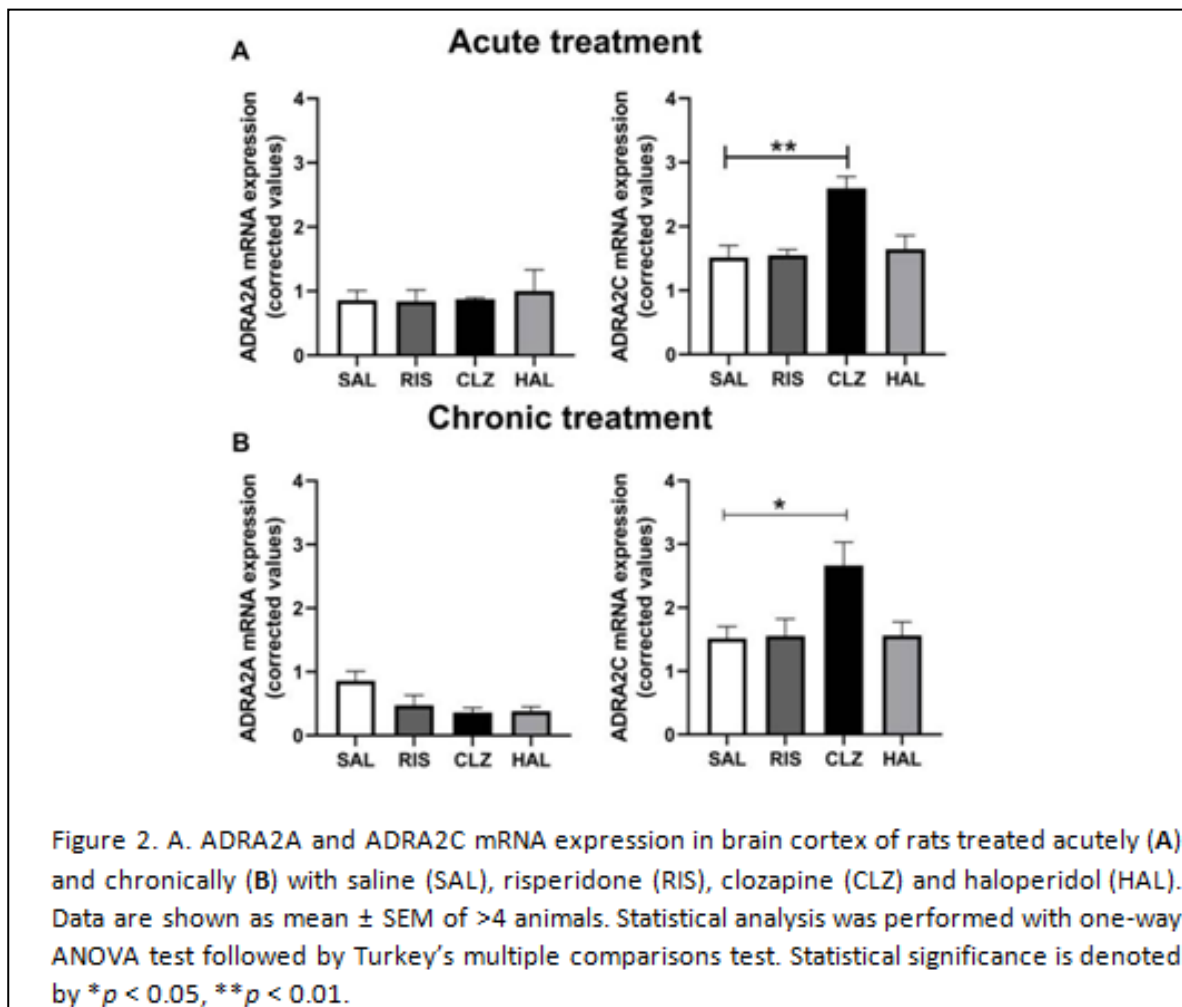
In schizophrenia subjects ADRA2C mRNA expression was significantly higher than in matched controls ( $\Delta=+53\%$ ,  $n=17$ ,  $p=0.016$ , Fig. 1B). Analysis of schizophrenia subjects according to the presence or absence of antipsychotic treatment, revealed that ADRA2C mRNA expression was non-significantly enhanced over that in controls in both AP-free ( $\Delta=+53\%$ ,  $n=9$ ,  $p=0.136$ ) and AP-treated schizophrenia subjects ( $\Delta=+54\%$ ,  $n=8$ ,  $p=0.088$ ).

ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in schizophrenia subjects could also be

influenced by the fact that most schizophrenia subjects in the study were suicide victims (13 of 19). In order to evaluate this possibility, we analyzed ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in suicide victims with an antemortem diagnosis of major depression ( $n=12$ ). Compared to matched controls, neither ADRA2A nor ADRA2C mRNA expression were significantly altered (supplementary fig. 5).

**Effect of antipsychotic treatment on Adra2a and Adra2c mRNA expression in rat brain cortex**

Taking into account the specific ADRA2A mRNA increase observed in AP-treated schizophrenia subjects, we aimed to evaluate the effect of acute and chronic antipsychotic treatment in rat brain cortex *Adra2a* and *Adra2c* mRNA expression. As observed in figure 2, *Adra2a* mRNA expression was not modulated by neither acute nor chronic

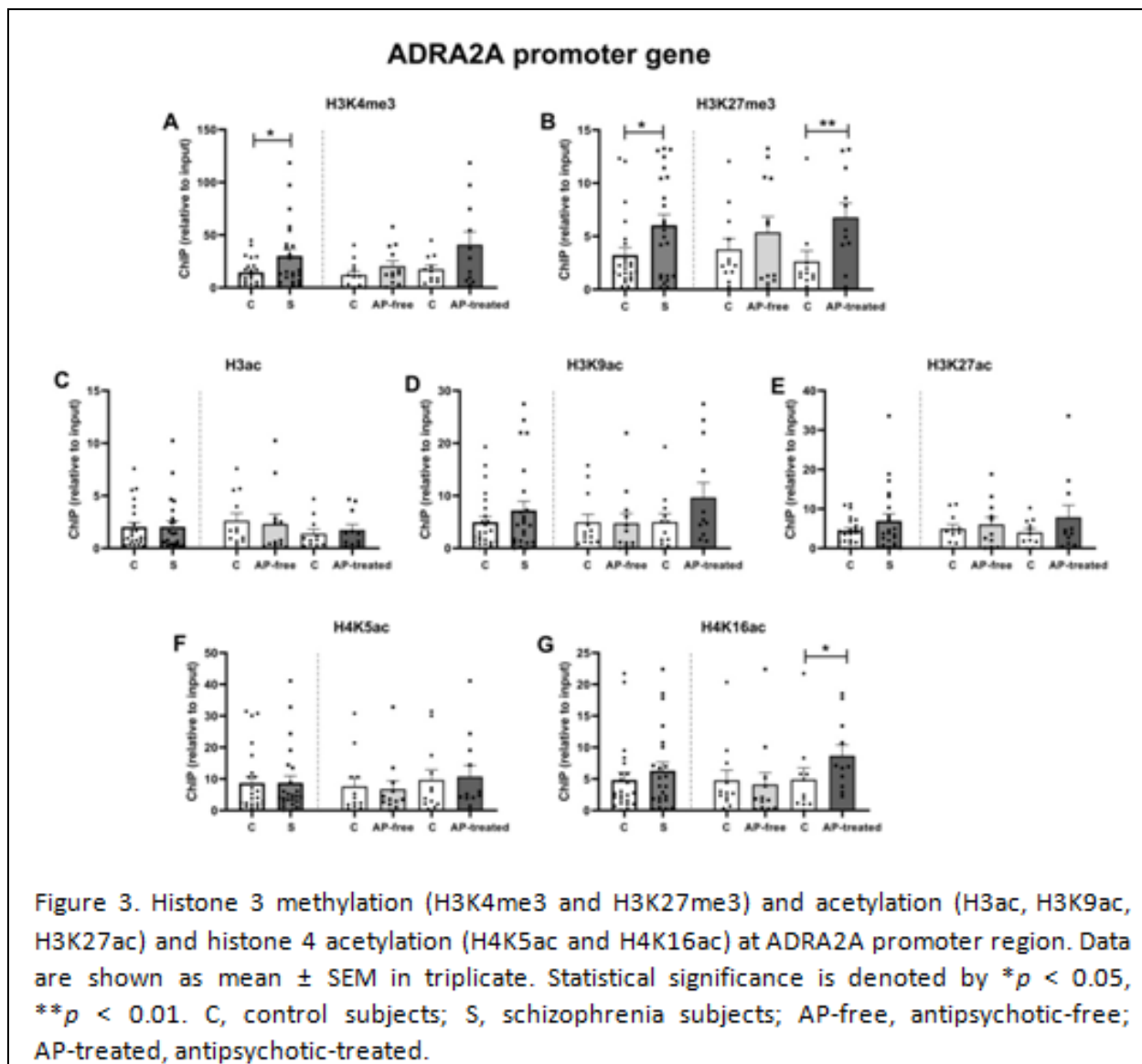


treatment with atypical (risperidone and clozapine) or typical antipsychotics (haloperidol). However, *Adra2c* mRNA expression was significantly increased over that in saline-treated rats in both acute ( $\Delta=+71\%$  vs saline,  $p<0.05$ , Fig. 2A) and chronically clozapine-treated rats ( $\Delta=+75\%$  vs saline,  $p<0.01$ , Fig. 2B).

### Demographic and methodological variables contributing to histone PTMs at ADRA2A and ADRA2C promoters in postmortem human DLPFC

The effect of demographic and methodological variables on histone PTMs at ADRA2A and ADRA2C promoters was individually analyzed. Significant models emerged for ADRA2A promoter-associated H3ac [F(1,17)=5.21,  $p=0.036$ ], H4K5ac

[F(1,17)=5.194,  $p=0.036$ ] and H3K27me3 [F(1,17)=5.874,  $p=0.027$ ]. H3ac and H3K27me3 at ADRA2A promoter were significantly influenced by sex of the subjects ( $\beta=0.484$ ,  $p=0.036$  and  $\beta=0.507$ ,  $p=0.027$ , respectively), being higher in females than in males ( $\Delta=+170\%$  and  $\Delta=+113\%$ , respectively). H4K5ac at ADRA2A promoter gene was positively influenced by storage time of samples ( $\beta=0.484$ ,  $p=0.036$ ). In the case of histone PTMs at ADRA2C promoter, significant models emerged for H3K27ac [F(1,17)=5.318,  $p=0.034$ ], H4K16ac [F(1,17)=5.561,  $p=0.031$ ] and H3K27me3 [F(1,17)=8.846,  $p=0.009$ ]. At ADRA2C promoter H3K27ac was significantly influenced by PMD of samples ( $\beta=0.488$ ,  $p=0.034$ ) whereas H4K16ac was influenced by storage time of samples ( $\beta=0.496$ ,



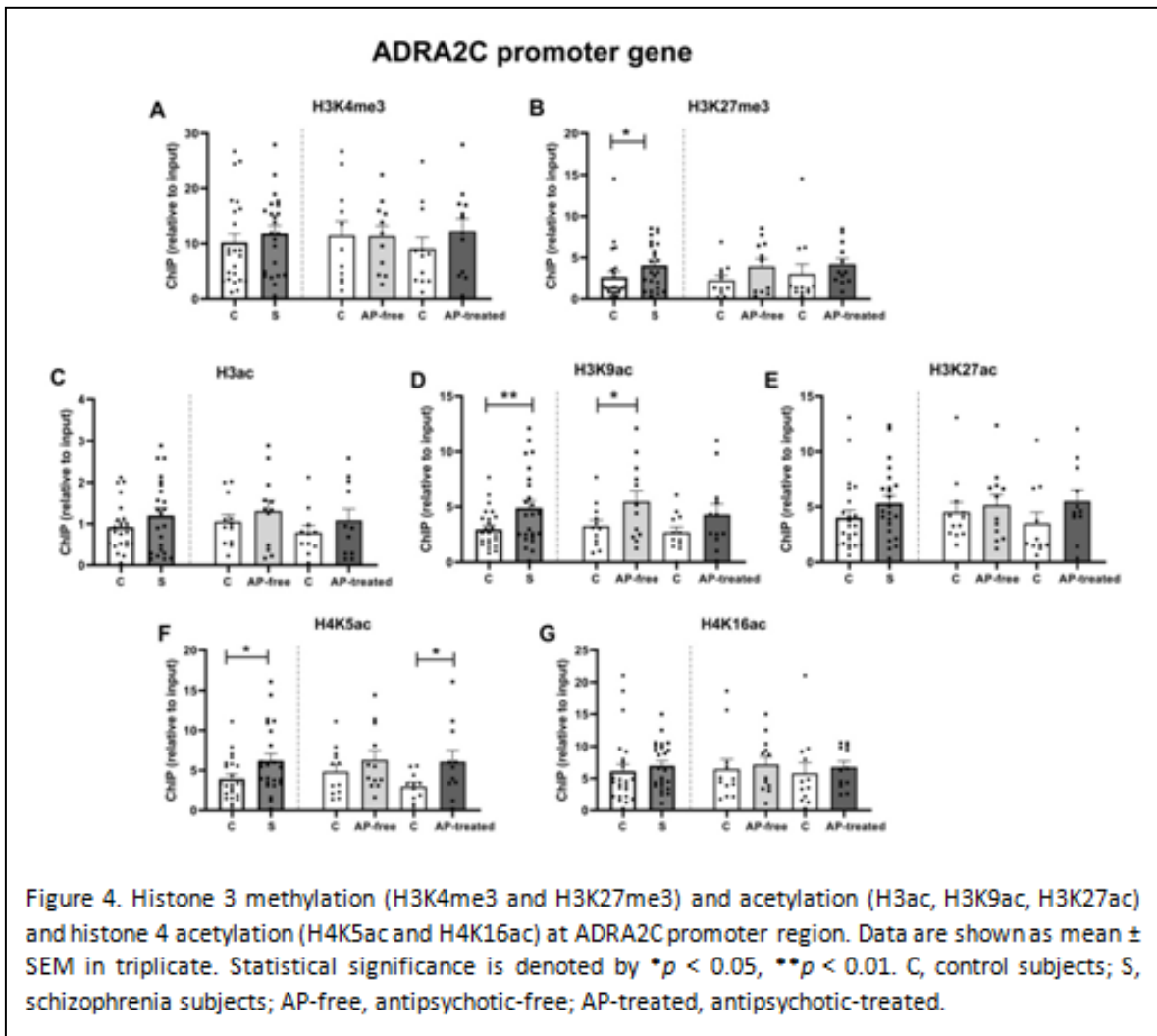
p=0.031). H3K27me3 at ADRA2C promoter gene was influenced by sex of the subjects being higher in females than in males ( $\beta=0.585$ , p=0.009,  $\Delta=+138\%$ ). Whenever statistically significant, relationship between demographic and methodological variables and experimental data are shown in supplementary figure 4.

**Histone PTMs at ADRA2A and ADRA2C promoters in postmortem human DLPFC of subjects with schizophrenia and matched controls**

Altered ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in schizophrenia subjects might be epigenetically regulated. In order to evaluate this, histone modification signature comprised of histone methylations: H3K4me3 and repressive H3K27me3 and histone acetylations: H3ac, H3K9ac, H3K27ac, H4K5ac and H4K16ac was evaluated at both ADRA2A and ADRA2C

promoter regions.

With regards to ADRA2A promoter region, in schizophrenia subjects, both permissive H3K4me3 ( $\Delta=+105\%$ , p=0.021, Fig. 3A) and repressive H3K27me3 ( $\Delta=+86\%$ , p=0.01, Fig. 3B) were increased compared to matched controls. Subgrouping of schizophrenia subjects depending on the absence or presence of antipsychotics in blood, revealed that H3K27me3 at ADRA2A promoter was significantly increased in AP-treated schizophrenia subjects ( $\Delta=+59\%$  vs matched controls, p=0.006, Fig. 3B). Although non-significantly, H3K4me3 at ADRA2A promoter was also increased in AP-treated schizophrenia subjects ( $\Delta=+135\%$  vs matched controls, p=0.072, Fig. 3A). The separate analysis of AP-free and AP-treated schizophrenia subjects also revealed the selective increase in H4K16ac in AP-treated schizophrenia subjects ( $\Delta=+82\%$  increase, p=0.029, Fig. 3G). The rest of the studied histone PTMs were not





significantly different between the compared groups.

The study of histone PTMs at ADRA2C promoter region in schizophrenia subjects showed a significant increase in H3K27me3 ( $\Delta=+52\%$ ,  $p=0.046$ , Fig. 4B), H3K9ac ( $\Delta=+63\%$ ,  $p=0.007$ , Fig. 4D) and H4K5ac ( $\Delta=+55\%$ ,  $p=0.027$ , Fig. 4F). Further analysis of the results by separation of AP-free and AP-treated subjects showed that with respect to matched controls, H3K9ac was increased in AP-free subjects ( $\Delta=+67\%$ ,  $p=0.043$ , Fig. 4D), whereas H4K5ac was increased in AP-treated subjects ( $\Delta=+103\%$ ,  $p=0.048$ , Fig. 4F). The rest of the studied histone PTMs were not significantly different between the compared groups. In addition, none of the studied histone PTMs was found to be different between schizophrenia and control subjects at promoter region of housekeeping gene GAPDH (supplementary fig. 6).

## DISCUSSION

In the present study, we observed a differential ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in brain samples of subjects with schizophrenia. ADRA2A mRNA expression was selectively upregulated in AP-treated subjects, whereas ADRA2C mRNA expression was enhanced in schizophrenia subjects regardless of the presence or absence of antipsychotic treatment.

The selective up-regulation of ADRA2A mRNA expression in those schizophrenia subjects that showed detectable antipsychotic blood levels is in line with previous reports indicating a higher  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor protein expression in synaptosomal and postsynaptic membranes of the same AP-treated subjects<sup>32</sup>. In the human prefrontal cortex  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor represents the main  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtype<sup>33-35</sup>. Electron microscopy studies have shown  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors to be prevalent in neurons, showing presynaptic and postsynaptic location<sup>34</sup>. Subcellular fractionation of human prefrontal cortex followed by immunolabeling showed the predominant postsynaptic location of  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors (95%) while only the remaining 5% is in the presynapse<sup>8</sup>.  $\alpha_{2A}$ -

adrenoceptor mRNA and protein expression has also been observed in glial cells of murine and primate brain cortex, mainly in astrocytes<sup>36-38</sup>. In this sense, due to mRNA predominant somatic location, and although certain ADRA2A mRNA expression in glial cells cannot be ruled out, we believe that most of the mRNA expression detected in our study may belong to postsynaptic neuronal mRNA. Moreover, present observations suggest that ADRA2A mRNA upregulation in AP-treated schizophrenia subjects might be the driving force in the upregulated postsynaptic  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor protein expression observed in the same subjects. Postsynaptic neuronal expression of  $\alpha_2$ -adrenoceptors has been demonstrated on GABAergic interneurons<sup>39</sup> and on glutamatergic pyramidal neurons<sup>40</sup> of rat and rhesus monkey frontal cortex. Yet, the relevance of the enhanced mRNA and protein expression of  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors in AP-treated schizophrenia subjects is unknown. In DLPFC, postsynaptically located  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors play a relevant role in cognitive processes. From its postsynaptic location,  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors control noradrenergic tone on layer III pyramidal cells and upon stimulation by selective agonists,  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors enhance DLPFC-dependent working memory<sup>41,42</sup>. Whether enhanced  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors in DLPFC of AP-treated schizophrenia subjects contributed to improve cognitive outcomes in these subjects is unknown. In any case, most of the schizophrenia subjects included in the study committed suicide and so, they could be considered to be non-responders to antipsychotic treatment.

By contrast, ADRA2C mRNA expression was upregulated in postmortem brain of subjects with schizophrenia regardless of the presence of antipsychotics in blood. Evaluation of  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor protein expression in the same subjects revealed that  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor density in synaptosomal subcellular fractions was unaltered despite the presence or not of antipsychotic treatment<sup>32</sup>. However, mRNA and protein expression do not necessarily need to be regulated in parallel<sup>43</sup> and the increase in ADRA2C mRNA expression in schizophrenia deserves further

investigation. These results may suggest that ADRA2C upregulation would be a feature of schizophrenia pathology as opposed to  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor mRNA and protein expression selective upregulation in AP-treated schizophrenia subjects but other factors should also be considered. In most of the AP-treated schizophrenia subjects of this study, blood toxicology detected the presence of atypical antipsychotic drugs. In this sense, atypical antipsychotic drugs such as clozapine and risperidone show  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonistic properties with a preference for  $\alpha_{2C}$ - over  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor<sup>5,44,45</sup>. In order to study if  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonism by antipsychotic drugs could induce ADRA2A and ADRA2C mRNA expression, we conducted experiments in acutely and chronically AP-treated rat brain cortex. Our results showed that *adra2c* mRNA expression was upregulated in rats treated with either acute or chronic clozapine whereas *adra2a* mRNA expression was unaltered. The selective upregulation of *adra2c* mRNA expression triggered by acute and chronic clozapine but not by risperidone might relate to  $\alpha_2$ -adrenoceptor occupancy. In rodents, systemic administration of 5 mg/kg of clozapine occupies 65% of  $\alpha_{2A}$ - and 95% of  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors in brain<sup>46</sup>, whereas 0.5 mg/kg risperidone only occupies 12% of  $\alpha_{2A}$ - and 19% of  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors<sup>47</sup>. Thus, increased ADRA2C mRNA expression in schizophrenia might be related to  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor antagonism by some atypical antipsychotic drugs. However, ADRA2C mRNA expression was non-significantly enhanced over control values in both AP-free and AP-treated schizophrenia subjects. It is worth mentioning that toxicological analysis in blood samples of AP-free schizophrenia subjects indicates that antipsychotics had not been present in an antemortem period of days but it does not discard antipsychotic usage in the past history of the subjects. Thus, modulation of ADRA2C mRNA expression by past antipsychotic drug usage in AP-free subjects might also be considered. On the other hand, the results in chronically-treated rats failed to explain the upregulation of ADRA2A mRNA expression in antipsychotic-treated schizophrenia subjects and suggest that antipsychotic-induced modulation of

ADRA2A mRNA expression might be mediated by specific mechanisms in brains of subjects with schizophrenia.

As previously mentioned, another important aspect is that 13 of 19 schizophrenia subjects in the mRNA study had died by suicide, with a similar distribution in AP-free and -treated subgroups.  $\alpha_2$ -adrenoceptors have been reported to be increased in postmortem brain of suicide victims<sup>48</sup> with vast literature reporting upregulated  $\alpha_2$ -adrenoceptors in brains of suicide victims with an antemortem diagnosis of major depression (see <sup>49-52</sup> and references within). However, information on  $\alpha_{2A}$  and  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor subtype delineation is still lacking. Thus, we aimed to evaluate if enhanced ADRA2C mRNA expression in these schizophrenic subjects could be related to suicide completion by using a cohort of 12 depressed suicide victims. The results showed that neither ADRA2A nor ADRA2C mRNA were altered in depressed suicide victims as opposed to results in the schizophrenia cohort. Therefore, modulation of ADRA2C mRNA expression due to suicidal completion does not seem plausible.

Epigenetics may be particularly relevant for understanding schizophrenia<sup>17</sup>. Besides literature on DNA methylation studies in schizophrenia and the growing number of studies on miRNA<sup>53</sup>, several lines of evidence suggest that histone PTMs play a role in the etiology and pathophysiology of schizophrenia<sup>27-30</sup>. Thus, the association of several histone H3 and histone H4 PTMs at ADRA2A and ADRA2C promoter regions was studied. With this purpose, we conducted ChIP-PCR studies in DLPFC of the same subjects with schizophrenia. The results show specific histone PTMs at ADRA2A and ADRA2C promoters in schizophrenia with selective mechanisms in AP-free and AP-treated subjects. To our knowledge, this is the first time that histone PTMs at ADRA2A and ADRA2C are reported.

Regarding ADRA2A epigenetic regulation, both ADRA2A promoter associated H3K4me3 and H3K27me3 were increased in subjects with schizophrenia. The relevance of histone methylation processes was already put forward in the GWAS study from

the Psychiatric Genomics Consortium<sup>54</sup>, whereby histone methylation showed the strongest association with psychiatric disorders. Moreover, H3K27 methyltransferase EZH1 expression has been reported to be increased in PFC of schizophrenia subjects<sup>18</sup>. With our methodology, we cannot assure that regulation of ADRA2A promoter by H3K4me3 and H3K27me3 occur at the same cell. Actually, as earlier discussed, ADRA2A mRNA expression in brain cortex can also be ascribed to GABAergic interneurons, glutamatergic pyramidal neurons and astrocytes<sup>36,38,40</sup>. However, levels of H3K4me3 and H3K27me3 at ADRA2A promoter showed a positive and significant correlation in subjects with schizophrenia (supplementary fig. 7) suggesting that these two marks could be concomitantly modulated in schizophrenia. This parallel increase in H3K4me3 and H3K27me3 marks might be conflicting in the view of their permissive and repressive transcriptional influence. Nevertheless, the increase in H3K4me3 and H3K27me3 at ADRA2A promoter region can be explained in the light of bivalent chromatin. Bivalent chromatin refers to those gene promoter regions that show both H3K4me3 and H3K27me3 and thus have characteristics of both active and repressive chromatin<sup>55</sup>. This dual marking keeps genes silent but poised for rapid activation when triggered by certain stimuli. Bivalent chromatin is important in early development<sup>53</sup> but has also been reported in physiological and pathological processes such as aging<sup>56</sup>, cancer<sup>57</sup> and autism<sup>58</sup>. Bivalently marked domains are often associated to high-CpG-content promoters<sup>59</sup>. In this sense, estimated CpG island content at ADRA2A and ADRA2C promoters is 317 and 341 while it is 29 and 123 for GRM2 and GAPDH, respectively (accessed in UCSC genome browser). Moreover, an annotated list of bivalent chromatin regions in human embryonic stem cells identified ADRA2A and ADRA2C promoters as bivalent domains based on overlapping H3K4me3 and H3K27me3 peaks<sup>60</sup>. Thus, enriched bivalency at ADRA2A promoter depicted by both H3K4me3 and H3K27me3 enhancement in DLPFC of subjects with schizophrenia would render ADRA2A gene

poised for transcriptional action. Upon the right stimulus, this state might be easily activated and lead to increased ADRA2A mRNA expression in the cell. This enhanced bivalency would mean that subjects with schizophrenia show epigenetic predisposition for ADRA2A mRNA regulation, which might be a specific feature of schizophrenia. Alternatively, as previously discussed, H3K4me3 and H3K27me3 marks at ADRA2A promoter might also be due to past effect of antipsychotic treatment. Actually, at ADRA2A promoter of AP-treated schizophrenia subjects, H3K4me3 and H3K27me3 were both increased over control values, the difference being statistically significant for H3K27me3.

Another important observation was that in AP-treated schizophrenic subjects, permissive H4K16ac at ADRA2A promoter was significantly higher than in matched controls whereas it remained unaltered in AP-free schizophrenic subjects. The H4K16ac increase at ADRA2A promoter might be one of the mechanisms tipping the scales in favor of a higher ADRA2A mRNA expression in AP-treated schizophrenia subjects. Indeed, among histone H4 PTMs, H4K16ac shows greater individual effect on gene expression than counterparts H4K5, K8 and K12, at least for a subset of genes<sup>61</sup>.

With regards to ADRA2C epigenetic regulation, present results show that in DLPFC of subjects with schizophrenia repressive H3K27me3, and permissive H3K9ac and H4K5ac coexist at ADRA2C promoter region. This pattern of acetylation at histone H3 and H4 together with the repressive methylation at histone H3 suggest that epigenetic modulation of transcriptional activity of ADRA2C is also tightly regulated. The histone code depicted by the joint increase in H3K9ac and H4K5ac might determine the transcriptional activation of ADRA2C gene<sup>62</sup>. Nevertheless, recent reports call for caution and suggest that histone mark functions still remain unknown<sup>63</sup>. Analysis of schizophrenic subjects based on antipsychotic drug presence revealed the significant upregulation of H3K9ac and H4K5ac in AP-free and AP-treated schizophrenia subjects,

respectively. These results may suggest a selective influence of antipsychotic treatment on H4K5ac at ADRA2C promoter. However, we acknowledge that the lack of significance in certain subgroups could be due to the human variability of the samples. In this sense, future studies should properly ascertain the role of antipsychotic drug modulation on histone PTMs at ADRA2A and ADRA2C promoter regions by means of chronic treatment in animals.

Antipsychotic treatment exerted modulation of epigenetic mechanisms is starting to be evaluated. The majority of published articles have evaluated antipsychotic influence on DNA methylation at neurotransmitter-associated candidate genes or genome-wide level (reviewed in Ovenden et al, 2018<sup>64</sup>). However, the effect of antipsychotic drug treatment on histone PTM and associated processes is scarce. Most relevant findings concern the atypical antipsychotic-induced upregulation of HDAC2, which has been related to histone hypoacetylation at GRM2 promoter<sup>27,65</sup>. Further evidence on clozapine role in epigenetics is provided by the enhanced expression of HMT *mixed-lineage leukemia 1 (Mll1)* by chronic clozapine<sup>28</sup>. Together with present results, these studies highlight the need for further investigation on antipsychotic drug influence on epigenetic mechanisms.

Studies in postmortem human brain are also complicated by the effect of confounding demographic and methodological factors<sup>66,67</sup>. According to our results, histone PTMs at ADRA2A and ADRA2C promoters are influenced by sex, storage time and PMD of the samples. Actually, the effect of sex on epigenetics has been previously described (for a review see Singh et al, 2019<sup>68</sup>) with evidence for HDAC and HMT sex-specific expression<sup>18,28,69</sup>. In this sense, our study found that all histone PTMs affected by sex of the subjects showed increased values for females. In any case, the effect of these factors was override by careful matching of schizophrenia and control subjects according to sex, age, PMD and storage time of the samples.

In summary, current study has shown ADRA2A and ADRA2C differential regulation in schizophrenia. The unique

upregulation of ADRA2A mRNA expression in AP-treated schizophrenia subjects but not in AP-treated rats is likely an outcome of epigenetic predisposition depicted by enhanced bivalent chromatin at ADRA2A promoter. On the other hand, increased ADRA2C mRNA expression in schizophrenia might be due to the pathophysiology of the disease or to the effect of past antipsychotic treatment. Also for ADRA2C, histone acetylation and methylation is specifically upregulated at promoter regions. In the light of current and past results<sup>32</sup>, the suggested antipsychotic effect potentiation by  $\alpha$ 2A-adrenoceptor agonists or  $\alpha$ 2C-adrenoceptor antagonists deserves further study<sup>5</sup>. A final warning due to the specificity of histone PTMs at different genes is that the impact of coadjuvant antipsychotic and HDAC inhibitors<sup>31</sup> at relevant gene clusters should also be carefully studied.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Spanish MINECO (grant SAF2013-48586-R) and Basque Government (grant IT1211/19)

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### REFERENCES

1. McCutcheon, R. A., Reis Marques, T. & Howes, O. D. Schizophrenia - An Overview. *JAMA Psychiatry* **77(2)**, 201-210 (2020).
2. Maletic, V., Eramo, A., Gwin, K., Offord, S. J. & Duffy, R. A. The role of norepinephrine and its  $\alpha$ -adrenergic receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder and schizophrenia: A systematic Review. *Frontiers in Psychiatry* **8**, 42 (2017).
3. Uys, M. M., Shahid, M. & Harvey, B. H. Therapeutic potential of selectively targeting the  $\alpha$ 2C -adrenoceptor in cognition, depression, and schizophrenia—New developments and future perspective. *Frontiers in Psychiatry* **8**, 144 (2017).
4. Betti, A. H. *et al.* PT-31, a putative  $\alpha$ 2-adrenoceptor agonist, is effective in schizophrenia cognitive symptoms in mice. *Behav. Pharmacol.* **30(7)**, 574-587 (2019).
5. Brosda, J., Jantschak, F. & Pertz, H. H.  $\alpha$ 2-adrenoceptors are targets for antipsychotic drugs. *Psychopharmacology* **231(5)**, 801-812 (2014).

6. Savolainen, K., Ihalainen, J., Jalkanen, A. J. & Forsberg, M. M. Selective adrenergic alpha2C receptor antagonist ameliorates acute phencyclidine-induced schizophrenia-like social interaction deficits in rats. *Psychopharmacology* **236(4)**, 1245–1253 (2019).
7. Arnsten, A., and Wang, M. Targeting prefrontal cortical systems for drug development: potential therapies for cognitive disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **56**, 339–360(2016).
8. Erdozain, A. M., Brocos-Mosquera, I., Gabilondo, A. M., Meana, J. J. & Callado, L. F. Differential  $\alpha$ 2A - and  $\alpha$ 2C -adrenoceptor protein expression in presynaptic and postsynaptic density fractions of postmortem human prefrontal cortex. *J. Psychopharmacol.* **33(2)**, 244-249 (2019).
9. Arnsten, A. Catecholamine influences on dorsolateral prefrontal cortical networks. *Biological Psychiatry* **69(12)**, e89–e99 (2011).
10. Prata, D. P., Costa-Neves, B., Cosme, G. & Vassos, E. Unravelling the genetic basis of schizophrenia and bipolar disorder with GWAS: A systematic review. *Journal of Psychiatric Research* **114**, 178-207 (2019).
11. Ripke, S. *et al.* Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**, 421–427 (2014).
12. Bolonna, A. A. *et al.* No influence of adrenergic receptor polymorphisms on schizophrenia and antipsychotic response. *Neurosci. Lett.* **280**, 65–68 (2000).
13. Tsai, S. J. *et al.* Association analysis of polymorphism in the promoter region of the alpha2A-adrenoceptor gene with schizophrenia and clozapine response. *Schizophr. Res.* **49**, 53–58 (2001).
14. Clark, D. A., Mata, I., Kerwin, R. W., Munro, J. & Arranz, M. J. No association between ADRA2A polymorphisms and schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **144**, 341–343 (2007).
15. Lochman, J. *et al.* Interactive effect of MTHFR and ADRA2A gene polymorphisms on pathogenesis of schizophrenia. *Neuroendocrinol. Lett.* **34(8)**, 792-797 (2013).
16. Peedicayil, J. & Grayson, D. R. An epigenetic basis for an omnigenic model of psychiatric disorders. *Journal of Theoretical Biology* **443**, 52-55 (2018).
17. Richetto, J. & Meyer, U. Epigenetic modifications in schizophrenia and related disorders: Molecular scars of environmental exposures and source of phenotypic variability. *Biological Psychiatry* **89(3)**, 215-226 (2020).
18. Johnstone, A. L. *et al.* EZH1 is an antipsychotic-sensitive epigenetic modulator of social and motivational behavior that is dysregulated in schizophrenia. *Neurobiol. Dis.* **119**, 149-158 (2018).
19. Chase, K. A. *et al.* Evidence of a sex-dependent restrictive epigenome in schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* **65**, 87-94 (2015).
20. Chase, K. A., Gavin, D. P., Guidotti, A. & Sharma, R. P. Histone methylation at H3K9: Evidence for a restrictive epigenome in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **149(1-3)**, 15-20 (2013).
21. Bahari-Javan, S. *et al.* HDAC1 links early life stress to schizophrenialike phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114(23)**, e4686-e4694 (2017).
22. Sharma, R. P., Grayson, D. R. & Gavin, D. P. Histone deacetylase 1 expression is increased in the prefrontal cortex of schizophrenia subjects: Analysis of the National Brain Databank microarray collection. *Schizophr. Res.* **98(1-3)**, 111-117 (2008).
23. Schroeder, F. A. *et al.* Expression of HDAC2 but not HDAC1 transcript is reduced in dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *ACS Chem. Neurosci.* **8(3)**, 662-668 (2017).
24. Gilbert, T. M. *et al.* PET neuroimaging reveals histone deacetylase dysregulation in schizophrenia. *J. Clin. Invest.* **129(1)**, 364-372 (2019).
25. Girdhar, K. *et al.* Cell-specific histone modification maps in the human frontal lobe link schizophrenia risk to the neuronal epigenome. *Nat. Neurosci.* **21(8)**, 1126-1136 (2018).
26. Tang, B., Dean, B. & Thomas, E. A. Disease- and age-related changes in histone acetylation at gene promoters in psychiatric disorders. *Transl. Psychiatry* **1(12)**, e64 (2011).
27. Kurita, M. *et al.* HDAC2 regulates atypical antipsychotic responses through the modulation of mGlu2 promoter activity. *Nature Neuroscience* **15**, 1245–1254 (2012).
28. Huang, H.-S. *et al.* Prefrontal dysfunction in schizophrenia involves mixed-lineage leukemia 1-regulated histone methylation at GABAergic gene promoters. *J. Neurosci.* **27**, 11254–11262 (2007).
29. Gusev, F. E. *et al.* Chromatin profiling of cortical neurons identifies individual epigenetic signatures in schizophrenia. *Transl. Psychiatry* **9(1)**, 256 (2019).
30. Sharma, R. P. *et al.* Valproic acid and chromatin remodeling in schizophrenia and bipolar disorder: Preliminary results from a clinical population. *Schizophr. Res.* **88(1-3)**, 227-231 (2006).

## Estudio de $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

31. Wang, Y., Xia, J., Helfer, B., Li, C. & Leucht, S. Valproate for schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **11(11)**, CD004028 (2016).
32. Brocos-Mosquera *et al.*  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2C-adrenoceptor expression and functionality in postmortem prefrontal cortex of schizophrenia subjects( 2021) **Under review**
33. Ordway, G. A., Jaconetta, S. M. & Halaris, A. E. Characterization of subtypes of alpha-2 adrenoceptors in the human brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**, 967-976 (1993).
34. Grijalba, B., Callado, L. F., Meana, J. J., García-Sevilla, J. A. & Pazos, A. Alpha 2-adrenoceptor subtypes in the human brain: A pharmacological delineation of [3H]RX-821002 binding to membranes and tissue sections. *Eur. J. Pharmacol.* **310**, 83-93 (1996).
35. Sastre, M. & García-Sevilla, J. A.  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtypes identified by [3H]RX821002 binding in the human brain: The agonist guanoxabenz does not discriminate different forms of the predominant  $\alpha$ 2A subtype. *J. Neurochem.* **63(3)**, 1077-1085 (1994).
36. Aoki, C., Venkatesan, C., Go, C. G., Forman, R. & Kurose, H. Cellular and subcellular sites for noradrenergic action in the monkey dorsolateral prefrontal cortex as revealed by the immunocytochemical localization of noradrenergic receptors and axons. *Cereb. Cortex* **8**, 269-277 (1998).
37. Hertz, L., Lovatt, D., Goldman, S. A. & Nedergaard, M. Adrenoceptors in brain: Cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Neurochem. Int.* **57(4)**, 411-420 (2010).
38. Glass, M. J., Huang, J., Aicher, S. A., Milner, T. A. & Pickel, V. M. Subcellular localization of  $\alpha$ -2A-adrenergic receptors in the rat medial nucleus tractus solitarius: Regional targeting and relationship with catecholamine neurons. *J. Comp. Neurol.* **433(2)**, 193-207 (2001).
39. Modirrousta, M., Mainville, L. & Jones, B. E. Gabaergic neurons with  $\alpha$ 2-adrenergic receptors in basal forebrain and preoptic area express c-Fos during sleep. *Neuroscience* **129(3)**, 803-810 (2004).
40. Wang, M. *et al.*  $\alpha$ 2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* **129(2)**, 397-410 (2007).
41. Arnsten, A. F. & Goldman-Rakic, P. S. Alpha2-adrenergic mechanisms in prefrontal cortex associated with cognitive decline in aged nonhuman primates. *Science* **230**, 1273-1276 (1985).
42. Arnsten, A. F. T., Wang, M. J. & Paspalas, C. D. Neuromodulation of thought: Flexibilities and vulnerabilities in prefrontal cortical network synapses. *Neuron* **76**, 223-239 (2012);
43. Liu, Y., Beyer, A. & Aebersold, R. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell* **165(3)**, 535-550 (2016).
44. Schotte, A. *et al.* Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: In vitro and in vivo receptor binding. *Psychopharmacology (Berl.)* **124(1-2)**, 57-73 (1996).
45. Kalkman, H. O. & Loetscher, E.  $\alpha$ 2C-adrenoceptor blockade by clozapine and other antipsychotic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **462**, 33-40 (2003).
46. Marcus, M. M. *et al.* Combined  $\alpha$ 2 and D2/3 receptor blockade enhances cortical glutamatergic transmission and reverses cognitive impairment in the rat. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **8(3)**, 315-827 (2005).
47. Marcus, M. M. *et al.* Adjunctive  $\alpha$ 2-adrenoceptor blockade enhances the antipsychotic-like effect of risperidone and facilitates cortical dopaminergic and glutamatergic, NMDA receptor-mediated transmission. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **13(7)**, 891-903 (2010).
48. Pandey, G. N. & Dwivedi, Y. Noradrenergic function in suicide. *Arch. Suicide Res.* **11(3)**, 235-246 (2007).
49. Callado, L. F. *et al.* Selective increase of alpha2A-adrenoceptor agonist binding sites in brains of depressed suicide victims. *J. Neurochem.* **70**, 1114-1123 (1998).
50. Meana, J. J., Barturen, F. & García-Sevilla, J. A. Alpha2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: Increased receptor density associated with major depression. *Biol. Psychiatry* **31**, 471-490 (1992).
51. Rivero, G. *et al.* Increased  $\alpha$ 2- and  $\beta$ 1-adrenoceptor densities in postmortem brain of subjects with depression: Differential effect of antidepressant treatment. *J. Affect. Disord.* **167**, 343-350 (2014).
52. Ordway, G. A., Schenk, J., Stockmeier, C. A., May, W. & Klimek, V. Elevated agonist binding to alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus in major depression. *Biol. Psychiatry* **53**, 315-323 (2003).
53. Smigielski, L., Jagannath, V., Rössler, W., Walitza, S. & Grünblatt, E. Epigenetic mechanisms in schizophrenia and other psychotic disorders: A systematic review of empirical human findings. *Molecular Psychiatry* **25(8)**, 1718-1748 (2020).
54. O'dushlaine, C. *et al.* Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways. *Nat. Neurosci.*

- 18(2)**, 199-209 (2015).
55. Bernstein, B. E. *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125(2)**, 315-326 (2006).
56. Rakyan, V. K. *et al.* Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res.* **20(4)**, 434-439 (2010).
57. Ohm, J. E. *et al.* A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat. Genet.* **39(2)**, 237-242 (2007).
58. Corley, M. J. *et al.* Epigenetic delay in the neurodevelopmental trajectory of DNA methylation states in autism spectrum disorders. *Front. Genet.* **10**, 907 (2019).
59. Zhou, V. W., Goren, A. & Bernstein, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics* **12(1)**, 7-18 (2011).
60. Court, F. & Arnaud, P. An annotated list of bivalent chromatin regions in human ES cells: A new tool for cancer epigenetic research. *Oncotarget* **8(3)**, 4110-4124 (2017).
61. Dion, M. F., Altschuler, S. J., Wu, L. F. & Rando, O. J. Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102(15)**, 5501-5506 (2005).
62. Villaseñor, R. & Baubec, T. Regulatory mechanisms governing chromatin organization and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **70**, 10-17 (2021).
63. Morgan, M. A. J. & Shilatifard, A. Reevaluating the roles of histone-modifying enzymes and their associated chromatin modifications in transcriptional regulation. *Nat. Genet.* **52(12)**, 1271-1281 (2020).
64. Ovenden, E. S., McGregor, N. W., Emsley, R. A. & Warnich, L. DNA methylation and antipsychotic treatment mechanisms in schizophrenia: Progress and future directions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **81**, 38-49 (2018).
65. Ibi, D. *et al.* Antipsychotic-induced Hdac2 transcription via NF-κB leads to synaptic and cognitive side effects. *Nat. Neurosci.* **20(9)**, 1247-1259 (2017).
66. Nagy, C. *et al.* Effects of postmortem interval on biomolecule integrity in the brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **74(5)**, 459-469 (2015).
67. Preece, P. & Cairns, N. J. Quantifying mRNA in postmortem human brain: Influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Mol. Brain Res.* **118(1-2)**, 60-71 (2003).
68. Singh, G., Singh, V. & Schneider, J. S. Post-translational histone modifications and their interaction with sex influence normal brain development and elaboration of neuropsychiatric disorders. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1865(8)**, 1968-1981 (2019).
69. Gilbert, T. M. *et al.* Neuroepigenetic signatures of age and sex in the living human brain. *Nat. Commun.* **10(1)**, 2945 (2019).





## **MATERIAL SUPLEMENTARIO**

### **Differential ADRA2A and ADRA2C gene expression and epigenetic regulation in schizophrenia. Effect of antipsychotic drug treatment**

**Iria Brocos-Mosquera<sup>1,2</sup>, Patricia Miranda-Azpiazu<sup>1,2</sup>, Carolina Muguruza<sup>1,2</sup>, Virginia Corzo, Benito Morentin<sup>4</sup>, J. Javier Meana<sup>1,2,3</sup>, Luis F. Callado<sup>1,2,3\*</sup>, Guadalupe Rivero<sup>1,2,3\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

<sup>3</sup>Biocruces Bizkaia Health Research Institute, Barakaldo, Bizkaia, Spain

<sup>4</sup>Section of Forensic Pathology, Basque Institute of Legal Medicine, Bilbao, Spain

Tablas suplementarias 1-7

Figuras suplementarias 1-7



**Table 1.** Demographic characteristics, psychiatric diagnoses and toxicological characteristics of individual subjects included in mRNA expression study.

Case	Gender (M/F)	Age (years)	PMD (hours)	Storage time (months)	RIN	Cause of death	Antipsychotic drugs in blood	Other drugs in blood
<b>Antipsychotic free S subjects (n=10) and matched controls (n=10)</b>								
S1	M	48	20	141	7.80	Suicidal (train)		
C1	M	47	17	162	7.90	Natural (CRF)		Nordiazepam
S2	M	45	3	125	6.70	Suicidal (jumping)		Nordiazepam
C2	M	48	7	162	7.10	Accidental (traffic)		
S3	F	37	58	109	7.20	Suicidal (drug intoxication)		Heroin
C3	F	36	38	233	8.20	Homicide		Diazepam Heroin Cocaine
S4	M	46	22	100	6.00	Suicidal (jumping)		Biperiden
C4	M	41	14	80	9.10	Natural (heart attack)		
S5	F	37	26	68	7.40	Suicidal (jumping)		Lorazepam
C5	F	38	22	65	6.80	Accidental (run over)		
S6	M	48	11	69	7.00	Suicidal (jumping)		
C6	M	49	8	62	8.70	Natural (CRF)		
S7	M	35	5	71	8.50	Suicidal (hanging)		
C7	M	37	6	254	7.30	Accidental (traffic)		Ethanol
S8	M	45	18	78	6.70	Suicidal (jumping)		
C8	M	47	15	63	7.70	Accidental (traffic)		
S9	M	34	15	81	6.70	Natural (CRF)		
C9	M	34	17	40	8.00	Accidental (traffic)		
S10	M	52	7	85	6.60	Suicidal (jumping)		Lormetazepam
C10	M	51	13	65	5.90	Accidental (traffic)		Ethanol
<b>Antipsychotic free S subjects (n=10) and matched controls (n=10)</b>								
Schizophrenia	8M/2F	43±2	19±5	93±8	7.06±0.71			
Controls	8M/2F	43±2	16±3	119±25	7.67±0.94			
<b>Antipsychotic treated S subjects (n=9) and matched controls (n=9)</b>								
S11	M	44	7	150	8.30	Natural (CRF)	Clotiapine Levomopromazine	Nordiazepam Biperiden
C11	M	44	23	69	8.30	Accidental (run over)		
S12	M	35	11	89	8.00	Natural (CRF)	Clozapine	Clomipramine Nordiazepam Paracetamol
C12	M	36	18	159	7.30	Accidental (work)		Benzoilecgonine Ethanol
S13	F	60	23	73	6.00	Natural (peritonitis)	Clozapine Amisulpride	Lorazepam
C13	F	60	48	79	7.80	Natural (cerebral haemorrhage)		Carbamazepine Phenytoin Phenobarbital
S14	M	56	12	78	6.70	Natural (CRF)	Olanzapine Clotiapine	
C14	M	54	16	69	8.70	Accidental (work)		Ethanol
S15	M	41	17	44	5.60	Homicide (white weapon)	Clozapine	Alprazolam
C15	M	40	18	158	7.60	Accidental (work)		Ethanol
S16	M	42	14	89	5.90	Suicidal (toxic ingestion)	Risperidone	Nordiazepam
C16	M	43	20	61	7.40	Natural (CRF)		Ibuprofen
S17	M	36	8	110	9.40	Suicidal (toxic ingestion)	Olanzapine	
C17	M	32	4	42	8.50	Accidental (run over)		
S18	F	48	17	127	6.80	Suicidal (jumping)	Olanzapine Clotiapine	
C18	F	50	11	86	8.00	Natural (CRF)		
S19	F	42	14	136	6.90	Suicidal (toxic ingestion)	Clozapine Sulpiride	Quetiapine Nordiazepam
C19	F	41	22	58	6.90	Accidental (crushed)		
<b>Antipsychotic treated S subjects (n=9) and matched controls (n=9)</b>								
Schizophrenia	6M/3F	45±3	14±2	100±11	7.07±1.26			
Controls	6M/3F	44±3	20±4	87±14	7.83±0.6			
<b>All S subjects (n=19) and matched controls (n=19)</b>								
Schizophrenia	14M/5F	44±2	16±3	96±7	7.06±0.98			
Controls	14M/5F	44±2	18±2	104±15	7.75±0.78			

Group values are means ± S.E.M. M, male; F, female; C, control subjects; S, schizophrenia subjects; PMD, postmortem delay; CRF, cardiorespiratory failure.

**Table 2.** Demographic characteristics, psychiatric diagnoses and toxicological characteristics of individual subjects included in epigenetic study.

Case	Sex (M/F)	Age (years)	PMD (hours)	Storage time (months)	Cause of death	Antipsychotic drugs in blood	Other drugs in blood
<b>Antipsychotic free SZ subjects (n=12) and matched controls (n=12)</b>							
S1	M	31	14	145	Suicidal (jumping)		Lorazepam
C1	M	32	4	42	Accidental (run over)		
S2	M	48	20	141	Suicidal (train)		
C2	M	47	17	162	Natural (CRF)		Nordiazepam
S3	M	45	3	125	Suicidal (jumping)		Nordiazepam
C3	M	48	7	162	Accidental (traffic)		
S4	F	37	58	109	Suicidal (drug intoxication)		Heroin, Diazepam
C4	F	36	38	233	Homicide		Diazepam, Heroin, Cocaine
S5	M	46	22	100	Suicidal (jumping)		Biperiden
C5	M	46	24	86	Natural (heart attack)		
S6	F	37	26	68	Suicidal (jumping)		Lorazepam
C6	F	38	22	65	Accidental (run over)		
S7	M	48	11	69	Suicidal (jumping)		
C7	M	49	8	62	Natural (CRF)		
S8	M	35	5	71	Suicidal (hanging)		
C8	M	37	6	254	Accidental (traffic)		Ethanol
S9	F	59	9	76	Natural (CRF)		
C9	F	57	4	114	Accidental (traffic)		
S10	M	45	18	78	Suicidal (jumping)		
C10	M	47	15	63	Accidental (traffic)		
S11	M	34	15	81	Natural (CRF)		
C11	M	34	17	40	Accidental (traffic)		
S12	M	52	7	85	Suicidal (jumping)		Lormetazepam
C12	M	51	13	65	Accidental (traffic)		Ethanol
<b>Antipsychotic free SZ subjects (n=12) and matched controls (n=12)</b>							
<b>Schizophrenia</b>	9M/3F	43±2	17±4	96±8			
<b>Controls</b>	9M/3F	44±2	15±3	112±21			
<b>Antipsychotic treated SZ subjects (n=12) and matched controls (n=12)</b>							
S13	M	44	7	150	Natural (CRF)	Clotiapine, Levomepromazine	Nordiazepam, Biperiden
C13	M	44	23	69	Accidental (run over)		
S14	F	30	28	133	Suicidal (drug intoxication)	Haloperidol	Lorazepam, Procainamide, Metamizole, Lidocaine, Mepivacaine
C14	F	30	18	76	Accidental (traffic)		
S15	M	35	11	89	Natural (CRF)	Clozapine	Clomipramine, Nordiazepam, Paracetamol

C15	M	36	18	159	Accidental (work)		Benzoyllecgonine, Ethanol
S16	F	60	23	73	Natural (peritonitis)	Clozapine Amisulpride	Lorazepam
C16	F	60	48	79	Natural (cerebral haemorrhage)		Carbamazepine, Phenytoin, Phenobarbital
S17	M	56	12	78	Natural (CRF)	Olanzapine Clotiapine	
C17	M	54	16	69	Accidental (work)		Ethanol
S18	M	41	17	44	Homicide (white weapon)	Clozapine	Alprazolam
C18	M	40	18	158	Accidental (work)		Ethanol
S19	M	41	11	45	Suicidal (white weapon)	Clotiapine, Quetiapine	Lorazepam, Paracetamol
C19	M	41	14	80	Natural (heart attack)		
S20	M	42	14	89	Suicidal (toxic ingestion)	Risperidone	Nordiazepam
C20	M	43	20	61	Natural (CRF)		Ibuprofen
S21	M	36	8	110	Suicidal (toxic ingestion)	Olanzapine	
C21	M	36	23	70	Accidental (crushed)		
S22	F	28	22	125	Suicidal (jumping)	Risperidone	
C22	F	32	19	140	Accidental (traffic)		Ethanol
S23	F	48	17	127	Suicidal (jumping)	Olanzapine, Clotiapine	
C23	F	50	11	86	Natural (CRF)		
S24	F	42	14	136	Suicidal (toxic ingestion)	Clozapine, Sulpiride, Quetiapine	Nordiazepam
C24	F	41	22	58	Accidental (crushed)		
<b>Antipsychotic treated SZ subjects (n=12) and matched controls (n=12)</b>							
Schizophrenia	7M/5F	42±3	15±2	100±10			
Controls	7M/5F	42±3	21±3	92±11			
<b>All SZ subjects (n=24) and matched controls (n=24)</b>							
Schizophrenia	16M/8F	43±2	16±2	98±6			
Controls	16M/8F	43±2	18±2	102±12			

Group values are means ± S.E.M. M, male; F, female; C, control subjects; S, schizophrenia subjects; PMD, postmortem delay; CRF, cardiorespiratory failure.

**Table 3.** Sex, age, PMD and storage time of suicide victims included in the study. Quantitative variables are expressed as mean ± SEM (standard error of the mean).

	ALL	AP-free	AP-treated
	17 S	7 S	10 S
Sex (M/F)	11M/6F	3M/4F	8M/2F
Age (years)	41±2	42±2	38±3
PMD (hours)	18±3	18±5	16±3
Storage time (months)	103±7	99±9	109±12

M, male; F, female; S, schizophrenia subjects; AP-free, antipsychotic-free; AP-treated, antipsychotic-treated.

**Table 4.** Demographic characteristics and toxicological characteristics of individual depressed subjects included in mRNA expression study.

Case	Gender (M/F)	Age (years)	PMD (hours)	Storage time (months)	RIN	Cause of death	Antidepressant drugs in blood	Other drugs in blood
D1	F	35	23	168	5.2	Suicidal (jumping)		
C1	F	35	22	204	7.8	Accidental (traffic)		
D 2	F	73	17	48	6.6	Suicidal (white weapon)		
C2	F	74	19	60	4.6	Accidental (traffic)		Paracetamol
D 3	F	79	13	36	7.6	Suicidal (jumping)		
C3	F	77	13	108	7.6	Accidental (run over)		Primidone, phenobarbital
D 4	M	78	22	60	7.5	Suicidal (hanging)		
C4	M	78	22	168	7.4	Accidental (run over)		
D 5	F	56	24	156	5.9	Suicidal (jumping)		
C5	F	57	4	36	7.2	Accidental (traffic)		
D 6	F	50	19	72	7.5	Suicidal (jumping)	Venlafaxine, mirtazapine	
C6	F	50	31	132	5.9	Accidental (traffic)		
D 7	F	35	25	60	6.5	Suicidal (jumping)	Venlafaxine, mirtazapine	Benzodiazepines, $\Delta^9$ tetrahydrocannabinol (THC)
C7	F	35	24	120	7.1	Accidental (traffic)		
D 8	M	33	14	60	8	Suicidal (jumping)	Venlafaxine	Benzodiazepines
C8	M	31	13	48	8.1	Accidental (traffic)		Ethanol
D 9	M	43	34	36	5.8	Suicidal (hanging)	Citalopram	benzodiazepines
C9	M	43	15	180	8.2	Accidental (traffic)		
D 10	F	49	18	24	4.4	Suicidal (drowning)	Fluoxetine	Metamizol
C10	F	58	20	120	7.9	Natural (heart failure)		
D 11	M	50	9	72	7.2	Suicidal (drug intoxication)	Venlafaxine	Quetiapine, biperiden
C11	M	48	7	84	7.2	Accidental (traffic)		
D 12	F	35	7	24	5.6	Suicidal (jumping)	Duloxetine, fluoxetine	Topiramate, cocaine, paracetamol
C12	F	36	8	60	6.8	Natural (heart failure)		
D 13	M	75	17	24	8.3	Suicidal (jumping)	Venlafaxine, mirtazapine	Benzodiazepines
C13	M	76	24	24	7.8	Accidental (traffic)		Ethanol
<b>All 5 subjects (n=13) and matched controls (n=13)</b>								
Depression	5M/8F	53±5	19±2	65±13	6.62±0.33			
Controls	5M/8F	54±5	17±2	103±16	7.2±0.28			

Group values are means ± S.E.M. M, male; F, female; C, control subjects; D, depression subjects; PMD, postmortem delay.

**Table 5.** Description and concentration of primary antibodies.

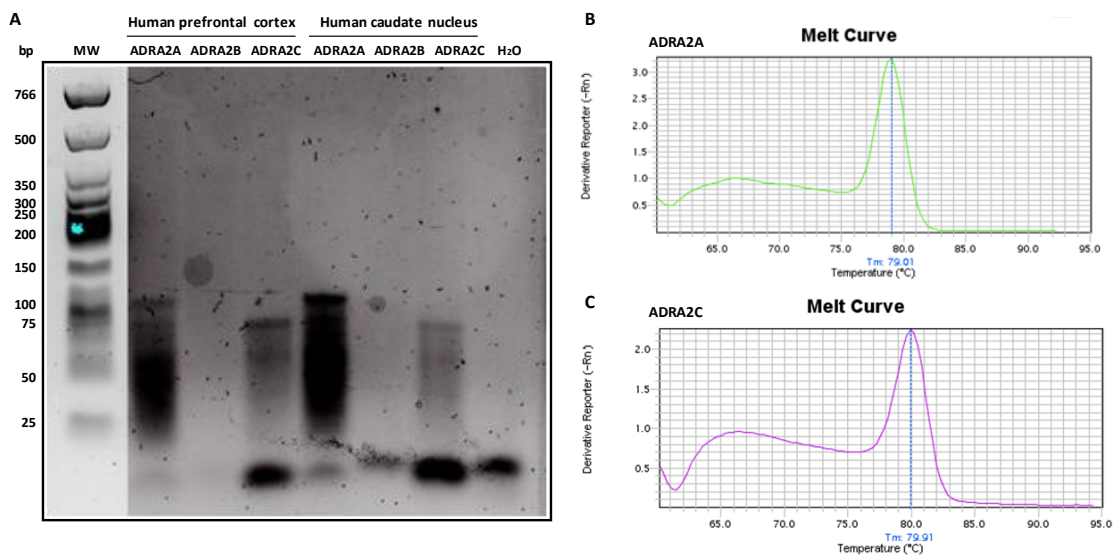
Primary antibodies				
Target	Description	Manufacturer	Catalog #	Ab dilution
<b>H3K4me3</b>	Polyclonal rabbit-anti-histone H3 trimethylated at lysine 4	Merck Millipore	07-473	1:333
<b>H3K27me3</b>	Polyclonal rabbit-anti-histone H3 trimethylated at lysine 27	Merck Millipore	07-449	1:200
<b>Ach3</b>	Polyclonal rabbit-anti-acetyl-histone H3	Merck Millipore	06-559	1:200
<b>Ach3K9</b>	Polyclonal rabbit-anti-acetyl-histone H3 on lysine 9	Merck Millipore	07-352	1:200
<b>Ach3K27</b>	Polyclonal rabbit-anti-acetyl-histone H3 on lysine 27	Merck Millipore	07-360	1:167
<b>Ach4K5</b>	Polyclonal rabbit-anti-acetyl-histone H4 on lysine 5	Merck Millipore	07-327	1:100
<b>Ach4K16</b>	Polyclonal rabbit-anti-acetyl-histone H4 on lysine 16	Merck Millipore	07-329	1:200
<b>IgG</b>	Polyclonal rabbit-anti-IgG	Merck Millipore	12-370	1:333

**Table 6.** PCR primer pairs for ChIP and RT-qPCR assay in postmortem human brain samples and rat brain.

Sample	Sample amount (ng)	Target gene	Type of primer	Sequence	Primer concentration ( $\mu$ M)	Assay buffer	Reaction efficiency (%)	Amplification product (bp)
Human cDNA	20	ADRA2A	Forward	5'-GAGCAAGCACTGGACTACAA-3'	0,8	Power Sybr Green	99	99
			Reverse	5'-AGAGAGAGAGTTGGGAATGGA-3'	0,8			
	20	ADRA2C	Forward	5'-TTCACCTTTGTGCTGGCT-3'	0,8	Power Sybr Green	91	75
			Reverse	5'-CAGGCTGTAGCTGAAGAAGAA-3'	0,8			
Rat cDNA	4	ADRA2A	Forward	5'-TCCTGAGAGGGAAGGGATT-3'	0,4	Fast Sybr Green	110	70
			Reverse	5'-GTCTTGGTCCATCGCTGAATA-3'	0,4			
	4	ADRA2C	Forward	5'-CTCTGGCTGCCTGGACTT-3'	0,4	Fast Sybr Green	101	60
			Reverse	5'-GTTGGTCCCCCTATGTACCC-3'	0,4			
Human genomic DNA		ADRA2A	Forward	5'-TAACTCACACCCGGAGGTTACT-3'	0,1	Fast Sybr Green	107	125
			Reverse	5'-ACGGAGCAGAACGCAAC-3'	0,1			
		ADRA2C	Forward	5'-TGGTGACTTTGAACACCTCTC-3'	0,2	Fast Sybr Green	102	150
			Reverse	5'-TGCTGGAGCATGAATCATACTA-3'	0,2			
		GAPDH	Forward	5'-TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3'	0,1	Fast Sybr Green	108	165
			Reverse	5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'	0,1			

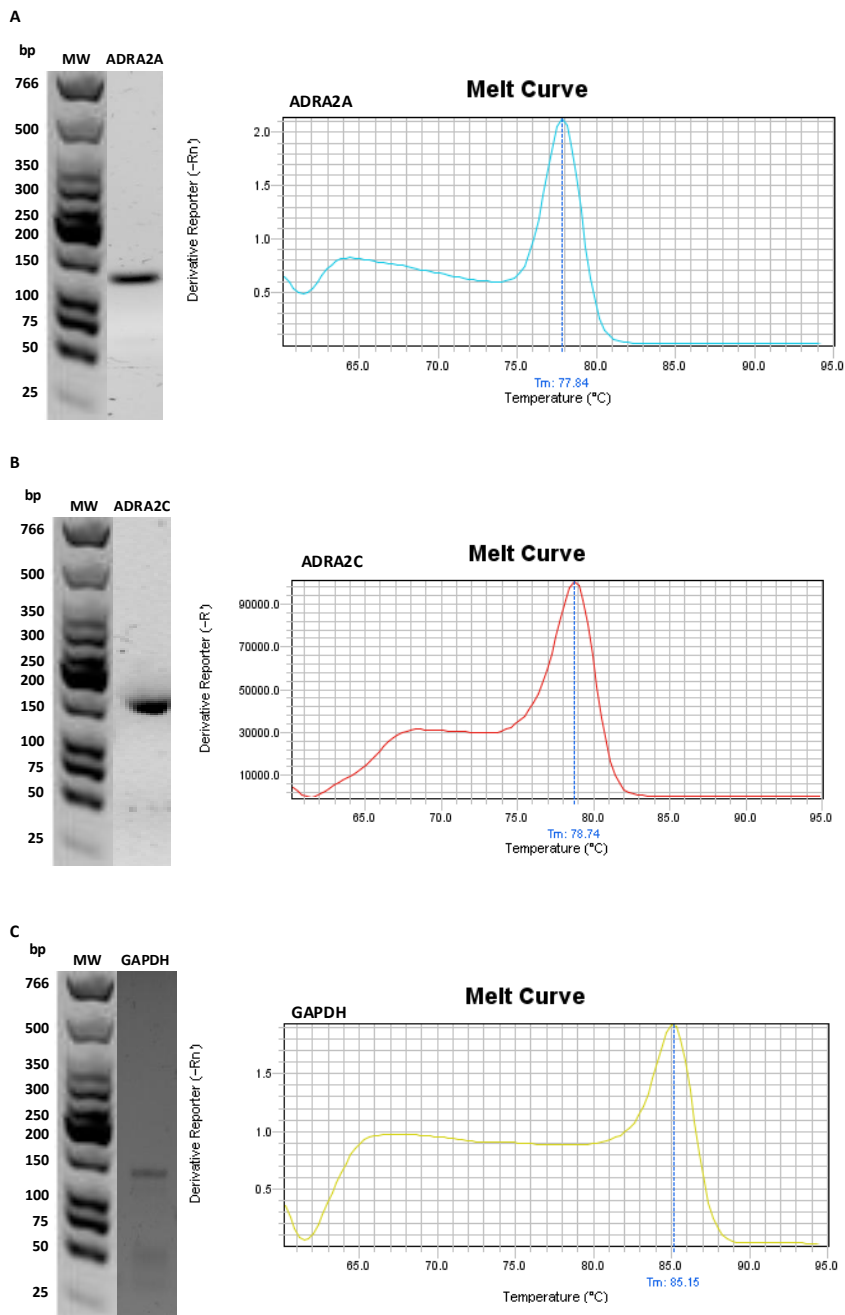
**Table 7.** Taqman assays used in RT-qPCR experiments in postmortem human brain and in rat brain.

Sample	Gene	Gene name	Taqman assay ID
Human cDNA	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	43333762F
	RPS13	Ribosomal protein S13	Hs01945436_u1
Rat cDNA	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	4352932E
	RPS29	Ribosomal protein S29	Mm02342448_gH



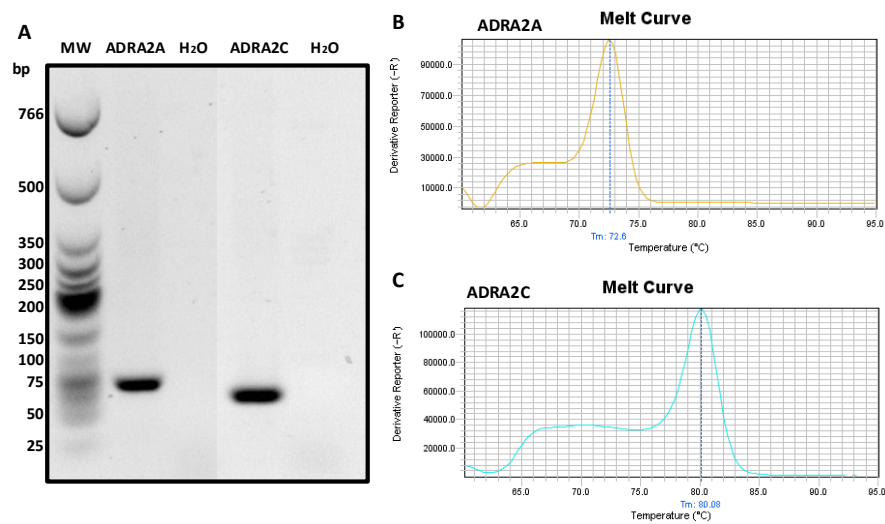
**Figure 1.** Characterization of qPCR for quantification of ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in postmortem human brain. A. Amplification products of ADRA2A and ADRA2C mRNA in human prefrontal cortex and human caudate nucleus were electrophoretically separated for correct size verification. Molecular grade H<sub>2</sub>O was run as negative control. B. Melting curve of qPCR amplification product obtained in ADRA2A mRNA expression study. C. Melting curve of qPCR amplification product obtained in ADRA2C mRNA expression study. These analyses confirmed the presence of a main peak in all cases.



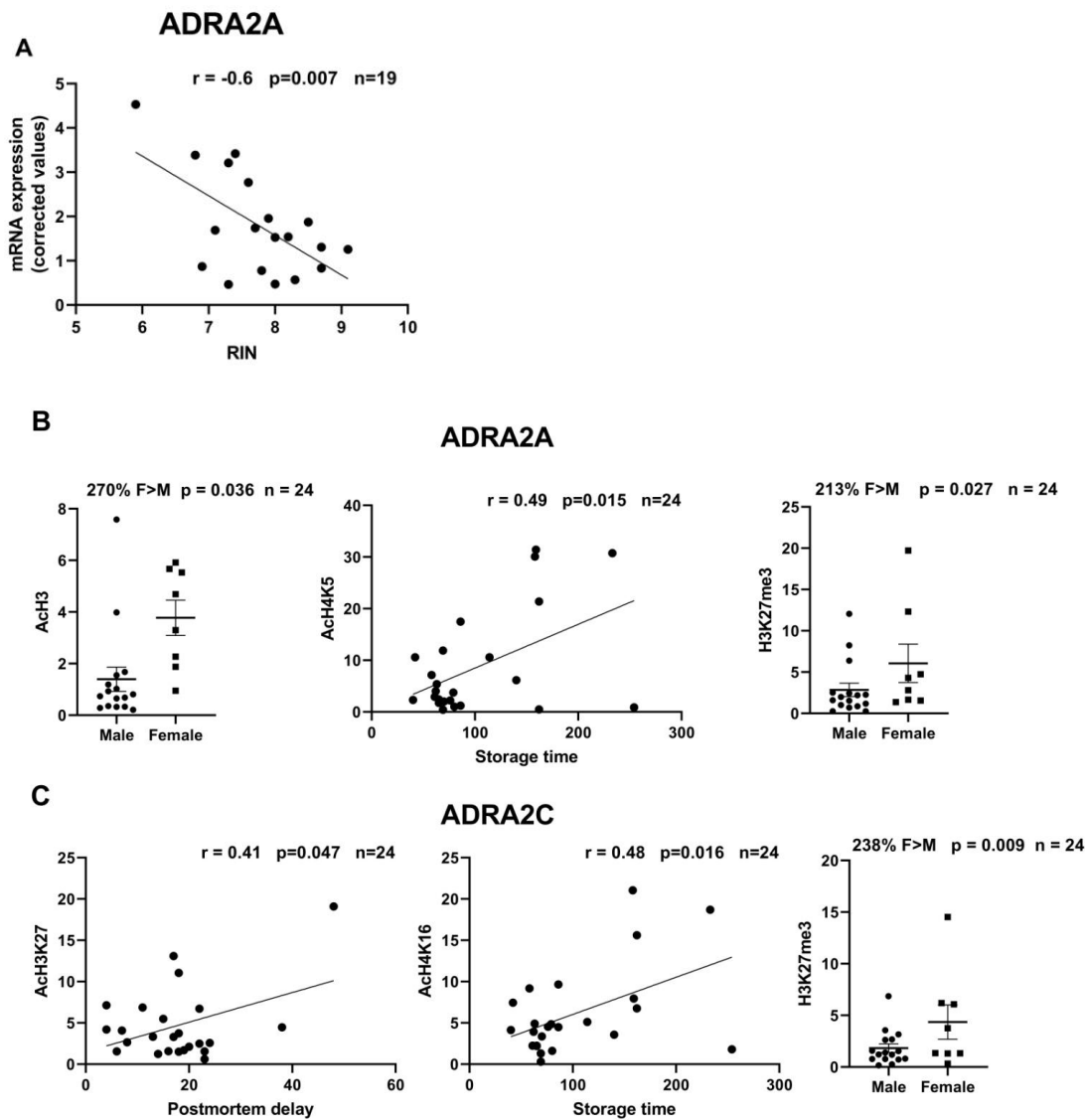


**Figure 2.** Characterization of qPCR for specific ADRA2A, ADRA2C and GAPDH genomic DNA amplification on immunoprecipitated chromatin. Amplification products were electrophoretically separated for correct size verification. Melting curves of qPCR amplification products confirmed the presence of a main peak in all cases.

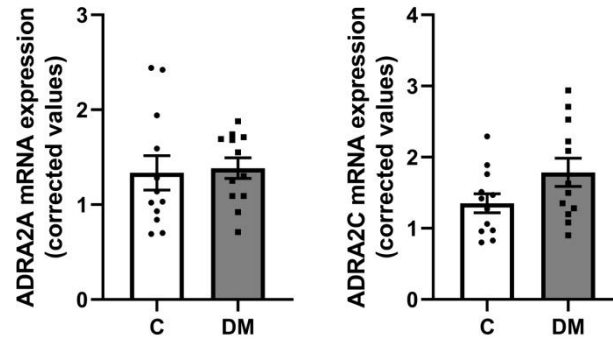
## Estudio de $\alpha 2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ



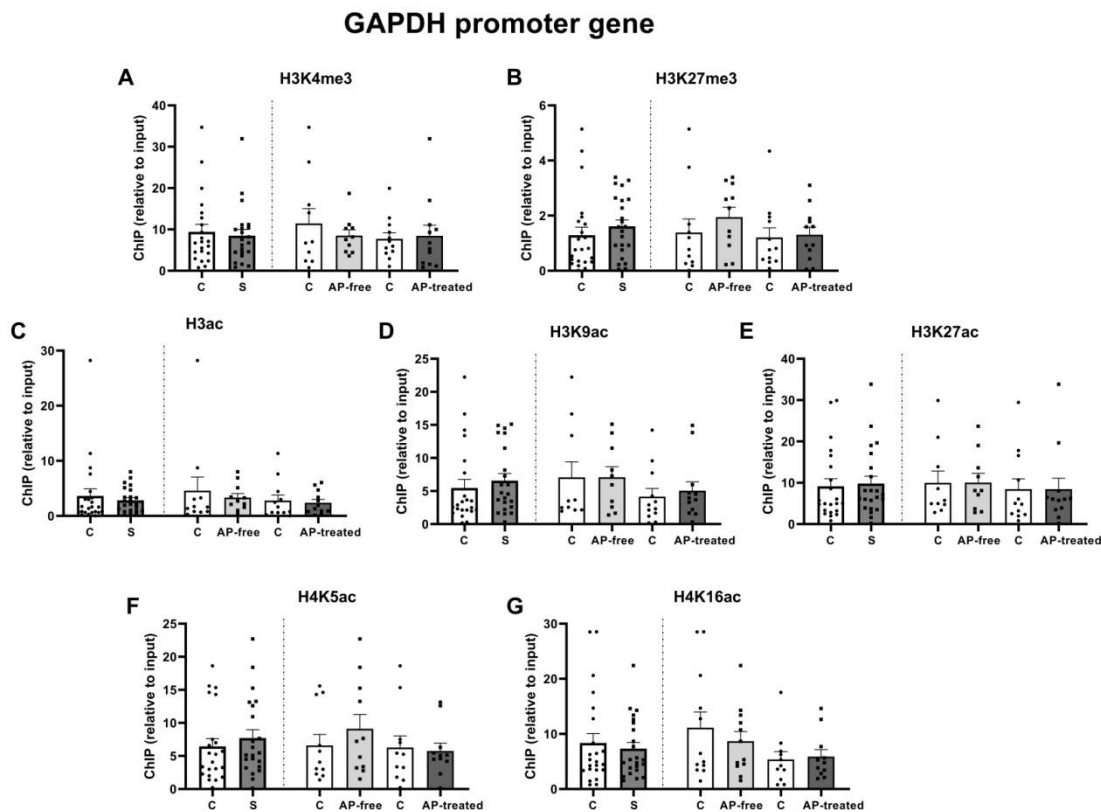
**Figure 3.** Characterization of qPCR for quantification of ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in rat brain cortex. A. Amplification products of ADRA2A and ADRA2C mRNA in rat brain cortex were electrophoretically separated for correct size verification. Molecular grade H<sub>2</sub>O was run as negative control. B. Melting curve of qPCR amplification product obtained in ADRA2A mRNA expression study. C. Melting curve of qPCR amplification product obtained in ADRA2C mRNA expression study. These analyses confirmed the presence of a main peak in all cases.



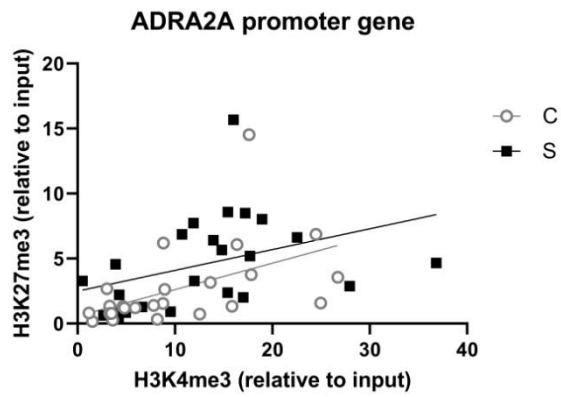
**Figure 4.** A. Effect of RIN on corrected ADRA2A mRNA expression in dorsolateral prefrontal cortex of control subjects studied by linear regression analyses, where  $r$  values are the Pearson's correlation coefficients and the lines represent the regressions of the correlations (for RIN and ADRA2A mRNA expression:  $y = 8.734 - 0.895x$ ,  $n = 19$ ). B. Effect of sex, PMD and storage time in postmortem human brain histone posttranslational modifications (PTMs) at ADRA2A and ADRA2C promoter regions. Histone PTMs at ADRA2A and ADRA2C promoters in males and females was compared by two-tailed unpaired Student's  $t$ -test. The effect of storage time (STT) and PMD was studied by linear regression analyses where  $r$  values are the Pearson's correlation coefficients and the lines represent the regressions of the correlations (for STT and H4K5ac in ADRA2A promoter gene:  $y = 0.011 + 0.085x$ ,  $n = 24$ ; for PMD and H3K27ac in ADRA2C promoter gene:  $y = 1.495 + 0.1795x$ ,  $n = 24$ ; for STT and H4K16ac in ADRA2C promoter gene:  $y = 1.52 + 0.045x$ ,  $n = 24$ ). Statistical significance is denoted by  $p < 0.05$ .



**Figure 5.** Corrected ADRA2A and ADRA2C mRNA expression in DLPFC of subjects with major depression (DM, n=13) and their respective matched controls (C). Data are shown as mean  $\pm$  SEM in triplicate. Statistical significance is denoted by  $p < 0.05$ .



**Figure 6.** Histone 3 methylation (H3K4me3 and H3K27me3) and acetylation (H3ac, H3K9ac, H3K27ac) and histone 4 acetylation (H4K5ac and H4K16ac) at promoter region of GAPDH gene. Data are shown as mean  $\pm$  SEM in triplicate.



**Figure 7.** Effect of H3K27me3 expression on H3K4me3 expression in ADRA2A promoter gene in dorsolateral prefrontal cortex of controls (grey points) and subjects with schizophrenia (black squares) studied by linear regression analyses, where r values are the Pearson's correlation coefficients and the lines represent the regressions of the correlations (for control subjects:  $y=0.577+0.203x$ ,  $r=0.498$   $p=0.0133$ ,  $n=24$ ; for schizophrenia subjects:  $y=2.491+0.16x$ ,  $r=0.38$ ,  $p=0.067$ ,  $n=24$ )



## **ARTÍCULO 4**

### **Characterisation of spinophilin immunoreactivity in postmortem human brain homogenates**

Iria Brocos-Mosquera, Amaia Nuñez del Moral, Benito Morentin,  
J. Javier Meana, Luis F. Callado, Amaia M. Erdozain

Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry (2018)  
*81*, 236–242

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.09.019>





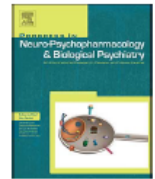
#### **ARTÍCULO 4**

La espinofilina es una proteína del citoesqueleto que interviene en numerosas funciones. Entre ellas, destaca su participación en la formación y morfología de espinas dendríticas, migración neuronal y plasticidad sináptica. Además, la estructura de la espinofilina consta de varios dominios que le permiten unirse a una gran cantidad de moléculas, pudiendo modificar la actividad o función de dichas moléculas. La mayoría de estudios de expresión y distribución de espinofilina se han realizado en roedores, por lo que no hay estudios específicos de su distribución en cerebro humano. El objetivo de este estudio fue caracterizar la expresión de espinofilina en diferentes regiones del encéfalo humano y en varias fracciones subcelulares. Esto se llevó a cabo mediante la cuantificación de la expresión proteica de espinofilina mediante Western Blot en muestras de cerebro humano *postmortem* de sujetos controles sin ninguna patología psiquiátrica. Este estudio se realizó en diferentes regiones del encéfalo (corteza prefrontal dorsolateral [CPFDL], caudado, hipocampo, cerebelo y sustancia blanca) y en distintas fracciones subcelulares (homogeneizado total, citosol y fracción rica en membranas [P2]). Además, se quiso estudiar el posible efecto en la expresión proteica de la espinofilina de variables demográficas como edad, sexo, intervalo *postmortem* o tiempo de almacenamiento. En primer lugar se observó la expresión de dos bandas específicas de espinofilina, una superior, de ~ 120 kDa, y una inferior de un peso ~ de 95 kDa. A raíz de este hallazgo, se realizaron estudios de proteólisis, desfosforilación y degradación dependiente de calcio para determinar la naturaleza de las dos bandas observadas. Como resultado, se vio que la banda inferior aumentaba tras procesos de proteólisis, mientras que la superior disminuía. En cuanto a la distribución, se pudo observar que la mayor expresión de la banda superior de espinofilina se encuentra en la CPFDL, seguida por hipocampo, cerebelo, caudado y, por último, la sustancia blanca. Por el contrario, la banda inferior tiene una expresión muy similar en todas las regiones a excepción de la sustancia blanca, donde es más baja. En lo relativo al estudio de la distribución de las fracciones subcelulares, encontramos un patrón diferente en ambas bandas. En el homogeneizado total se vio una expresión similar de ambas bandas. Sin embargo, en el citosol la expresión mayoritaria pertenecía a la banda inferior, y en P2 la expresión más elevada correspondía a la banda superior. Por último, no parece que ninguna de las variables demográficas estudiadas afecte a la expresión proteica de la espinofilina. Estos resultados nos muestran la existencia de dos isoformas específicas de espinofilina que tienen un patrón de expresión diferente tanto a nivel subcelular como en la distribución en las distintas regiones cerebrales.





Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuropsychopharmacology  
& Biological Psychiatryjournal homepage: [www.elsevier.com/locate/pnp](http://www.elsevier.com/locate/pnp)

## Characterisation of spinophilin immunoreactivity in postmortem human brain homogenates

I. Brocos-Mosquera<sup>a</sup>, A. Nuñez del Moral<sup>a</sup>, B. Morentin<sup>b</sup>, J. Javier Meana<sup>a,c,d</sup>, Luis F. Callado<sup>a,c,d</sup>, Amaia M. Erdozain<sup>a,c,\*</sup><sup>a</sup> Department of Pharmacology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain<sup>b</sup> Basque Institute of Legal Medicine, Bilbao, Spain<sup>c</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain<sup>d</sup> Biocruces Health Research Institute, Barakaldo, Bizkaia, Spain

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Spinophilin  
Human brain  
Postmortem  
Western blot

## ABSTRACT

Spinophilin is a multifunctional scaffold protein that regulates the formation and function of dendritic spines and plays a role in neuronal migration. The distinct roles of spinophilin depend on its localization and the direct interaction with other proteins, which may target spinophilin to specific locations within the cell. Several studies suggest a role of spinophilin in the pathophysiology of neurological or psychiatric diseases. However, the majority have been performed in animals or cultured cells. Thus, the aim of the present study was to characterise the regional and subcellular expression of spinophilin immunoreactivity by western blot in postmortem human brain. Two specific immunoreactive bands for spinophilin were observed: an intense band migrating at around 120 kDa, which seems to correspond to the apparent molecular weight of spinophilin described by other authors, and a less intense band of around 95 kDa. This second form seems to be a proteolysis or cleavage product of the ~120 kDa spinophilin. Interestingly, the subcellular distribution of both bands was different. In membrane fraction, the ~120 kDa spinophilin band was the most abundant, whereas in cytosol it was the ~95 kDa form. Furthermore, a different regional distribution for ~120 kDa spinophilin band was observed, with the highest expression in prefrontal cortex, followed by hippocampus and cerebellum, and the lowest in caudate nucleus. Altogether, these results constitute a useful reference for future studies of spinophilin in pathological and non-pathological human brain tissues.

## 1. Introduction

Spinophilin, also called neurabin II, is a multifunctional scaffold protein, initially described as a direct binding partner of protein phosphatase 1 (PP1) (Allen et al., 1997) and F-actin (Satoh et al., 1998). Since, much more partner proteins of spinophilin have been discovered, including cytoskeletal and cell adhesion molecules, enzymes, membrane receptors, ion channels, guanine nucleotide exchange factors, regulator of G-protein signaling proteins and tumour suppressors (Sarrouilhe et al., 2006).

The functions of spinophilin have been mainly studied in the central nervous system, where it is highly enriched in dendritic spines (Allen et al., 1997; Muly et al., 2004; Ouimet et al., 2004; Satoh et al., 1998). Studies with spinophilin knock out mice have revealed that this protein regulates the formation and function of dendritic spines (Feng et al., 2000). It has been shown that it stabilises actin-based cytoskeleton in dendritic spines and filopodia (Satoh et al., 1998; Yan et al., 1999).

Spinophilin also regulates the activity of PP1, an enzyme implicated in postsynaptic signal integration, by targeting the enzyme in a close vicinity to its substrate and allowing its dephosphorylating activity (Sarrouilhe et al., 2006; Satoh et al., 1998; Yan et al., 1999). Among the substrates of PP1 are the enzyme calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (Yoshimura et al., 1999) and neurotransmitter receptors, such as the ionotropic AMPA glutamate channel (Yan et al., 1999). Spinophilin directly binds different membrane receptors for neurotransmitters too: dopaminergic D2 (Smith et al., 1999),  $\alpha$ -adrenergic (Richman et al., 2001; Wang et al., 2004; Wang and Limbird, 2002), opioid (Fourel et al., 2012) and glutamatergic metabotropic (Di Sebastiano et al., 2016) and ionotropic AMPA receptors (Yan et al., 1999). It seems that spinophilin acts as a scaffold protein that brings intracellular signaling proteins into close proximity of cell membrane receptors, and might serve as a link between synaptic transmission and changes in spine morphology and density. In addition, spinophilin has been proposed to play a role in neuronal migration, by its interaction

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Bizkaia, Spain.  
E-mail address: [amaia\\_erdzain@ehu.eus](mailto:amaia_erdzain@ehu.eus) (A.M. Erdozain).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.09.019>

Received 19 April 2017; Received in revised form 14 September 2017; Accepted 19 September 2017

Available online 21 September 2017

0278-5846/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

with doublecortin, a microtubule-associated protein required for this process (Tsukada et al., 2003).

The distinct roles of spinophilin depend on its localization and the direct interaction with other proteins, which may target spinophilin to specific locations within the cell. Spinophilin is present in brain regions such as prefrontal cortex, hippocampus, caudate/putamen and cerebellum (Ouimet et al., 2004). Immunolabeling studies have determined that it is highly expressed in dendritic spines and postsynaptic density enriched forms, but it can also be found in preterminal axons and glia (Muly et al., 2004; Ouimet et al., 2004).

It is of great interest to study the role of spinophilin in the pathophysiology of different neurological and psychiatric diseases. Several studies have focused on the implication of spinophilin in schizophrenia (Baracska et al., 2006; Clinton et al., 2005; Sweet et al., 2009), Alzheimer's (Akram et al., 2008; Palavicini et al., 2013) and Parkinson's diseases (Brown et al., 2008). However, the majority of the research studying the physiological or pathophysiological roles of spinophilin has been performed in animals or cultured cells. In this context, the use of postmortem human brain provides a unique opportunity to advance research in this area (McCullumsmith et al., 2014). In the present study, a characterisation of regional and subcellular expression of spinophilin immunoreactivity was performed by western blot assays in several postmortem human brain regions.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials

The rabbit anti-human spinophilin polyclonal antiserum (LS-C162085) and the corresponding spinophilin antibody blocking peptide (LS-E4298) were obtained from LifeSpan BioSciences. Mouse anti-human spinophilin monoclonal antiserum (sc-373974) was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Mouse anti- $\beta$ -actin monoclonal antiserum (A1978) was purchased from Sigma-Aldrich. All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, Panreac, MERCK, Bio-Rad, Carlo Erba reagents, National diagnostics and Quimipur.

### 2.2. Human samples

Human brain samples from subjects who died by sudden and violent causes were obtained at autopsy in the Basque Institute of Legal Medicine, Bilbao, Spain. All the subjects were determined to be free of psychiatric or neurological disorders based on medical histories and postmortem tissue examinations. Samples from the prefrontal cortex, caudate nucleus, hippocampus and cerebellum were dissected at the time of autopsy and immediately stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until assay. The postmortem delay (PMD) of the samples ranged from 4 to 48 h. For all the experiments, with the exception of the correlations with different variables, a pool preparation containing four different samples was used. The study was developed in compliance with legal policy and ethical review boards for postmortem brain studies.

### 2.3. Preparation of membranes

Samples were prepared as previously published (Erdozain et al., 2015) with minor modifications. The frozen samples were cut and cleaned of meninges and white matter to the best extent possible. White matter was pooled and treated as another sample. Each tissue sample (1 g) was homogenized with an ultraturrax in 5 ml of homogenization buffer (0.32 M sucrose in 5 mM Tris-HCl pH 7.4), supplemented with protease and phosphatase inhibitors (50  $\mu\text{l/g}$  of Sigma protease inhibitor Cocktail, 5 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and 10 mM NaF). In some degradation experiments, protease and phosphatase inhibitors were not added but when this is the case it is also mentioned in the Results section. The total homogenate was centrifuged 10 min ( $4^{\circ}\text{C}$ ) at  $1100 \times g$  (Sorvall RC-5C centrifuge, SM-24 rotor) to remove the nuclear fraction. The

supernatant was recentrifuged 10 min ( $4^{\circ}\text{C}$ ) at  $40000 \times g$  (Sorvall RC-5C centrifuge, SM-24 rotor). The new supernatant corresponded to the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in 5 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer (supplemented with the above mentioned protease and phosphatase inhibitors) and recentrifuged again. This procedure was repeated twice to obtain the final pellet of membrane-enriched fraction (P<sub>2</sub> fraction). That was resuspended in 1.2 ml of the same buffer with protease and phosphatase inhibitors. The HT, Cyt and P2 fractions were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until assay. Protein content was measured by the Bradford's method (Bradford, 1976).

### 2.4. Western blot

Western blot assays were performed as previously described (Erdozain et al., 2015), with minor modifications. For general experiments, samples were prepared in the electrophoresis buffer in reducing and denaturing conditions (100 mM DTT, 2% SDS, 8% glycerol, 0.01% bromophenol blue, and heated at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min). In some experiments, samples were not heated  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min (see Section 2.6) but when this is the case it is also mentioned in the Results section. Solubilized proteins (20  $\mu\text{g}$ , except for the protein-dependent curves) were resolved on 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes. After being blocked (5% non-fat dry milk in PBS with 1% Tween 20) for 1 h at room temperature, the membranes were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with constant agitation with the primary antibodies against: spinophilin (LifeSpan BioSciences LS-C162085, 1:1000; Santa Cruz sc-373974, 1:250) or  $\beta$ -actin (Sigma A1978, 1:50000). For specificity assays with the blocking peptide, the antibody was previously incubated with the blocking peptide (1:500) for 1 h at room temperature in the same blocking solution. Next morning, membranes were washed again with PBS and incubated for 90 min at room temperature with the fluorescent secondary antibodies (IRDye™ 800 or Alexa Fluor® 680 conjugated). The immunoreactive signal (integrated intensity values) was detected using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences) and quantified using Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Biosciences). For the quantification analysis the immunoreactivity values were normalized for  $\beta$ -actin signal.

### 2.5. Immunoprecipitation assay

Total homogenate lysate from postmortem human prefrontal cortex was prepared in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, supplemented with protease and phosphatase inhibitors as in Section 2.3). Immunoprecipitations were performed using either polyclonal rabbit anti-spinophilin (LifeSpan BioSciences, LS-C162085) or monoclonal mouse anti-spinophilin (Santa Cruz, sc-373974) antibodies. Lysates were precleared 3 h at  $4^{\circ}\text{C}$  with protein A/G agarose (Santa Cruz, sc-2003), then incubated with the appropriate antibody (5  $\mu\text{g}$  for 500  $\mu\text{g}$  of tissue) at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. Protein A/G agarose beads were added and samples were incubated for additional 3 h at  $4^{\circ}\text{C}$ , followed by three washes with lysis buffer. Elution was performed at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min in electrophoresis sample buffer (see Section 2.4) and samples were centrifuged to pellet the agarose beads. The supernatants were analysed by western blot.

### 2.6. Proteolysis study

For general proteolysis study, membrane-enriched fractions were prepared as previously explained in the presence or absence or any protease inhibitors, and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for a range of time (0–180 min). Then samples were prepared in the loading buffer (see Section 2.4) and heated at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min. For temperature-dependent proteolysis assay, samples were heated at different temperatures ( $4^{\circ}\text{C}$ – $95^{\circ}\text{C}$ ) for 15 min directly in the loading buffer, and were not heated anymore. To study the effect of freeze/thaw cycles, cortical membrane-enriched fractions were either subjected to five cycles of

freeze (20 min) and thaw ( $-80^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}$ ) or kept at  $4^{\circ}\text{C}$  all along. Samples were analysed by western blot.

### 2.7. Calcium-dependent cleavage assays

For calcium-dependent degradation study, samples were prepared as published elsewhere (Pariat et al., 1997) with minor modifications. Briefly, membrane-enriched fractions were incubated in the presence or absence of 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM EDTA or 1 mM EGTA at  $37^{\circ}\text{C}$  for 5, 30 or 60 min. Samples were analysed by western blot.

### 2.8. Dephosphorylation assays

Membrane-enriched fractions were treated with two phosphatases separately, Lambda (Santa Cruz, sc-200312) and Fast Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific, EF0654), following manufacturers recommendations. Briefly, samples were incubated in the appropriate reaction buffer in the presence or absence of the enzyme for 1 h at  $30^{\circ}\text{C}$  or  $37^{\circ}\text{C}$ , respectively. The reaction was stopped by addition of a final concentration of 50 mM EDTA and by heating the samples for 1 h at  $65^{\circ}\text{C}$  or 5 min at  $75^{\circ}\text{C}$ , respectively. Samples were analysed by western blot.

### 2.9. Data analysis

The analyses were carried out with GraphPad Prism 5\* and results expressed as means  $\pm$  SEM (standard error of the mean). The statistical comparison between means in the time-dependent and temperature-dependent degradation studies was made by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett *post hoc* test. Other comparisons of the means with the control were performed by two-tailed Student's *t*-test. The effects of age, PMD and storage time in the study, as well as the concentration-dependent immunoreactivity were analysed by two tailed Pearson's correlation test. In all cases *p* values  $< 0.05$  were considered as being statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Specificity of the spinophilin immunoreactivity

Initially, a rabbit polyclonal anti-human spinophilin antiserum (raised against amino acids 24–53 in the N-terminal of the protein) was employed in membrane preparations obtained from the human prefrontal cortex. When SDS-PAGE was performed under denaturing and reducing conditions, two immunoreactive bands were observed (Fig. 1A): an intense band migrating at around 120 kDa, which seems to correspond to the apparent molecular weight of spinophilin described by other authors (Allen et al., 1997; Satoh et al., 1998), as well as a lower molecular weight and less intense band of around 95 kDa. In order to verify the specificity of these bands, the blocking peptide of this antiserum was used and the immunoreactive signal of both bands disappeared (Fig. 1A). We confirmed that the intensity of the two bands increased in a protein-dependent manner (Fig. 1B–C). A different antiserum (a mouse monoclonal antibody raised against amino acids 261–430 within an internal region human spinophilin) was employed in the same membrane preparations from human prefrontal cortex, and the same two immunoreactive bands were detected, which again increased in a protein-dependent manner (Fig. 1D). These results suggested that both bands correspond to at least a portion of spinophilin. At last, immunoprecipitation assays were carried out to further validate that both bands are truly spinophilin. The two different antibodies mentioned above were used in assays. A subsequent immunoblotting showed that both bands ( $\sim 95$  and  $\sim 120$  kDa) were present after immunoprecipitating spinophilin with either the rabbit polyclonal or the mouse monoclonal antibody (Fig. 1E). This confirmed that both forms associate endogenously with the spinophilin antibodies. However, in

contrast to the input fraction, in the immunoprecipitation fraction the lower band was stronger than the upper band. The explanation for this could be that the epitope recognized by the antibody is more available in the lower band in non-denaturing and non-reducing conditions. Alternatively, this smaller form could be a product of proteolysis of the  $\sim 120$  kDa band, which could be increased with the long incubation times in immunoprecipitation assays.

### 3.2. Proteolysis, calcium-dependent cleavage and dephosphorylation experiments

Different experiments were performed to try to elucidate the nature of both spinophilin bands. In order to determine if the  $\sim 95$  kDa band derived from the  $\sim 120$  kDa band via proteolytic degradation, we incubated the membrane samples at  $37^{\circ}\text{C}$  in the presence or absence of protease inhibitors for a range of times. After incubation samples were denatured at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min and immediately processed in SDS-PAGE and immunoblot analysis. A slight time-dependent decrease was observed in the  $\sim 120$  kDa band with a concomitant increase in the  $\sim 95$  kDa band (Fig. 2A). The ratio between the immunoreactivity of the  $\sim 120$  kDa/ $\sim 95$  kDa bands was significantly reduced after incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  during 90 min or longer (Fig. 2B). This indicates that the  $\sim 120$  kDa form can undergo proteolysis at physiological temperature giving rise to the smaller  $\sim 95$  kDa.

In addition, we tested heating the samples at different temperatures for 15 min. In this case, samples were not further heated  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min prior to SDS-PAGE, in order to better analyse the effect of each treatment. Interestingly, when samples are not denatured or heated at low-medium temperatures ( $50^{\circ}\text{C}$  and underneath), a new strong immunoreactive band comes out a little bit above the  $\sim 95$  kDa band (Fig. 2C). This new band disappears when samples are heated at higher temperatures. It might correspond to some complexes of spinophilin with other proteins. Indeed, at the same molecular weight a new immunoreactive band for actin comes up (Fig. 2C), indicating that this signal could correspond to a complex between spinophilin and its already well known binding partner actin. In regard to the  $\sim 95$  and  $\sim 120$  kDa bands profile, it was interesting to find that heating the samples at high temperatures ( $80$  and  $95^{\circ}\text{C}$ ) for 15 min without protease inhibitors, produced a significant shift from the higher to the lower band (Fig. 2C–D). Furthermore, the influence of freeze/thaw cycles was also studied. Samples were either subjected to five cycles of freeze ( $-80^{\circ}\text{C}$  for 20 min) and thaw, or kept at  $4^{\circ}\text{C}$  all along, before denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min. As shown in Fig. 2E–F, freezing and thawing the samples produced a striking decrease in the  $\sim 120$  kDa band with a concomitant increase in the  $\sim 95$  kDa band. Thus, the  $\sim 95$  kDa band derives from the  $\sim 120$  kDa band, but it is present at physiological conditions in human brain, since we can observe it in samples that were kept all the time at  $4^{\circ}\text{C}$  (Fig. 2C, E). In any case this proteolysis process can be activated with the processing of the sample.

We performed addition experiments in order to gain insight into the mechanism of this proteolysis or degradation. Many proteins have been identified as substrates for calpains, calcium-dependent neutral proteases which cleave cytosolic, membrane or cytoskeleton-associated proteins (Liu et al., 2008). Thus, we tested whether the spinophilin  $\sim 95$  kDa band would be a calcium-dependent cleavage product of the  $\sim 120$  kDa band. Membrane-enriched preparation of the prefrontal cortex were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in the presence of EDTA or EGTA (1 mM) or calcium (2.5 mM), either for 5, 30 or 60 min. None of the treatments produced any significant change in the ratio between the two bands, suggesting that the small  $\sim 95$  kDa band is not a calcium-dependent cleavage product of the  $\sim 120$  kDa one (Fig. 2G–H).

It is well known that spinophilin is phosphorylated at different residues by multiple kinases (Hsieh-Wilson et al., 2003; Grossman et al., 2004; Futter et al., 2005). While this post-translational modification rarely causes such an extreme shift in the molecular weight, it could be regulating the proteolysis of spinophilin and/or the SDS binding to the

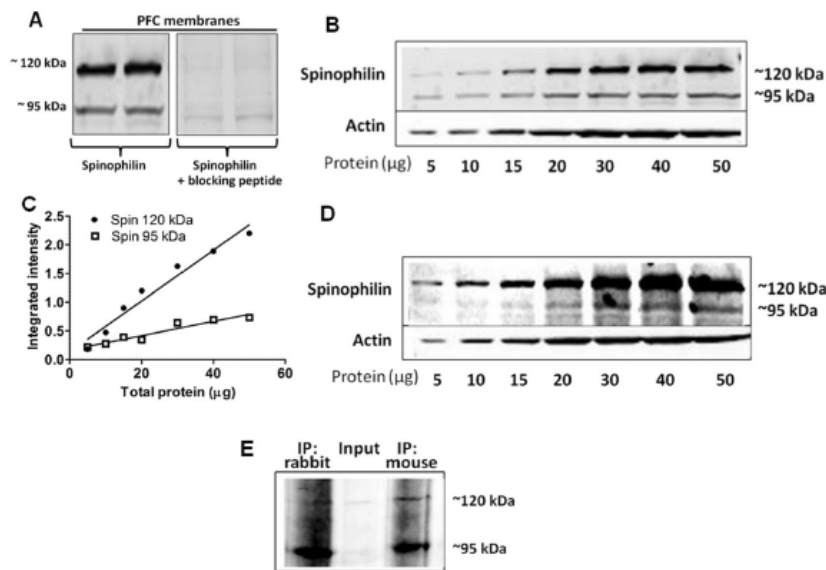


Fig. 1. A) Spinophilin immunoreactivity using a rabbit polyclonal anti-human spinophilin antiserum in membrane preparations from human prefrontal cortex, in the presence and absence of its blocking peptide. B) Protein-dependent curves of spinophilin immunoreactivity in crude membranes of human prefrontal cortex (5–50 µg) with the rabbit polyclonal antiserum and C) linear regression analysis between total protein content and the immunoreactivity of the ~120 and ~95 kDa bands observed with this antibody. D) Protein-dependent curves of spinophilin immunoreactivity in the same samples with a mouse monoclonal anti-human spinophilin antiserum. E) Immunoblotting of spinophilin (with the rabbit polyclonal antiserum) after immunoprecipitating the protein with the rabbit polyclonal or the mouse monoclonal antibody in a total homogenate of human prefrontal cortex. The input loaded in the gel corresponds to 1:20 fraction of the tissue used in the assays. All experiments were performed with a pool preparation two or three times; a representative image of each is shown in the figure. Molecular weights are shown on the figure.

protein. Hence, we performed dephosphorylation assays to determine if the migration pattern of the two bands was altered. Lysates were treated with two phosphatases separately, Lambda and Alkaline Phosphatase, which display different specificities towards tyrosine, serine and threonine residues. The first observation was that the ~95 kDa band showed a similar intensity as the ~120 kDa band after the dephosphorylation assays, regardless the presence or absence of the phosphatase itself (Fig. 2I). This might be the effect of common procedures of the assays: the incubation at medium temperatures for a sustained time and/or the assay buffers. In any case, the treatment with both phosphatases seemed to produce a slight further decrease in the ~120 kDa band, but the difference in the ratio of intensities did not reach significance (Fig. 2J).

3.3. Effect of age, PMD and storage time on spinophilin immunoreactivity

The hypothetical influence of age at death, the postmortem delay (PMD) and the storage time on the ~95 kDa and ~120 kDa band densities was analysed in 24 control samples. Neither age (30–60 years), PMD (4–48 h) nor storage time (4–22 years) correlated with the immunoreactivity of any of the two detected bands (Fig. 3A–F).

3.4. Subcellular and regional distribution of spinophilin in the human brain

The immunoreactivity of spinophilin ~95 and ~120 kDa bands was determined in different subcellular fractions: total homogenates, cytosol and P<sub>2</sub> membrane-enriched fractions. Interestingly, the relative amounts of both bands were different in each sample fraction (Fig. 4A–B). The ~120 kDa spinophilin band was enriched in the plasma membranes, where it was much stronger than the ~95 kDa band. On the other hand, in the cytosol there was less spinophilin expression overall and the most abundant form was the ~95 kDa band. This shows that these two spinophilin forms have a different subcellular localization, and suggests that they would have a different cellular role, stability or degradation pathways.

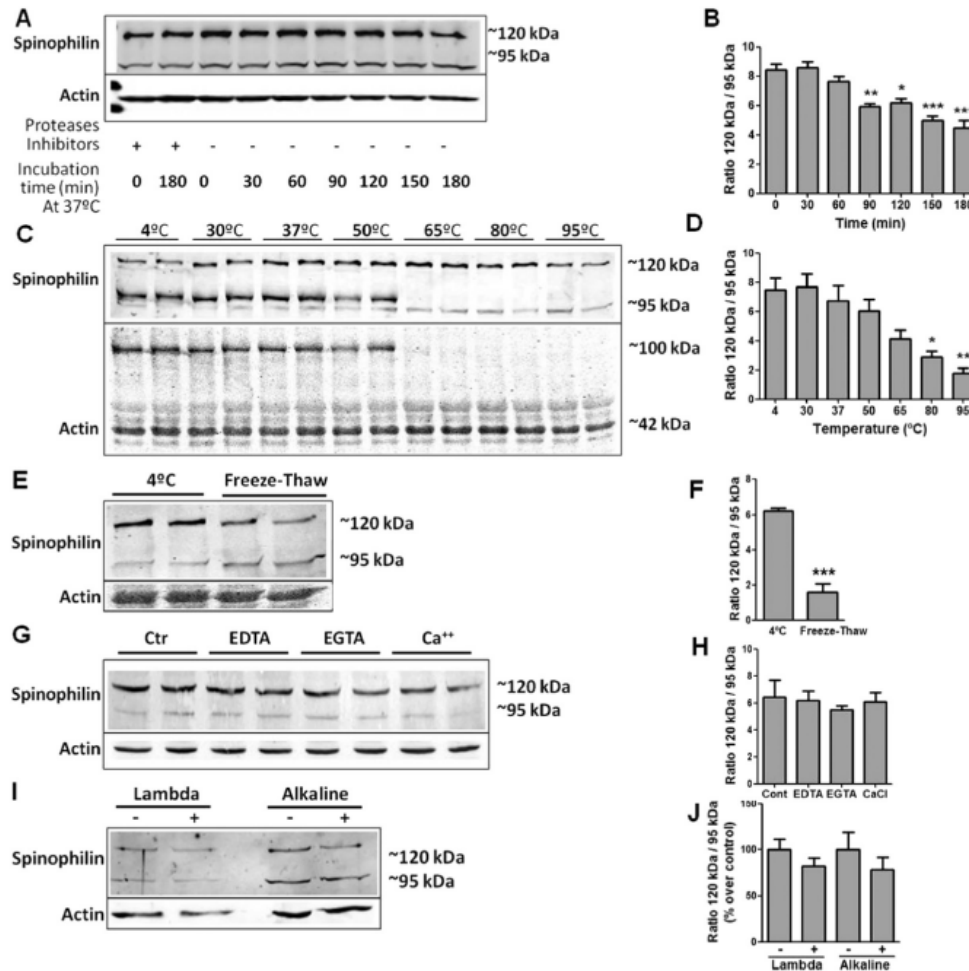
Finally, we measured spinophilin immunoreactivity in membrane-enriched fractions of human prefrontal cortex, caudate nucleus, hippocampus, cerebellum and white matter. Significant differences in spinophilin expression were observed between the different anatomical brain areas (Fig. 4C–D). Thus, the greatest expression of ~120 kDa

band was found in the prefrontal cortex, followed by the hippocampus and cerebellum, then caudate nucleus. The immunoreactivity of the ~95 kDa band was in all the regions lower than the ~120 kDa one, but showed similar expression levels in the different regions. The expression of both bands was very low in the white matter (Fig. 4C–D).

4. Discussion

Previous studies have characterized the brain expression of spinophilin in rodents and primates (Allen et al., 1997; Muly et al., 2004; Ouimet et al., 2004) and have suggested a role for spinophilin in different psychiatric and neurological diseases (Brown et al., 2008; Palavicini et al., 2013; Sweet et al., 2009). In the present study we provide a characterisation of regional and subcellular expression of spinophilin immunoreactivity by western blot in postmortem human brain, which will be useful for future studies in this kind of tissue. In human brain two immunoreactive bands for spinophilin of ~120 and ~95 kDa were observed. These two forms are differently expressed in cytosolic and membranous preparations. Furthermore, we described a regional difference for spinophilin, with the highest expression being observed in the prefrontal cortex.

The intense band migrating at around 120 kDa seems to correspond to the apparent molecular weight of spinophilin described by other authors in rat brain, which was reported at 130 or 140 kDa (Allen et al., 1997; Satoh et al., 1998; Hu et al., 2015). The rat and human proteins have 817 amino acids, and thus, a predicted relative molecular weight of around 89.5 kDa. However, in all the previous studies native spinophilin migrated at a much higher apparent molecular weight on SDS-PAGE, 130 or 140 kDa (Allen et al., 1997; Satoh et al., 1998). It was also confirmed that when the recombinant protein was expressed in cultured cells it showed a similar mobility (Satoh et al., 1998). Even bacterially-expressed spinophilin fragments migrate slower on SDS-PAGE (Hu et al., 2015). The reason for the remarkable difference between the predicted and the observed molecular weight is not well known. This may be due to an extended conformation and/or low SDS binding capacity (Allen et al., 1997). Database searching and the use of an algorithm predicted that the carboxyl terminus of spinophilin forms a solvent-exposed left-handed coiled-coil, which may be important for the “scaffolding” function of spinophilin within the spine cytomatrix, and is likely to contribute to the relative insolubility of the protein (Allen et al., 1997). In addition, in the spinophilin sequence there is a



**Fig. 2.** A) Spinophilin immunoreactivity in human prefrontal cortical membranes after incubation under proteolytic and non-proteolytic conditions. Samples (20  $\mu$ g) were incubated with or without protease inhibitors for a duration of between 0 and 180 min at 37  $^{\circ}$ C. B) Quantification of the ratio between  $\sim$ 120 and  $\sim$ 95 kDa bands intensities in the same samples as (A) under proteolytic conditions. C) Spinophilin immunoreactivity in human prefrontal cortical membranes after incubation at different temperatures for 15 min without protease inhibitors and D) quantification of the ratio between  $\sim$ 120 and  $\sim$ 95 kDa bands intensities in these samples. E) Spinophilin immunoreactivity in human prefrontal cortical membranes after none (4  $^{\circ}$ C) or five cycles of freeze and thaw ( $-80^{\circ}$ C/4  $^{\circ}$ C) and F) quantification of the ratio between  $\sim$ 120 and  $\sim$ 95 kDa bands intensities in these samples. G) Spinophilin immunoreactivity in human prefrontal cortical membranes after incubation in the presence of EDTA or EGTA (1 mM) or calcium (2.5 mM) at 37  $^{\circ}$ C for 60 min and H) quantification of the ratio between  $\sim$ 120 and  $\sim$ 95 kDa bands intensities in these samples. I) Spinophilin immunoreactivity in human prefrontal cortical membranes after treatment with Lambda (20 U for 100  $\mu$ g of tissue) or Alkaline Phosphatase (500 U for 100  $\mu$ g of tissue) for 3 h at 30  $^{\circ}$ C and 37  $^{\circ}$ C respectively and J) quantification of the ratio between  $\sim$ 120 and  $\sim$ 95 kDa bands intensities in these samples. Western blot experiments were performed using a rabbit polyclonal anti-human spinophilin antiserum. All experiments were performed with a pool preparation at least three times; a representative image of each is shown in the figure. Data were analysed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett *post hoc* test in A-B and by a two-tailed Student's *t*-test vs controls in C-D. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001.

stretch of poly-prolines from amino acids 251–259 and eleven acidic amino acids between 409 and 420. This could dramatically affect the way spinophilin migrates in the gel and how SDS binds to the protein, and is most likely the reason for the migration shift.

In this study we also show a lower molecular weight band with less intensity at around 95 kDa. We observe the same profile, a second less intense band migrating at  $\sim$ 95 kDa, in spinophilin blots published previously by other authors and using different antibodies (Allen et al., 1997; Satoh et al., 1998). However, as far as we know, authors do not comment on it. This second form seems to be a proteolysis product of the  $\sim$ 120 kDa spinophilin, since incubation for long times at 37  $^{\circ}$ C, incubations at higher temperatures, and numerous freeze/thaw cycles produce a significant shift in the intensity of the bands. Thus, this smaller  $\sim$ 95 kDa form might be a physiological proteolysis product of spinophilin, and at the same time, this proteolytic process could be augmented by the processing of the samples. Yet, the physiological role

of this  $\sim$ 95 kDa form of spinophilin remains to be elucidated. Interestingly, the subcellular distribution of both bands is different. In plasma membrane fraction the  $\sim$ 120 kDa spinophilin band was the most abundant, whereas in the cytosol it was the  $\sim$ 95 kDa form. This difference in the subcellular localization might indicate that they have a different cellular role, stability or degradation pathways. Spinophilin has previously been reported to be present in both particulate and soluble brain fractions (Allen et al., 1997). Morphological studies established that spinophilin is enriched at plasma membrane of cells although the protein also is expressed widely throughout the cytoplasm (Richman et al., 2001; Smith et al., 1999; Tsukada et al., 2003). Using immuno-labelling approaches in adult macaque brain, spinophilin was found predominantly in dendritic spines, but not homogeneously distributed within them. Two “nanodomains” were revealed within spines: one, consisting of the postsynaptic density and the subjacent 100 nm of spinoplasm, contains the highest density of label; the other, consisting

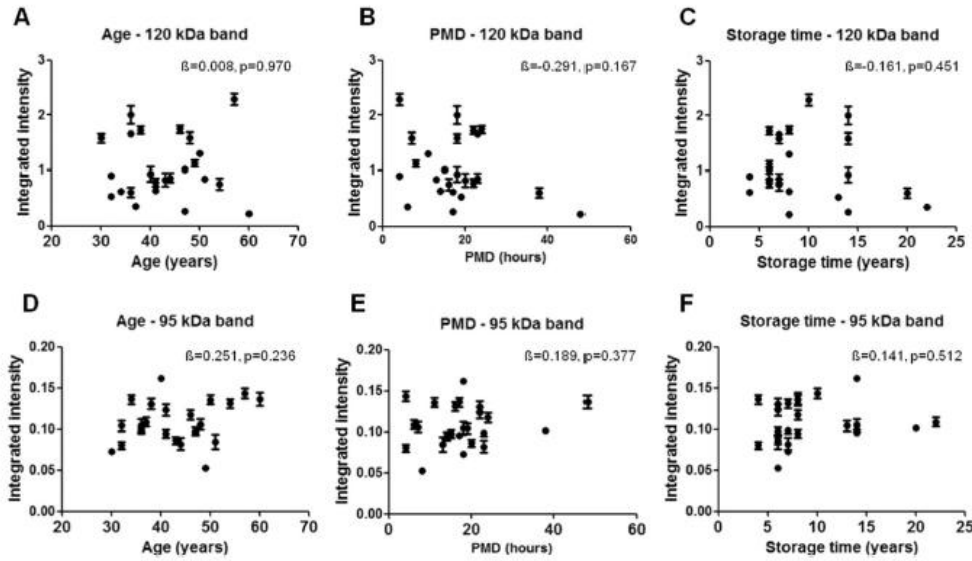


Fig. 3. Age (A), postmortem delay (B) and storage time (C) correlation with the immunoreactivity of the ~120 kDa band in membrane preparations obtained from human prefrontal cortex of 24 control subjects. Age (D), postmortem delay (E) and storage time (F) correlation with the ~95 kDa immunoreactive band obtained from the same samples. Western blot experiments were performed using a rabbit polyclonal anti-human spinophilin antiserum. Each sample of the different 24 subjects was run three times. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of integrated intensity. No statistically significant linear correlations were observed.  $\beta$  corresponds to the regression slope.

of the deeper region of the spine, contains a lower density of spinophilin (Allen et al., 1997). Several authors suggest that differential phosphorylation/dephosphorylation of the different sites may target spinophilin to specific locations within the cell, regulating the assembly with other proteins and stability of these interactions (Futter et al., 2005; Grossman et al., 2004; Hsieh-Wilson et al., 2003; Muly et al., 2004; Satoh et al., 1998). Thus, phosphorylation might also regulate the proteolysis of ~120 kDa spinophilin giving rise to the 95 kDa form. We tried to study this hypothesis by treating our samples with two different phosphatases, Lambda and Alkaline Phosphatase. We observed a trend to a decrease in the ~120 kDa band and an increase in the ~95 kDa band, but the difference in the ratio of intensities did not reach statistical significance. However, we cannot entirely rule out this possibility,

since we might have not determined the right conditions to observe it (enzyme concentration, incubation time, etc).

Spinophilin density was also different among the anatomical brain regions here studied. The greatest expression of ~120 kDa spinophilin in membrane-enriched fractions was found in the prefrontal cortex, followed by the hippocampus, cerebellum and caudate nucleus. The expression was very low in the white matter. These results reveal important differences in the expression patterns of this protein with respect to those described in other mammals. A previous western blot study reported that the highest levels in rat brain were detected in the hippocampus, and the lowest in cortex, cerebellum, and particularly brainstem (Allen et al., 1997). A further anatomical study in rat brain observed that the hippocampus, caudate/putamen, and cerebral cortex

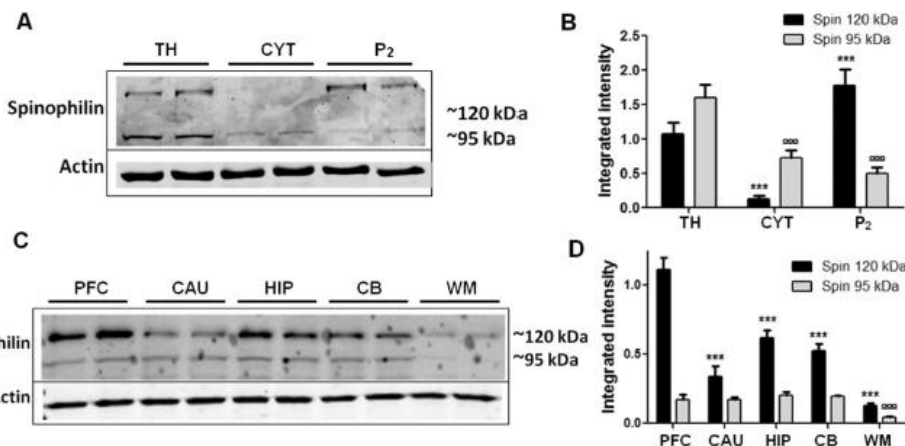


Fig. 4. A) Spinophilin immunoreactivity in different cellular preparations obtained from the human prefrontal cortex (total homogenate -TH-, cytosol -Cyt- and membrane-enriched P<sub>2</sub> fraction) and B) quantification of the immunoreactivity of the ~120 and ~95 kDa bands in these samples. C) Spinophilin immunoreactivity in membrane-enriched preparations from human prefrontal cortex (PFC), caudate nucleus (CAU), hippocampus (HIP), cerebellum (CB) and white matter (WM) and D) quantification of the immunoreactivity of the ~120 and ~95 kDa bands in these samples. Differences between regions, which were run-yoked on the same assay, were analysed by a paired two-tailed Student's t-test. \*\*\* and  $\Omega$   $p < 0.001$  vs PFC values for the ~120 and ~95 kDa bands respectively. Western blot experiments were performed using a rabbit polyclonal anti-human spinophilin antiserum. Experiments were performed with a pool preparation three times; a representative image of each is shown in the figure. Values represented by the bars are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.



were strongly immunoreactive for spinophilin, whereas the cerebellum and dentate gyrus were relatively less immunoreactive (Ouimet et al., 2004). In mouse brain, western blot of total spinophilin levels were significantly lower in striatal compared to hippocampus lysates (Baucum et al., 2013), which agrees with our observation in human brain. Other authors found spinophilin enriched in the great majority of dendritic spines in cerebral cortex, caudate/putamen, hippocampal formation, and cerebellum, irrespective of regional differences in spinophilin concentration (Ouimet et al., 2004). Even if these studies and ours agree with a ubiquitous brain expression of spinophilin, the main difference is that in human brain the highest levels are observed in the prefrontal cortex. This interspecies difference in the regional distribution has already been observed for many proteins, and might be related to a different role in the brain connections and processes. The fact that we observed some immunoreactivity in the white matter is not surprising. In anatomical studies spinophilin immunoreactivity was observed in glial processes and preterminal axons, suggesting that spinophilin's role in cellular processes is not exclusive to postsynaptic functions (Muly et al., 2004).

## 5. Conclusion

In conclusion, the present study constitutes the first report characterizing the subcellular and regional expression of spinophilin in non-pathological human postmortem brain by western blot. Our data reveal that there are two forms of spinophilin with a different mobility on SDS-PAGE, which are differently expressed in cytosolic or membrane fractions. In addition, we revealed important differences in the anatomical profile of this protein with respect to those observed previously in other mammals. These results will constitute a useful reference in future studies of spinophilin in pathological and non-pathological human brain tissues.

## Funding

This work was supported by grants from the Spanish MINECO (SAF2013-48586-R) and the Basque Government (IT616/13). AME was recipient of a postdoctoral fellowship from the Basque Government. The collaboration of the staff members of the Basque Institute of Legal Medicine is acknowledged.

## References

Akram, A., Christoffel, D., Rocher, A.B., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Herrmann, F.R., Haroutunian, V., Giannakopoulos, P., Hof, P.R., 2008. Stereologic estimates of total spinophilin-immunoreactive spine number in area 9 and the CA1 field: relationship with the progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 29, 1296–1307.

Allen, P.B., Ouimet, C.C., Greengard, P., 1997. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9956–9961.

Baracska, K.L., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J.H., 2006. Dopamine receptor signaling molecules are altered in elderly schizophrenic cortex. *Synapse* 60, 271–279.

Baucum, A.J., Brown, A.M., Colbran, R.J., 2013. Differential association of postsynaptic signaling protein complexes in striatum and hippocampus. *J. Neurochem.* 124, 490–501.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Brown, A.M., Baucum, A.J., Bass, M.A., Colbran, R.J., 2008. Association of protein phosphatase 1 gamma 1 with spinophilin suppresses phosphatase activity in a Parkinson disease model. *J. Biol. Chem.* 283, 14286–14294.

Clinton, S.M., Ibrahim, H.M., Frey, K.A., Davis, K.L., Haroutunian, V., Meador-Woodruff,

J.H., 2005. Dopaminergic abnormalities in select thalamic nuclei in schizophrenia: involvement of the intracellular signal integrating proteins calycon and spinophilin. *Am. J. Psychiatry* 162, 1859–1871.

Di Sebastiano, A.R., Fahim, S., Dunn, H.A., Walther, C., Ribeiro, F.M., Cregan, S.P., Angers, S., Schmid, S., Ferguson, S.S.G., 2016. Role of spinophilin in group I metabotropic glutamate receptor endocytosis, signaling, and synaptic plasticity. *J. Biol. Chem.* 291, 17602–17615.

Erdozain, A.M., Rubio, M., Valdizan, E.M., Pazos, A., Meana, J.J., Fernández-Ruiz, J., Alexander, S.P.H., Callado, I.F., 2015. The endocannabinoid system is altered in the post-mortem prefrontal cortex of alcoholic subjects. *Addict. Biol.* 20, 773–783.

Feng, J., Yan, Z., Ferreira, A., Tomizawa, K., Liauw, J.A., Zhuo, M., Allen, P.B., Ouimet, C.C., Greengard, P., 2000. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9287–9292.

Fourla, D.-D., Papakonstantinou, M.-P., Vrana, S.-M., Georgousi, Z., 2012. Selective interactions of spinophilin with the C-terminal domains of the  $\delta$ - and  $\mu$ -opioid receptors and G proteins differentially modulate opioid receptor signaling. *Cell. Signal.* 24, 2315–2328.

Futter, M., Uematsu, K., Bullock, S.A., Kim, Y., Hemmings, H.C., Nishi, A., Greengard, P., Nairn, A.C., 2005. Phosphorylation of spinophilin by ERK and cyclin-dependent PK 5 (Cdk5). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3489–3494.

Grossman, S.D., Futter, M., Snyder, G.L., Allen, P.B., Nairn, A.C., Greengard, P., Hsieh-Wilson, L.C., 2004. Spinophilin is phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II resulting in regulation of its binding to F-actin. *J. Neurochem.* 90, 317–324.

Hsieh-Wilson, L.C., Benfenati, F., Snyder, G.L., Allen, P.B., Nairn, A.C., Greengard, P., 2003. Phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 278, 1186–1194.

Hu, X.-D., Liu, Y.-N., Zhang, Z.-Y., Ma, Z.-A., Suo, Z.-W., Yang, X., 2015. Spinophilin-targeted protein phosphatase-1 alleviated inflammatory pain by negative control of MEK/ERK signaling in spinal cord dorsal horn of rats. *J. Neurosci.* 35, 13989–14001.

Liu, J., Liu, M.C., Wang, K.K.W., 2008. Calpain in the CNS: from synaptic function to neurotoxicity. *Sci. Signal.* 1 (rel).

McCullumsmith, R.E., Hammond, J.H., Shan, D., Meador-Woodruff, J.H., 2014. Postmortem brain: an underutilized substrate for studying severe mental illness. *Neuropsychopharmacology* 39, 65–87.

Muly, E.C., Smith, Y., Allen, P., Greengard, P., 2004. Subcellular distribution of spinophilin immunolabeling in primate prefrontal cortex: localization to and within dendritic spines. *J. Comp. Neurol.* 469, 185–197.

Ouimet, C.C., Katona, I., Allen, P., Freund, T.F., Greengard, P., 2004. Cellular and subcellular distribution of spinophilin, a PP1 regulatory protein that bundles F-actin in dendritic spines. *J. Comp. Neurol.* 479, 374–388.

Palavicini, J.P., Wang, H., Bianchi, E., Xu, S., Rao, J.S., Kang, D.E., Lakshmana, M.K., 2013. RanBP9 aggravates synaptic damage in the mouse brain and is inversely correlated to spinophilin levels in Alzheimer's brain synaptosomes. *Cell Death Dis.* 4, e667.

Pariat, M., Carillo, S., Molinari, M., Salvat, C., Debussche, L., Bracco, L., Milner, J., Piechaczyk, M., 1997. Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2806–2815.

Richman, J.G., Brady, A.E., Wang, Q., Hensel, J.L., Colbran, R.J., Limbird, L.E., 2001. Agonist-regulated interaction between alpha2-adrenergic receptors and spinophilin. *J. Biol. Chem.* 276, 15003–15008.

Sarrouilhe, D., di Tommaso, A., Métayé, T., Ladeveze, V., 2006. Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie* 88, 1099–1113.

Satoh, A., Nakamishi, H., Obaishi, H., Wada, M., Takahashi, K., Satoh, K., Hira, K., Nishioka, H., Hata, Y., Mizoguchi, A., Takai, Y., 1998. Neurabin-II/spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J. Biol. Chem.* 273, 3470–3475.

Smith, F.D., Oxford, G.S., Milgram, S.L., 1999. Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein. *J. Biol. Chem.* 274, 19894–19900.

Sweet, R.A., Henteleff, R.A., Zhang, W., Sampson, A.R., Lewis, D.A., 2009. Reduced dendritic spine density in auditory cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34, 374–389.

Tsukada, M., Prokscha, A., Oldekamp, J., Eichele, G., 2003. Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mech. Dev.* 120, 1033–1043.

Wang, Q., Limbird, L.E., 2002. Regulated interactions of the alpha 2A adrenergic receptor with spinophilin, 14-3-3zeta, and arrestin 3. *J. Biol. Chem.* 277, 50589–50596.

Wang, Q., Zhao, J., Brady, A.E., Feng, J., Allen, P.B., Lefkowitz, R.J., Greengard, P., Limbird, L.E., 2004. Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors. *Science* 304, 1940–1944.

Yan, Z., Hsieh-Wilson, L., Feng, J., Tomizawa, K., Allen, P.B., Fienberg, A.A., Nairn, A.C., Greengard, P., 1999. Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat. Neurosci.* 2, 13–17.

Yoshimura, Y., Sogawa, Y., Yamauchi, T., 1999. Protein phosphatase 1 is involved in the dissociation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II from postsynaptic densities. *FEBS Lett.* 446, 239–242.



## **ARTÍCULO 5**

### **Spinophilin expression in postmortem prefrontal cortex of schizophrenic subjects: Effects of antipsychotic treatment**

Iria Brocos-Mosquera, Ane M. Gabilondo, J. Javier Meana,  
Luis F. Callado and Amaia M. Erdozain

European Neuropsychopharmacology (2021) 42, 12–21

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.11.011>



## **ARTÍCULO 5**

En la esquizofrenia existe una disfunción sináptica y alteraciones en diferentes sistemas de neurotransmisión. La espinofilina es una proteína localizada principalmente en las espinas dendríticas, y cuyas funciones se relacionan con la plasticidad sináptica o la densidad y morfología de las propias espinas dendríticas. Por esta razón se la ha relacionado con enfermedades neurológicas o patologías psiquiátricas como la esquizofrenia. Además, la espinofilina tiene la capacidad de unirse a diferentes receptores, como pueden ser los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, que están directamente implicados en esta patología y son una de las principales dianas del tratamiento antipsicótico. El objetivo principal de este estudio fue determinar la expresión proteica de espinofilina en la corteza prefrontal dorsolateral (CPFDL) humana *postmortem* de sujetos con esquizofrenia y observar si el tratamiento antipsicótico modifica dicha expresión. En este estudio se incluyeron 24 sujetos con esquizofrenia (12 con antipsicóticos en sangre en el momento de la muerte y 12 sujetos sin antipsicóticos en sangre) y 24 controles (sin patología psiquiátrica *antemortem*). Estos sujetos fueron emparejados por sexo, edad, intervalo *postmortem* y tiempo de almacenamiento. Este emparejamiento se realizó para evitar una posible alteración de la expresión proteica por estas variables demográficas. La expresión proteica de las dos bandas específicas de espinofilina se determinó gracias a la técnica de Western Blot. Este estudio se realizó en dos fracciones subcelulares diferentes, una enriquecida en sinaptosomas (SPM) y otra enriquecida en membranas postsinápticas (PSD). Los resultados obtenidos mostraron, que tanto en SPM como en PSD, la expresión de la banda superior de espinofilina no presenta ningún cambio significativo entre sujetos con esquizofrenia y sus controles, ni está alterada por la acción de los fármacos antipsicóticos. Sin embargo, al estudiar la expresión de la banda inferior de espinofilina se observó una disminución significativa en los sujetos con esquizofrenia frente a sus controles en ambas fracciones. Además al separar los sujetos con esquizofrenia en función de la presencia o ausencia de antipsicóticos en sangre, se vio que la disminución significativa, tanto en SPM como en PSD, correspondía a los sujetos con antipsicóticos en sangre. Estos resultados nos sugieren que los fármacos antipsicóticos pueden alterar la expresión proteica de una de las isoformas de espinofilina en la CPFDL humana de sujetos con esquizofrenia.





# Spinophilin expression in postmortem prefrontal cortex of schizophrenic subjects: Effects of antipsychotic treatment



Iria Brocos-Mosquera<sup>a,b</sup>, Ane M. Gabilondo<sup>a,b,c</sup>,  
J. Javier Meana<sup>a,b,c</sup>, Luis F. Callado<sup>a,b,c</sup>, Amaia M. Erdozain<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Spain

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

<sup>c</sup> Biocruces Bizkaia Health Research Institute, Barakaldo, Bizkaia, Spain

Received 15 April 2020; received in revised form 4 November 2020; accepted 11 November 2020

## KEYWORDS

Spinophilin;  
Schizophrenia;  
Antipsychotics;  
Prefrontal cortex;  
Human brain;  
Postmortem

## Abstract

Schizophrenia has been associated with alterations in neurotransmission and synaptic dysfunction. Spinophilin is a multifunctional scaffold protein that modulates excitatory synaptic transmission and dendritic spine morphology. Spinophilin can also directly interact with and regulate several receptors for neurotransmitters, such as dopamine D<sub>2</sub> receptors, which play a role in the pathophysiology of schizophrenia and are targets of antipsychotics. Several studies have thus suggested an implication of spinophilin in schizophrenia. In the present study spinophilin protein expression was determined by western blot in the postmortem dorsolateral prefrontal cortex of 24 subjects with schizophrenia (12 antipsychotic-free and 12 antipsychotic-treated subjects) and 24 matched controls. Experiments were performed in synaptosomal membranes (SPM) and in postsynaptic density fractions (PSD). As previously reported, two specific bands for this protein were observed: an upper 120–130 kDa band and a lower 80–95 kDa band. The spinophilin lower band showed a significant decrease in schizophrenia subjects compared to matched controls, both in SPM and PSD fractions (-15%,  $p = 0.007$  and -15%,  $p = 0.039$ , respectively). When schizophrenia subjects were divided by the presence or absence of

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Bizkaia, Spain.

E-mail address: [amaia\\_erdozain@ehu.eus](mailto:amaia_erdozain@ehu.eus) (A.M. Erdozain).

<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.11.011>

0924-977X/© 2020 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

antipsychotics in blood at death, the lower band showed a significant decrease in antipsychotic-treated schizophrenia subjects (-24%,  $p = 0.003$  for SPM and -26%,  $p = 0.014$  for PSD), but not in antipsychotic-free subjects, compared to their matched controls. These results suggest that antipsychotics could produce alterations in spinophilin expression that do not seem to be related to schizophrenia per se. These changes may underlie some of the side effects of antipsychotics. © 2020 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

## 1. Introduction

Schizophrenia is a chronic mental disorder, significantly contributing to the global disease burden (Jongsma et al., 2018). Its clinical features include impairments in perception (positive symptoms), cognition (cognitive deficits) and motivation (negative symptoms) (van Os and Kapur, 2009). At present, it is believed that schizophrenia may result from gene/environment interactions that affect the normal development of the brain (McCutcheon et al., 2019). Since the precise genetic factors and the biological basis remain unknown, different hypotheses have been postulated focusing on alterations in several neurotransmitters, synaptic dysfunction, excitatory-inhibitory imbalance and neuronal discoordination (Devor et al., 2017; Dienel and Lewis, 2019; Insel, 2010; Krajcovic et al., 2019; McCutcheon et al., 2019; Yin et al., 2012). All symptoms of schizophrenia reflect alterations in neuronal circuitry in multiple brain regions that may be due, at least in part, to deficits in dendritic spines. These dendritic alterations have been better characterized in layer III of the neocortex, where pyramidal cell spine density is lower in subjects with schizophrenia (Garey et al., 1998; Glantz and Lewis, 2000; Glausier and Lewis, 2013; Kolluri et al., 2005). The spine deficits seem to appear during development and may be due to disturbances in the molecular mechanisms responsible for spine formation, pruning, and/or maintenance (Glausier and Lewis, 2013).

Spinophilin is a multifunctional scaffold protein expressed throughout the brain in a region- and subcellular compartment- dependent manner (Allen et al., 1997; Brocos-Mosquera et al., 2018; Muly et al., 2004; Ouimet et al., 2004). Its roles depend on its localization, and direct interaction with and regulation of other proteins such as actin, protein phosphatase 1 and different neurotransmitter receptors (Allen et al., 1997; Sarrouilhe et al., 2006; Satoh et al., 1998; Smith et al., 1999; Wang et al., 2004; Yan et al., 1999). Spinophilin is highly expressed in dendritic spines and postsynaptic density (PSD) enriched forms (Allen et al., 1997; Muly et al., 2004; Satoh et al., 1998). Spinophilin knock-down and knock-out studies in cultured neurons and mice have revealed that it regulates spine formation and function. However, these results are contradictory, showing either an increase (Feng et al., 2000) or a decrease (Evans et al., 2015) in dendritic spines, which suggest that spinophilin's contribution to spine formation is complex and still unclear. In addition, spinophilin has been proposed to play a role in neuronal migration, by its interaction with doublecortin, a microtubule-associated protein required for this process (Tsukada et al., 2003). Spinophilin can also directly interact with some receptors involved

in the neurobiology of schizophrenia such as dopamine D<sub>2</sub> (Smith et al., 1999),  $\alpha$ -adrenergic (Richman et al., 2001) or metabotropic and ionotropic glutamate receptors (Di Sebastiano et al., 2016; Salek et al., 2019). Thus, several studies have proposed an implication of spinophilin in schizophrenia (Baracskey et al., 2006; Clinton et al., 2005; iSweet et al., 2009).

The dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) of the brain is responsible for cognition, working memory and complex executive functions such as inhibition of inappropriate behaviors and planification. This key brain area has largely been implicated in the pathophysiology of schizophrenia (Arnsten and Li, 2005; Arnsten and Wang, 2016; Dienel and Lewis, 2019). Brain imaging studies indicate an altered structural and functional connectivity in corticolimbic and mesolimbic circuitry in schizophrenia (Allen et al., 2012; Alonso-Solis et al., 2015; Amad et al., 2014), some of which may be modifiable by antipsychotics (AP) (Sarpal et al., 2015). Studies of AP effects in brain tissue have mainly focused on alterations in neurotransmitters, their receptors and associated proteins (Lidow et al., 2001; Vincent et al., 1994). However, there is growing evidence that long-term AP treatment can alter the morphology and connectivity of cellular processes in several areas of the brain, especially in the association areas of the cerebral cortex (Benes et al., 1985a, 1985b; Klitzova et al., 1989; Lidow et al., 2001; Meshul et al., 1992; Uranova et al., 1991; Vincent et al., 1991). It has also been proposed that the morphological alterations produced by AP could underlie some of the side effects produced by these drugs (Kelley et al., 1997; Seeman, 1988). The discovery of alterations in the volume and organization of the neuropil in postmortem cortical tissue from schizophrenic patients (Anders, 1978; Garey et al., 1998; Glantz and Lewis, 2000; Selemon et al., 1995; Uranova et al., 1996) reinforced the interest in the AP effects on the morphology of cortical cells, raising the question of whether these changes are associated with the disease itself or with its pharmacological treatment (Lidow et al., 2001).

The aim of the present study was to measure spinophilin protein expression in the DLPFC (Brodmann's area 9) of AP-free and AP-treated schizophrenia subjects and matched controls, in order to discriminate if putative alterations are due to the pathology or to the treatment. We had previously characterized spinophilin protein expression by western blot in postmortem human brain, showing that there are two specific bands for this protein with differential regional and subcellular distribution (Brocos-Mosquera et al., 2018). In the present study, both spinophilin bands were quantified in two different preparations: synaptosomal fractions (containing presynaptic and postsynaptic membranes) and PSD fractions.



**Table 1** Gender, age, PMD and storage time of subjects included in the study. Quantitative variables are expressed as mean±SEM (standard error of the mean).

	ALL		AP-free		AP-treated	
	24 C	24 S	12 C	12 S	12 C	12 S
Gender (M/F)	16/8	16/8	9/3	9/3	7/5	7/5
Age (years)	43±2	43±2	44±2	43±2	42±3	42±3
PMD (hours)	18±2	16±2	15±3	17±4	21±3	15±2
Storage time (months)	102±12	98±6	112±21	96±8	92±11	100±10

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Postmortem human brain samples

Human brain samples were obtained at autopsy in the Basque Institute of Legal Medicine, Bilbao, Spain. Samples from the DLPFC (Brodmann's area 9, BA9) were dissected at the time of autopsy and immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay. A toxicological screening on blood (detection of antidepressants, antipsychotics, psychotropic drugs and ethanol) was performed at the National Institute of Toxicology, Madrid, Spain, using a variety of standard procedures including radioimmunoassay, enzymatic immunoassay, high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.

This study included samples from 48 subjects. In all cases, a retrospective careful searching for antemortem medical diagnosis was performed. Thus, the samples were assigned to one of two experimental groups: control (C) group (24 subjects with no antemortem neurological or psychiatric disorders) and schizophrenia (S) group (24 subjects with an antemortem diagnosis of schizophrenia based on DSM or ICD criteria). The schizophrenia (S) group was divided into two subgroups based on the presence or absence of antipsychotics in blood at the time of death: 12 antipsychotic-free (AP-free) subjects (negative antipsychotic blood analysis) and 12 antipsychotic-treated (AP-treated) subjects (positive antipsychotic blood analysis).

Schizophrenia and control subjects were matched one to one, as well as possible, for age, gender and postmortem delay (time interval between death and autopsy, PMD). Age, gender, PMD and storage time were not statistically different between groups, as shown in Table 1 ( $p > 0.05$ , two tailed  $t$ -test). The demographic characteristics, cause of death, psychiatric diagnosis and toxicological characteristics of samples are shown in Supplementary Tables 1 and 2. The study was developed in compliance with legal policy and ethical review boards for postmortem brain studies.

### 2.2. Subcellular fractionation of postmortem human DLPFC

Human postmortem samples were fractionated as previously described (Erdozain et al., 2019). Postmortem brain tissue (1 gram from each subject) was homogenized in 30 ml cold Tris-sucrose buffer (0.32 M sucrose in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) supplemented with protease and phosphatase inhibitors and centrifuged at  $1100 \times g$  for 15 min. The supernatants were recentrifuged at  $40,000 \times g$  for 10 min. The remaining  $P_2$  membrane pellets - which contain the crude synaptosomal fraction - were resuspended in 3 ml of the same 0.32 M Tris-sucrose buffer and overlaid on a three-layer discontinuous sucrose gradient that consisted of 3 ml of each 1.2 M, 1.0 M and 0.85 M sucrose in 5 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer

(+antiproteases/phosphatases). The gradient was ultracentrifuged at  $100,000 \times g$  for 2 h and the layer in the interphase between 1.0 and 1.2 M Tris-buffered sucrose solutions - corresponding to the synaptosomal plasma membrane (SPM) fraction - was collected. In order to partially remove the glucose in the samples, each SPM fraction was washed with 8 ml of 5 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer (+antiproteases/phosphatases) and centrifuged at  $40,000 \times g$  for 10 min. The resulting SPM pellets were resuspended in 1 ml 5 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer (+antiproteases/phosphatases). A 100  $\mu\text{l}$  aliquot from each sample was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  as SPM fraction sample until assay. The rest was centrifuged at  $21,000 \times g$  for 15 min, and the resulting SPM pellets were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for presynaptic membranes and PSD separation. Next day, each SPM pellet was thawed on ice, resuspended in 20 ml of 20 mM Tris-HCl pH 6.0 buffer with 1% Triton X-100 (+antiproteases/phosphatases), rotated in a rocker for 30 min and centrifuged at  $35,000 \times g$  for 20 min. The resulting pellets were resuspended in 5 ml of 20 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer with 1% Triton X-100 (+antiproteases/phosphatases), rotated on a rocker for 60 min and ultracentrifuged at  $140,000 \times g$  for 30 min. The supernatants, corresponding to the presynaptic membrane fraction, were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay. The final pellets, corresponding to the PSD fraction, were resuspended in 900  $\mu\text{l}$  of 50 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer, aliquoted and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay. All steps were performed at  $4^{\circ}\text{C}$ . A small aliquot from SPM and PSD was separated and used for protein quantification using a Bio-Rad DC Protein Assay Kit with BSA as standard.

### 2.3. Western blot

Western blot assays were performed as previously described (Brocos-Mosquera et al., 2018) with minor modifications. Samples were prepared in electrophoresis buffer in reducing and denaturing conditions (100 mM DTT, 2% SDS, 8% glycerol, 0.01% bromophenol blue, and heated at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min). Denatured proteins (20  $\mu\text{g}$ ) were resolved on 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (AmershamTM ProtranTM 0.45  $\mu\text{m}$  NC). Membranes were stained with Ponceau S solution and scanned, in order to check the correct transfer of the proteins, and to obtain a total protein stain value. After blockage for 1 h at room temperature with 5% non-fat dry milk in phosphate-buffered saline (PBS), the membranes were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with constant agitation with the primary antibodies against spinophilin (LifeSpan BioSciences LS-C162085, 1:1000) and  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich A1978, 1:200,000). Next morning, membranes were washed again with PBS and incubated for 90 min at room temperature with the fluorescent secondary antibodies (IRDyeTM 800 or Alexa Fluor<sup>®</sup> 680 conjugated). The immunoreactive signal (integrated intensity values) was detected using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA) and quantified using Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Biosciences). For the quantification analysis, the immunoreactivity values were normalized independently for the  $\beta$ -

actin signal or for total protein (Ponceau S stain), in order to consider the fact that spinophilin binds to F-actin and thus a possible simultaneous modulation of both proteins. However, no significant differences were observed with the different analysis, and values shown below correspond to  $\beta$ -actin normalization.

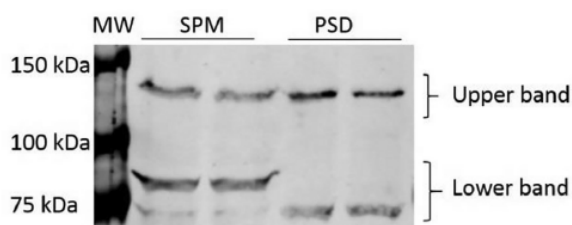
#### 2.4. Data analysis

The analyses were carried out with GraphPad Prism 5<sup>®</sup> and results expressed as means $\pm$ SEM of actin-normalized immunoreactivity for spinophilin. The main statistical analysis for comparison of the means between control and schizophrenia subjects was performed by a two-tailed paired Student's *t*-test, since groups and subgroups were matched for sex, age, PMD and storage time. Data was also analyzed using a secondary statistical analysis with R software, in which subjects were divided in three groups (controls [*n* = 24], AP-free schizophrenia [*n* = 12] and AP-treated schizophrenia subjects [*n* = 12]) and a multiple regression analysis was performed to predict spinophilin levels based on the covariates of sex, age, postmortem delay and storage time. In all cases *p* values <0.05 were considered as being statistically significant. No outliers were detected using Grubb's test.

### 3. Results

#### 3.1. Specificity of the spinophilin immunoreactivity in SPM and PSD fractions of postmortem human DLPFC

All the western blot experiments were performed under denaturing conditions and showed two bands in both SPM and PSD fractions, as previously observed (Brocos-Mosquera et al., 2018). In SPM fraction, the migration of the upper band was around 120-130 kDa and the lower band around 95 kDa. In PSD fraction, however, the upper band came out also around 120-130 kDa, but the lower band migrated around 80 kDa (Fig. 1). The specific nature of these two bands has been previously described (Brocos-Mosquera et al., 2018), where we observed the cross reactivity of both bands to antibodies designed against different antigenic epitopes, and showed proteolysis studies where incubation for long times at 37°C, incubations at higher temperatures, and numerous freeze/thaw cycles produced a significant increase in the intensity of the lower band. The variance in the migration of both spinophilin bands in SPM and PSD fractions could be due to the preparation of the fractions, with 1% Triton detergent present in the PSD



**Fig. 1** A representative western blot for spinophilin in a SPM and a PSD samples from the same subject, showing two specific immunoreactive bands for the protein, with the lower band displaying a slight migration shift between SPM and PSD fractions.

fraction, which could influence the migration of one form of spinophilin, as suggested previously (Allen et al., 1997). Alternatively, since there seems to be a little (almost undetectable) presence of the 80 kDa band in the SPM, it is also possible that the 80 kDa and 95 kDa bands could represent different fragments produced depending on the subcellular regions, due to the effect of different proteases in each compartment.

In our experimental conditions, the expression of spinophilin protein was undetectable in presynaptic membrane fractions. As spinophilin is a protein marker of dendritic spines (Muly et al., 2004), it may be expected to be detected in the SPM (which contains both the presynapse and PSD) and in the PSD fractions but not in the presynaptic fraction.

#### 3.2. Quantification of spinophilin protein expression in SPM and PSD fractions of postmortem human DLPFC

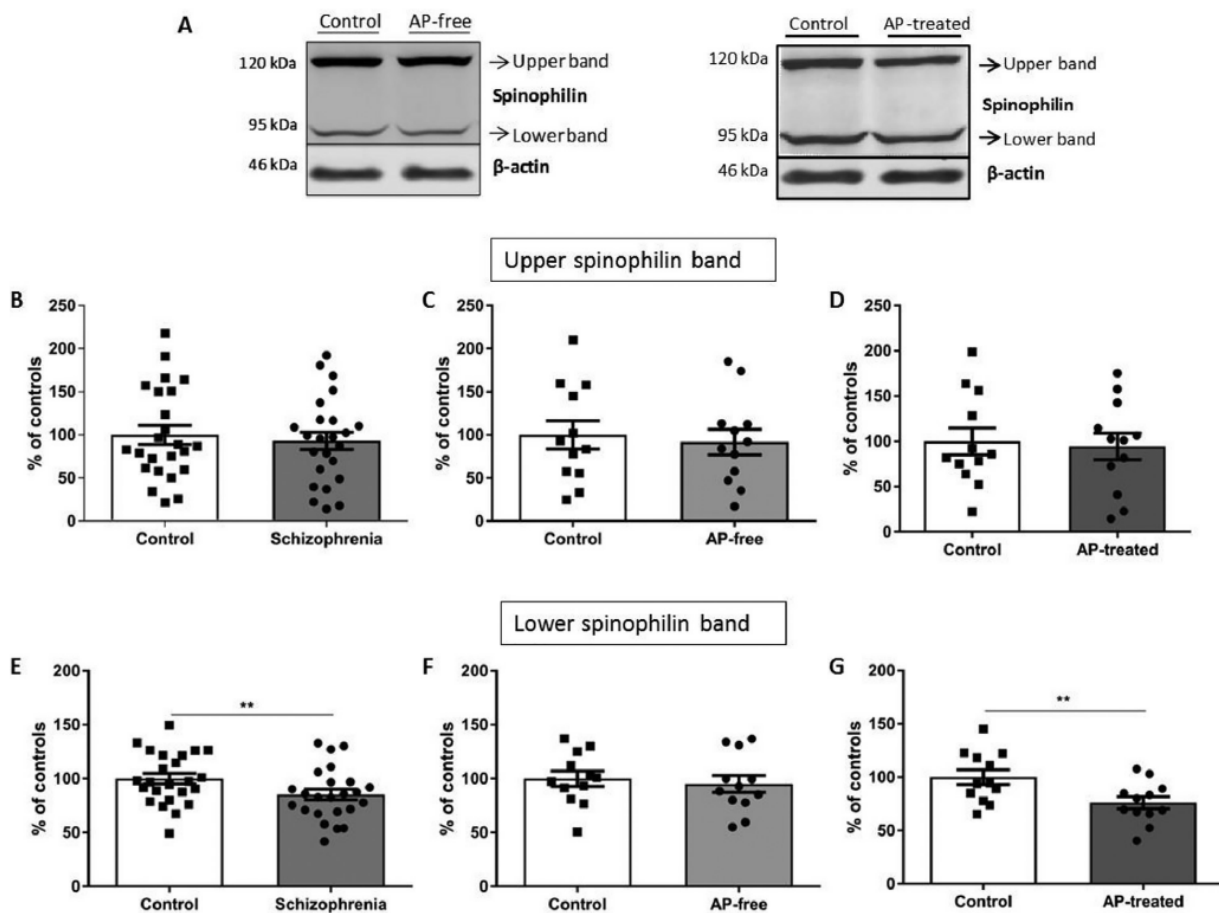
The spinophilin protein levels were measured by western blot in SPM and PSD fractions. In SPM fraction, the immunoreactivity of the lower band of spinophilin showed a significant decrease in schizophrenia subjects compared to matched controls (15% decrease, *p* = 0.007, Fig. 2E). When schizophrenia subjects were divided by the presence or absence of antipsychotics in blood at death, spinophilin lower band showed a significant decrease in AP-treated schizophrenia subjects (24% decrease, *p* = 0.003), but not AP-free subjects, compared to their matched controls (Fig. 2F-G). No significant differences were observed in the spinophilin upper band between the different groups (Fig. 2B-D).

Similarly, when spinophilin protein was measured in PSD fraction, a significant decrease was observed for the lower band in schizophrenia subjects compared to controls (15% decrease, *p* = 0.039 Fig. 3E). Again, when schizophrenia subjects were divided in regard to the presence of antipsychotics in blood at death, spinophilin lower band showed a significant decrease in AP-treated schizophrenia subjects (26% decrease, *p* = 0.014), but not AP-free subjects, compared with to their matched controls (Fig. 3F-G). No significant differences were observed in the spinophilin upper band (Fig. 3B-D).

These previous results in SPM and PSD fractions were further confirmed by a multiple regression analysis controlling for the covariates sex, age, postmortem delay and storage time, in which subjects were divided in three groups (controls [*n* = 24], AP-free schizophrenia [*n* = 12] and AP-treated schizophrenia subjects [*n* = 12]). This analysis corroborated that the spinophilin lower band was significantly decreased in AP-treated schizophrenia subjects compared to controls both in SPM (-21.7%, *p* = 0.004) and PSD (-28.1%, *p* = 0.032).

### 4. Discussion

Despite the proposed involvement of changes in spinophilin in the neurobiology of schizophrenia, studies that have examined spinophilin expression in postmortem human



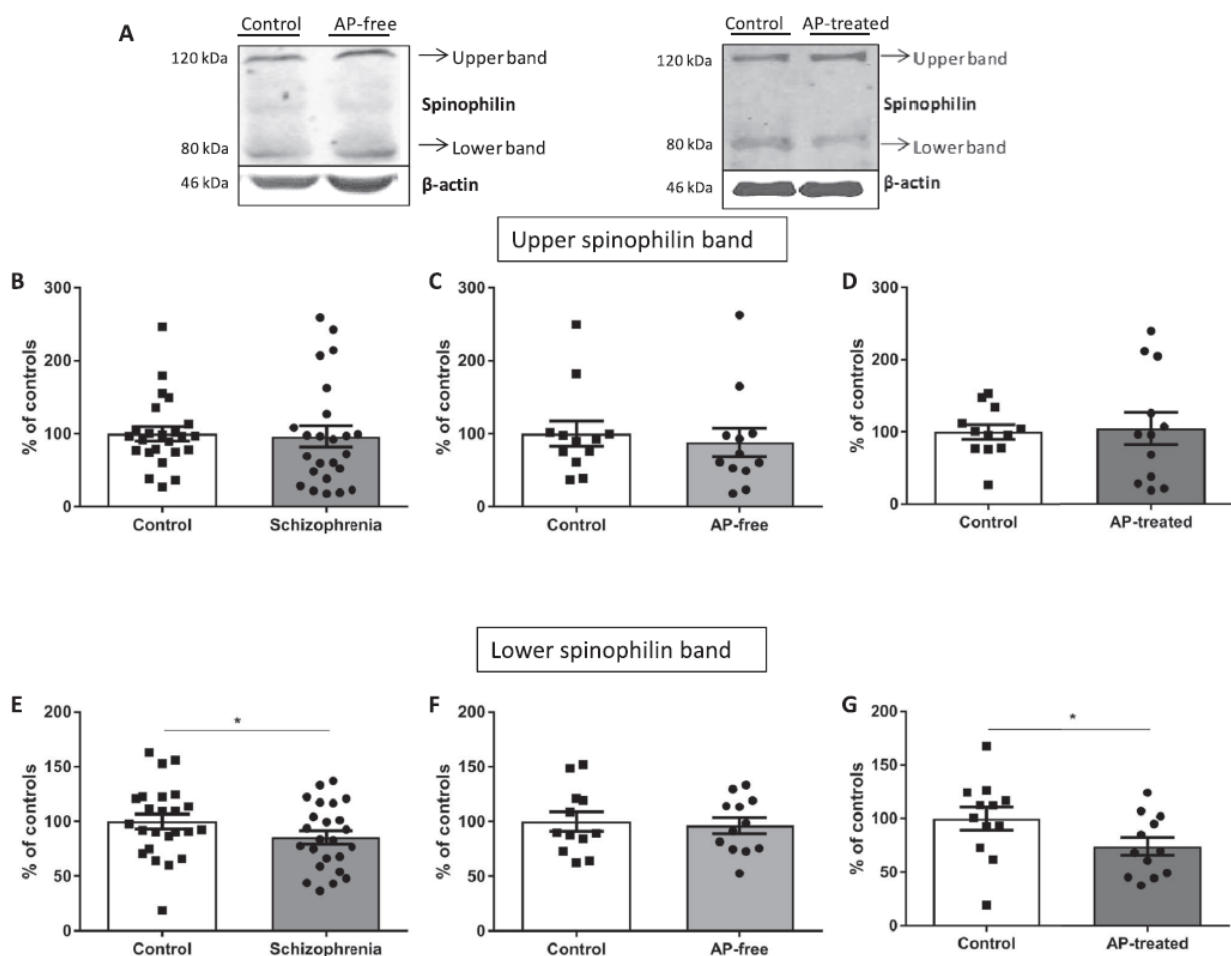
**Fig. 2** Spinophilin protein expression in SPM fraction of postmortem brain DLPFC of schizophrenia subjects. Representative western blot for spinophilin showing the two specific forms of the protein in SPM fraction of an AP-free and an AP-treated schizophrenia subject and their corresponding matched controls (A). B-D: Spinophilin upper band immunoreactivity in the 24 schizophrenia subjects and matched controls (B); in 12 AP-free schizophrenia subjects and matched controls (C); and in 12 AP-treated schizophrenia subjects and matched controls (D). E-G: Spinophilin lower band immunoreactivity in 24 schizophrenia subjects and matched controls (E); in 12 AP-free schizophrenia subjects and matched controls (F); and in 12 AP-treated schizophrenia and matched controls (G). Data shown are mean  $\pm$  SEM values of 3-4 independent experiments and express the actin-normalized immunoreactivity as percentage of the matched controls (100%). Statistical significance is denoted by \*\* $p < 0.01$ .

brain of schizophrenia subjects show inconsistent results (Baracska et al., 2006; Catts and Weickert, 2012; Clinton et al., 2005; Deo et al., 2013; Law et al., 2004b; Sweet et al., 2009; Weickert et al., 2004). In the present study, we report no alteration in spinophilin protein expression in DLPFC (BA9) of schizophrenia subjects that were AP-free at the time of death. Conversely, a decrease in a specific form of spinophilin is observed in AP-treated schizophrenia subjects. These results suggest that AP-treatment could produce alterations in spinophilin expression that are not present in untreated or non-compliant schizophrenia patients.

Some studies that have quantified spinophilin mRNA or protein expression in brain of schizophrenia patients did not find significant alterations. A previous study examining spinophilin protein expression by slot blot in the DLPFC (in this case BA46) obtained similar results that our present work (Koh et al., 2003). Further, two independent mRNA analysis in the DLPFC also found no significant alterations

between schizophrenia patients and controls (Catts and Weickert, 2012; Weickert et al., 2004). Unchanged expression of spinophilin has similarly been reported in other brain regions such as auditory cortex (Deo et al., 2013) and anterior cingulate cortex (Baracska et al., 2006).

On the contrary, other studies have found either increased or reduced expression of spinophilin in brain samples of subjects with schizophrenia. An in situ hybridization study detected slightly increased transcript levels of spinophilin in the II, V, and VI layers of the DLPFC (BA9) (Baracska et al., 2006). Conversely, the density of spinophilin-immunoreactive synaptic puncta was found to be significantly lower in the auditory cortex of schizophrenia subjects (Sweet et al., 2009). The authors suggested that these alterations may contribute to the impairment in auditory sensory processing present in this psychiatric disorder. Alterations in spinophilin levels have also been reported in other brain regions of interest in schizophrenia, such as hippocampus (Law et al., 2004b), olfactory bulb



**Fig. 3** Western blot analysis of spinophilin protein expression in PSD fraction of postmortem DLPFC of schizophrenia subjects. Representative western blot for spinophilin showing the two specific forms of the protein in PSD fraction of an AP-free and an AP-treated schizophrenia subject and their corresponding matched controls (A). B-D: Spinophilin upper band immunoreactivity in 24 schizophrenia subjects and matched controls (B); in 12 AP-free schizophrenia subjects and matched controls (C); and in 12 AP-treated schizophrenia subjects and matched controls (D). E-G: Spinophilin lower band immunoreactivity in 24 schizophrenia subjects and matched controls (E); in 12 AP-free schizophrenia subjects and matched controls (F); and in 12 AP-treated schizophrenia subjects and matched controls (G). Data shown are mean $\pm$ SEM values of 6-8 independent experiments and express the actin-normalized immunoreactivity as percentage of the controls (100%). Statistical significance is denoted by \* $p < 0.05$ .

(Egbujo et al., 2015) and thalamic nuclei (Clinton et al., 2005). Overall, authors that found a decrease in spinophilin suggest that this corresponds to a decreased spine density in these particular regions or subregions.

The fact that we and others found unchanged spinophilin protein levels in the DLPFC of (AP-free) schizophrenia subjects may seem to be in opposition to the suggested altered synaptic communication among cortical neurons as a component of the schizophrenia pathophysiology (Glausier and Lewis, 2013). Nevertheless, taking into account that some alterations have been described only in particular layers (Baracska et al., 2006; Glausier and Lewis, 2013; Kolluri et al., 2005; Sweet et al., 2009), it is possible that a decrease in synaptic spines and spinophilin expression could not be detected in a study like ours, where the DLPFC sample is processed as a whole entire piece, with no distinction between layers. Other researchers in the field have also suggested that synaptic pathology may be subtle and variable

and may be due to patient-specific factors (Weickert et al., 2004).

An important factor when interpreting these kind of studies with human subjects is the possible confounding effect of suicide. Since the control group does not present any suicide case, we have studied its possible effect in the AP-treated (7 suicides/5 non-suicides) and AP-free groups (10 suicides/2 non-suicides). The assessment of association between suicide and AP treatment analyzed by means of a Fisher's exact test gave a non significant result ( $p = 0.37$ ), so the null hypothesis of equal suicides in both groups cannot be rejected. Therefore, it does not seem that suicide could be a variable that confuses the results of both groups.

There is growing evidence that long-term AP treatment can alter the morphology and connectivity of cellular processes in several brain areas, especially in association areas of the cerebral cortex (Benes et al., 1985a, 1985b;

Klitzova et al., 1989; Lidow et al., 2001; Meshul et al., 1992; Uranova et al., 1991; Vincent et al., 1991). Our study was carefully designed to address this issue and to discriminate if putative alterations might be due to the pathology itself or to its pharmacological treatment. Importantly, we describe a significant reduction in one form of spinophilin in those schizophrenia subjects that were on AP treatment at the time of death (with positive blood toxicology). In a similar way, spinophilin mRNA expression in human DLPFC showed relationship with neuroleptic dose estimates, suggesting that neuroleptics could downregulate spinophilin mRNA (Weickert et al., 2004). Still, studies mentioned above that found either decrease of spinophilin protein expression in the auditory cortex (Sweet et al., 2009) or no-significant alteration in the DLPC (Koh et al., 2003), found no effect of the AP treatment on spinophilin expression in human brain. However, in these studies very few of the schizophrenia subjects were AP-free at death (two and three out of fifteen, respectively), so the comparison between treated and non-treated may not be very meaningful, with the possibility that a real difference could not be detected. In any case, it cannot be discarded that the differences observed in the present study between AP-free and AP-treated subjects could also be due to other patient-specific factors (i.e. clinical features).

The fact that we only observed a decrease in the lower weight form of spinophilin (80-95 kDa) and not in the upper band (120-130 kDa) may have a biological interpretation. As we previously reported, this smaller form seems to be a proteolysis product of the upper spinophilin, since incubation for long times at 37 °C, incubations at higher temperatures, and numerous freeze/thaw cycles produce a significant increase in the intensity of the band (Brocos-Mosquera et al., 2018). Although the role of both forms of spinophilin remains to be elucidated, the differential subcellular localization (the upper band enriched in the membrane-bound fraction, while the lower band remains very low both in the cytosolic/soluble and membrane-bound fraction) might indicate that they have a different function, stability and/or degradation pathways. It is also possible that the decrease in this form of spinophilin might reflect a decrease in the turnover of the protein. On the other hand, as mentioned in the results section, we only measured spinophilin expression in SPM and PSD fractions since the protein was undetectable in presynaptic membrane fraction. However, the presence of spinophilin in the presynapse cannot be discarded; it might just be too diluted in this fraction, and thus under the detection threshold in our experimental conditions. These results raise the question whether a possible proteolysis might be induced by AP treatment. However, as far as we know there is no evidence for AP-induced proteolytic activity. Indeed, some data would indicate the opposite, since increased peptidase activity has been described in plasma and brain of schizophrenia subjects, and in this way, inhibitors of some peptidases have been proposed as potential procognitive drugs in schizophrenia. Some examples are N-acetylaspartylglutamate peptidase inhibitors (Olszewski et al., 2008, 2012; Zuo et al., 2012), prolyl oligopeptidase inhibitors (Prades et al., 2017; Lopez et al., 2013) and dipeptidyl-peptidase-4 inhibitors (Pintana et al., 2013).

In addition to postmortem studies, animal and *in vitro* studies have provided information about the effects of chronic AP treatment on spinophilin. Although one study reported unaltered spinophilin mRNA expression in rat brain after administering several AP (Law et al., 2004a), most studies have found that chronic AP treatment changes spinophilin expression (Critchlow et al., 2006; Koh et al., 2003; Lidow et al., 2001). Importantly, this effect seems to depend on the type of AP used. Thus, the typical AP haloperidol induced a significant downregulation of spinophilin protein in rat neurons (Critchlow et al., 2006) and primate brain (Koh et al., 2003; Lidow et al., 2001), whereas the atypical AP clozapine has been shown to increase this protein expression in rat neurons (Critchlow et al., 2006). To note, the studies that evaluated the effect of AP over the spinophilin protein expression in homogenates by blotting do only mention the upper band, identified at approximately 120 kDa (Critchlow et al., 2006) or 140 kDa (Lidow et al., 2001; Koh et al., 2003), and none of them performed the presynaptic/postsynaptic fractionation. In any case, it is important to mention that an alteration or lack of difference observed in animals, e.g. rodents, might not necessarily be extrapolated to humans. Indeed, the doses, administration routes, administration schemas and pharmacokinetics are very different. Besides, we describe changes in a pathological brain, which might not be reflected in a normal/control animal brain. The twelve AP-treated schizophrenia subjects included in our study were taking a wide variety of antipsychotics, with only one subject taking haloperidol and three subjects clozapine. This dispersion in the number of different AP administered prevents us from relating each AP with a specific effect on the spinophilin expression.

It has been proposed that the morphological and molecular (e.g. spinophilin) alterations produced by long-term AP treatment, may underlie some of the side effects produced by these drugs. In this line, special attention has been drawn to the possible negative effects on cognition (Kelley et al., 1997; Lett et al., 2014; Seeman, 1988). Cognition is a group of mental processes that includes the ability to accurately perceive, attend to, process and remember information. Even if schizophrenia is defined as a psychotic disorder, cognitive impairment is a core feature of the disease, with a generalized impairment of various cognitive domains such as working memory, attention, verbal learning and memory, and executive functions (Kahn and Keefe, 2013). Although the effect of AP on cognition is still at debate, there is growing evidence that cognitive deficits would not benefit from AP medication but rather worsen with chronic treatment (Lett et al., 2014). Accordingly, severe impairments in working memory performance have been observed in primates undergoing long-term haloperidol treatment (Castner et al., 2000). In addition, chronic exposure of primates to AP has been associated with reduced brain volume, smaller gray matter volume, lower glial cell number and higher neuron density, similar to that observed in schizophrenia subjects (Dorph-Petersen et al., 2005; Konopaske et al., 2007). Interestingly, a longitudinal study with first-episode schizophrenia subjects described a correlation between AP dose and progressive reduction in brain volume (Ho et al., 2011). Nevertheless, other studies have shown a small improvement in cognitive performance after AP treatment (Keefe et al.,

2007; Lett et al., 2014; Woodward et al., 2005). A therapeutic advantage of atypical AP compared with typical AP is the potential improvement of several cognitive domains (Woodward et al., 2005), although there are also controversial results (Keefe et al., 2007). We performed this study in the DLPFC, which is an integral component of executive and cognitive functioning (e.g. working memory, inhibition of inappropriate behaviors, planification, complex attention) and has largely been implicated in the pathophysiology of schizophrenia (Arnsten and Li, 2005; Arnsten and Wang, 2016; Dienel and Lewis, 2019).

To sum up, the present study reports a decrease in spinophilin protein expression in DLPFC homogenates of AP-treated schizophrenia subjects, whereas no alteration was observed in schizophrenia subjects that were AP-free at the moment of death. These results point out the possibility that AP treatment could produce alterations in spinophilin expression and suggest that the downregulation of this dendritic protein could contribute to the negative effects produced by these drugs on cognitive performance.

### Conflict of interest

Authors declare that they have no conflicts of interest.

### Role of the funding source

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: the Spanish MINECO (grants SAF2013-48586-R and RTI2018-094414-A-I00) and the Basque Government (grant number IT1211/19). Nor the Spanish MINECO or the Basque Government had no further role in study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report and in the decision to submit the paper for publication.

### Contributors

LFC and JJM designed the study. LFC, JJM and AME managed literature searches. AME and AMG wrote the protocol. IBM and AMG undertook the experimental procedures and analyses. IBM, AMG and AME performed the statistical analysis. IBM and AME wrote the first draft of the manuscript and all authors contributed to and have approved the final manuscript.

### Acknowledgments

The authors thank the staff members of the Basque Institute of Legal Medicine for their cooperation in the study, and Olga Peñagarikano and Javier Ballesteros for their support.

### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.euroneuro.2020.11.011.

### References

- Allen, P., Modinos, G., Hubl, D., Shields, G., Cachia, A., Jardri, R., Thomas, P., Woodward, T., Shotbolt, P., Plaze, M., Hoffman, R., 2012. Neuroimaging auditory hallucinations in schizophrenia: from neuroanatomy to neurochemistry and beyond. *Schizophr. Bull.* 38, 695-703. doi:10.1093/schbul/sbs066.
- Allen, P.B., Ouimet, C.C., Greengard, P., 1997. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9956-9961.
- Alonso-Solís, A., Vives-Gilabert, Y., Grasa, E., Portella, M.J., Rabella, M., Sauras, R.B., Roldán, A., Núñez-Marín, F., Gómez-Ansón, B., Pérez, V., Alvarez, E., Corripio, I., 2015. Resting-state functional connectivity alterations in the default network of schizophrenia patients with persistent auditory verbal hallucinations. *Schizophr. Res.* 161, 261-268. doi:10.1016/j.schres.2014.10.047.
- Amad, A., Cachia, A., Gorwood, P., Pins, D., Delmaire, C., Roland, B., Mondino, M., Thomas, P., Jardri, R., 2014. The multimodal connectivity of the hippocampal complex in auditory and visual hallucinations. *Mol. Psychiatry* 19, 184-191. doi:10.1038/mp.2012.181.
- Anders, V.N., 1978. Ultrastructural features of cerebral synapses in schizophrenic patients. *Zh. Nevropatol. Psikihiatr. Im. SS Korskakova Mosc. Russ.* 1952 (78), 1065-1070.
- Arnsten, A.F.T., Li, B.-M., 2005. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol. Psychiatry* 57, 1377-1384. doi:10.1016/j.biopsych.2004.08.019.
- Arnsten, A.F.T., Wang, M., 2016. Targeting prefrontal cortical systems for drug development: potential therapies for cognitive disorders. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 339-360. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010715-103617.
- Baracska, K.L., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J.H., 2006. Dopamine receptor signaling molecules are altered in elderly schizophrenic cortex. *Synapse* 271-279.
- Benes, F.M., Paskevich, P.A., Davidson, J., Domesick, V.B., 1985a. Synaptic rearrangements in medial prefrontal cortex of haloperidol-treated rats. *Brain Res.* 348, 15-20. doi:10.1016/0006-8993(85)90353-1.
- Benes, F.M., Paskevich, P.A., Davidson, J., Domesick, V.B., 1985b. The effects of haloperidol on synaptic patterns in the rat striatum. *Brain Res.* 329, 265-273. doi:10.1016/0006-8993(85)90532-3.
- Brocos-Mosquera, I., Nuñez Del Moral, A., Morentin, B., Meana, J.J., Callado, L.F., Erdozain, A.M., 2018. Characterisation of spinophilin immunoreactivity in postmortem human brain homogenates. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 81, 236-242. doi:10.1016/j.pnpbp.2017.09.019.
- Castner, S.A., Williams, G.V., Goldman-Rakic, P.S., 2000. Reversal of antipsychotic-induced working memory deficits by short-term dopamine D1 receptor stimulation. *Science* 287, 2020-2022. doi:10.1126/science.287.5460.2020.
- Catts, V.S., Weickert, C.S., 2012. Gene expression analysis implicates a death receptor pathway in schizophrenia pathology. *PLoS ONE* 7, e35511. doi:10.1371/journal.pone.0035511.
- Clinton, S.M., Ibrahim, H.M., Frey, K.A., Davis, K.L., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J.H., 2005. Dopaminergic abnormalities in select thalamic nuclei in schizophrenia: involvement of the intracellular signal integrating proteins calcyon and spinophilin. *Am. J. Psychiatry* 162, 1859-1871. doi:10.1176/appi.ajp.162.10.1859.
- Critchlow, H.M., Maycox, P.R., Skepper, J.N., Krylova, O., 2006. Clozapine and haloperidol differentially regulate dendritic spine formation and synaptogenesis in rat hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 356-365. doi:10.1016/j.mcn.2006.05.007.
- Deo, A.J., Goldszer, I.M., Li, S., DiBitetto, J.V., Henteleff, R., Sampson, A., Lewis, D.A., Penzes, P., Sweet, R.A., 2013. PAK1

- protein expression in the auditory cortex of schizophrenia subjects. *PLoS ONE* 8, e59458. doi:10.1371/journal.pone.0059458.
- Devor, A., Andreassen, O.A., Wang, Y., Mäki-Marttunen, T., Smeland, O.B., Fan, C.-C., Schork, A.J., Holland, D., Thompson, W.K., Witoelar, A., Chen, C.-H., Desikan, R.S., McEvoy, L.K., Djurovic, S., Greengard, P., Svenningsson, P., Einvoll, G.T., Dale, A.M., 2017. Genetic evidence for role of integration of fast and slow neurotransmission in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 22, 792-801. doi:10.1038/mp.2017.33.
- Di Sebastiano, A.R., Fahim, S., Dunn, H.A., Walther, C., Ribeiro, F.M., Cregan, S.P., Angers, S., Schmid, S., Ferguson, S.S.G., 2016. Role of spinophilin in group I metabotropic glutamate receptor endocytosis, signaling, and synaptic plasticity. *J. Biol. Chem.* 291, 17602-17615. doi:10.1074/jbc.M116.722355.
- Dienel, S.J., Lewis, D.A., 2019. Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia. *Neurobiol. Dis.* 131, 104208. doi:10.1016/j.nbd.2018.06.020.
- Dorph-Petersen, K.-A., Pierri, J.N., Perel, J.M., Sun, Z., Sampson, A.R., Lewis, D.A., 2005. The influence of chronic exposure to antipsychotic medications on brain size before and after tissue fixation: a comparison of haloperidol and olanzapine in macaque monkeys. *Neuropsychopharmacology* 30, 1649-1661. doi:10.1038/sj.npp.1300710.
- Egbujo, C.N., Sinclair, D., Borgmann-Winter, K.E., Arnold, S.E., Turetsky, B.I., Hahn, C.-G., 2015. Molecular evidence for decreased synaptic efficacy in the postmortem olfactory bulb of individuals with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 168, 554-562. doi:10.1016/j.schres.2015.07.026.
- Erdozain, A.M., Brocros-Mosquera, I., Gabilondo, A.M., Meana, J.J., Callado, L.F., 2019. Differential  $\alpha 2A$ - and  $\alpha 2C$ -adrenoceptor protein expression in presynaptic and postsynaptic density fractions of postmortem human prefrontal cortex. *J. Psychopharmacol.* 33, 244-249. doi:10.1177/0269881118798612.
- Evans, J.C., Robinson, C.M., Shi, M., Webb, D.J., 2015. The guanine nucleotide exchange factor (GEF) Asef2 promotes dendritic spine formation via Rac activation and spinophilin-dependent targeting. *J. Biol. Chem.* 290, 10295-10308. doi:10.1074/jbc.M114.605543.
- Feng, J., Yan, Z., Ferreira, A., Tomizawa, K., Liauw, J.A., Zhuo, M., Allen, P.B., Ouimet, C.C., Greengard, P., 2000. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9287-9292.
- Garey, L.J., Ong, W.Y., Patel, T.S., Kanani, M., Davis, A., Mortimer, A.M., Barnes, T.R., Hirsch, S.R., 1998. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 65, 446-453. doi:10.1136/jnnp.65.4.446.
- Glantz, L.A., Lewis, D.A., 2000. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 65-73.
- Glausier, J.R., Lewis, D.A., 2013. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 251, 90-107. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.04.044.
- Ho, B.-C., Andreasen, N.C., Ziebell, S., Pierson, R., Magnotta, V., 2011. Long-term antipsychotic treatment and brain volumes: a longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 128-137. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2010.199.
- Insel, T.R., 2010. Rethinking schizophrenia. *Nature* 468, 187-193. doi:10.1038/nature09552.
- Jongsma, H.E., Gayer-Anderson, C., Lasalvia, A., Quattrone, D., Mulè, A., Szöke, A., Seltén, J.-P., Turner, C., Arango, C., Tarricone, I., Berardi, D., Tortelli, A., Llorca, P.-M., de Haan, L., Bobes, J., Bernardo, M., Sanjuán, J., Santos, J.L., Arrojo, M., Del-Ben, C.M., Menezes, P.R., Velthorst, E., Murray, R.M., Ruten, B.P., Jones, P.B., van Os, J., Morgan, C., Kirkbride, J.B., 2018. European network of national schizophrenia networks studying gene-environment interactions work package 2 (EU-GEI WP2) group. Treated incidence of psychotic disorders in the multinational EU-GEI study. *JAMA Psychiatry* 75, 36-46. doi:10.1001/jamapsychiatry.2017.3554.
- Kahn, R.S., Keefe, R.S.E., 2013. Schizophrenia is a cognitive illness: time for a change in focus. *JAMA Psychiatry* 70, 1107-1112. doi:10.1001/jamapsychiatry.2013.155.
- Keefe, R.S.E., Bilder, R.M., Davis, S.M., Harvey, P.D., Palmer, B.W., Gold, J.M., Meltzer, H.Y., Green, M.F., Capuano, G., Stroup, T.S., McEvoy, J.P., Swartz, M.S., Rosenheck, R.A., Perkins, D.O., Davis, C.E., Hsiao, J.K., Lieberman, J.A., 2007. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE trial. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 633-647. doi:10.1001/archpsyc.64.6.633.
- Kelley, J.J., Gao, X.M., Tamminga, C.A., Roberts, R.C., 1997. The effect of chronic haloperidol treatment on dendritic spines in the rat striatum. *Exp. Neurol.* 146, 471-478. doi:10.1006/exnr.1997.6552.
- Klitzova, A.J., Haselhorst, U., Uranova, N.A., Schenk, H., Is-tomin, V.V., 1989. The effects of haloperidol on synaptic plasticity in rat's medial prefrontal cortex. *J. Hirnforsch.* 30, 51-57.
- Koh, P.O., Bergson, C., Undie, A.S., Goldman-Rakic, P.S., Lidow, M.S., 2003. Up-regulation of the D1 dopamine receptor-interacting protein, calcyon, in patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 311-319.
- Kolluri, N., Sun, Z., Sampson, A.R., Lewis, D.A., 2005. Lamina-specific reductions in dendritic spine density in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 162, 1200-1202. doi:10.1176/appi.ajp.162.6.1200.
- Konopaske, G.T., Dorph-Petersen, K.-A., Pierri, J.N., Wu, Q., Sampson, A.R., Lewis, D.A., 2007. Effect of chronic exposure to antipsychotic medication on cell numbers in the parietal cortex of macaque monkeys. *Neuropsychopharmacology* 32, 1216-1223. doi:10.1038/sj.npp.1301233.
- Krajcovic, B., Fajnerova, I., Horacek, J., Kelemen, E., Kubik, S., Svoboda, J., Stuchlik, A., 2019. Neural and neuronal discoordination in schizophrenia: from ensembles through networks to symptoms. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 226, e13282. doi:10.1111/apha.13282.
- Law, A.J., Hutchinson, L.J., Burnet, P.W.J., Harrison, P.J., 2004a. Antipsychotics increase microtubule-associated protein 2 mRNA but not spinophilin mRNA in rat hippocampus and cortex. *J. Neurosci. Res.* 76, 376-382. doi:10.1002/jnr.20092.
- Law, A.J., Weickert, C.S., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Harrison, P.J., 2004b. Reduced spinophilin but not microtubule-associated protein 2 expression in the hippocampal formation in schizophrenia and mood disorders: molecular evidence for a pathology of dendritic spines. *Am. J. Psychiatry* 161, 1848-1855. doi:10.1176/ajp.161.10.1848.
- Lett, T.A., Voineskos, A.N., Kennedy, J.L., Levine, B., Daskalakis, Z.J., 2014. Treating working memory deficits in schizophrenia: a review of the neurobiology. *Biol. Psychiatry* 75, 361-370. doi:10.1016/j.biopsych.2013.07.026.
- Lidow, M.S., Song, Z.M., Castner, S.A., Allen, P.B., Greengard, P., Goldman-Rakic, P.S., 2001. Antipsychotic treatment induces alterations in dendrite- and spine-associated proteins in dopamine-rich areas of the primate cerebral cortex. *Biol. Psychiatry* 49, 1-12.
- López, A., Mendieta, L., Prades, R., Royo, S., Tarragó, T., Giralt, E., 2013. Peptide POP inhibitors for the treatment of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Future Med. Chem.* 5 (13), 1509-1523.
- McCutcheon, R.A., Reis Marques, T., Howes, O.D., 2019. Schizophrenia-an overview. *JAMA Psychiatry* 1-10. doi:10.1001/jamapsychiatry.2019.3360.
- Meshul, C.K., Janowsky, A., Casey, D.E., Stallbaumer, R.K., Taylor, B., 1992. Effect of haloperidol and clozapine on the density of "perforated" synapses in caudate, nucleus accumbens, and

- medial prefrontal cortex. *Psychopharmacol. Berl.* 106, 45-52. doi:10.1007/bf02253587.
- Muly, E.C., Smith, Y., Allen, P., Greengard, P., 2004. Subcellular distribution of spinophilin immunolabeling in primate prefrontal cortex: localization to and within dendritic spines. *J. Comp. Neurol.* 469, 185-197. doi:10.1002/cne.11001.
- Olszewski, R.T., Janczura, K.J., Ball, S.R., Madore, J.C., Lavin, K.M., Lee, J.C.-M., Lee, M.J., Der, E.K., Hark, T.J., Farago, P.R., Profaci, C.P., Bzdega, T., Neale, J.H., 2012. NAAAG peptidase inhibitors block cognitive deficit induced by MK-801 and motor activation induced by  $\alpha$ -amphetamine in animal models of schizophrenia. *Transl. Psychiatry* 2 (7), e145.
- Olszewski, R.T., Węgorzewska, M.M., Monteiro, A.C., Krolkowski, K.A., Zhou, J., Kozikowski, A.P., Long, K., Mastropalo, J., Deutsch, S.I., Neale, J.H., 2008. PCP and MK-801 induced behaviors reduced by NAAAG peptidase inhibition via metabotropic glutamate receptors. *Biol. Psychiatry* 63 (1), 86-91.
- Ouimet, C.C., Katona, I., Allen, P., Freund, T.F., Greengard, P., 2004. Cellular and subcellular distribution of spinophilin, a PP1 regulatory protein that bundles F-actin in dendritic spines. *J. Comp. Neurol.* 479, 374-388. doi:10.1002/cne.20313.
- Pintana, H., Apaajal, N., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S.C., 2013. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of insulin-resistant rats. *J. Endocrinol.* 218, 1-11.
- Prades, R., Munarriz-Cuezva, E., Urigüen, L., Gil-Pisa, I., Gómez, L., Mendieta, L., Royo, S., Giral, E., Tarragó, E., Meana, J.J., 2017. The prolyl oligopeptidase inhibitor IPR19 ameliorates cognitive deficits in mouse models of schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27 (2), 180-191.
- Richman, J.G., Brady, A.E., Wang, Q., Hensel, J.L., Colbran, R.J., Limbird, L.E., 2001. Agonist-regulated interaction between  $\alpha 2$ -adrenergic receptors and spinophilin. *J. Biol. Chem.* 276, 15003-15008. doi:10.1074/jbc.M011679200.
- Salek, A.B., Edler, M.C., McBride, J.P., Baucum, A.J., 2019. Spinophilin regulates phosphorylation and interactions of the GluN2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Neurochem.* doi:10.1111/jnc.14831.
- Sarpal, D.K., Robinson, D.G., Lencz, T., Argyelan, M., Ikuta, T., Kartsgodt, K., Gallego, J.A., Kane, J.M., Szeszko, P.R., Malhotra, A.K., 2015. Antipsychotic treatment and functional connectivity of the striatum in first-episode schizophrenia. *JAMA Psychiatry* 72, 5-13. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.1734.
- Sarrouilhe, D., di Tommaso, A., Métafé, T., Ladeveze, V., 2006. Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie* 88, 1099-1113. doi:10.1016/j.biochi.2006.04.010.
- Satoh, A., Nakanishi, H., Obaishi, H., Wada, M., Takahashi, K., Satoh, K., Hirao, K., Nishioka, H., Hata, Y., Mizoguchi, A., Takai, Y., 1998. Neurabin-II/spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J. Biol. Chem.* 273, 3470-3475.
- Seeman, P., 1988. Tardive dyskinesia, dopamine receptors, and neuroleptic damage to cell membranes. *J. Clin. Psychopharmacol.* 8, 35-95. doi:10.1097/00004714-198808001-00002.
- Selemon, L.D., Rajkowska, G., Goldman-Rakic, P.S., 1995. Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 805-818. doi:10.1001/archpsyc.1995.03950220015005.
- Smith, F.D., Oxford, G.S., Milgram, S.L., 1999. Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein. *J. Biol. Chem.* 274, 19894-19900.
- Sweet, R.A., Henteleff, R.A., Zhang, W., Sampson, A.R., Lewis, D.A., 2009. Reduced dendritic spine density in auditory cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34, 374-389. doi:10.1038/npp.2008.67.
- Tsukada, M., Prokscha, A., Oldekamp, J., Eichele, G., 2003. Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mech. Dev.* 120, 1033-1043.
- Uranova, N.A., Casanova, M.F., DeVaughn, N.M., Orlovskaya, D.D., Denisov, D.V., 1996. Ultrastructural alterations of synaptic contacts and astrocytes in postmortem caudate nucleus of schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* 22, 81-83. doi:10.1016/0920-9964(96)00059-x.
- Uranova, N.A., Orlovskaya, D.D., Apel, K., Klitsova, A.J., Haselhorst, U., Schenk, H., 1991. Morphometric study of synaptic patterns in the rat caudate nucleus and hippocampus under haloperidol treatment. *Synapse* 7, 253-259. doi:10.1002/syn.890070402.
- van Os, J., Kapur, S., 2009. Schizophrenia. *Lancet Lond. Engl.* 374, 635-645. doi:10.1016/S0140-6736(09)60995-8.
- Vincent, S.L., Adamec, E., Sorensen, I., Benes, F.M., 1994. The effects of chronic haloperidol administration on GABA-immunoreactive axon terminals in rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 17, 26-35. doi:10.1002/syn.890170104.
- Vincent, S.L., McSparren, J., Wang, R.Y., Benes, F.M., 1991. Evidence for ultrastructural changes in cortical axodendritic synapses following long-term treatment with haloperidol or clozapine. *Neuropsychopharmacology* 5, 147-155.
- Wang, Q., Zhao, J., Brady, A.E., Feng, J., Allen, P.B., Lefkowitz, R.J., Greengard, P., Limbird, L.E., 2004. Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors. *Science* 304, 1940-1944. doi:10.1126/science.1098274.
- Weickert, C.S., Straub, R.E., McClintock, B.W., Matsumoto, M., Hashimoto, R., Hyde, T.M., Herman, M.M., Weinberger, D.R., Kleinman, J.E., 2004. Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 544-555. doi:10.1001/archpsyc.61.6.544.
- Woodward, N.D., Purdon, S.E., Meltzer, H.Y., Zald, D.H., 2005. A meta-analysis of neuropsychological change to clozapine, olanzapine, quetiapine, and risperidone in schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 8, 457-472. doi:10.1017/S146114570500516X.
- Yan, Z., Hsieh-Wilson, L., Feng, J., Tomizawa, K., Allen, P.B., Fienberg, A.A., Nairn, A.C., Greengard, P., 1999. Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat. Neurosci.* 2, 13-17. doi:10.1038/4516.
- Yin, D.-M., Chen, Y.-J., Sathyamurthy, A., Xiong, W.-C., Mei, L., 2012. Synaptic dysfunction in schizophrenia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970, 493-516. doi:10.1007/978-3-7091-0932-8\_22.
- Zuo, D., Bzdega, T., Olszewski, R.T., Moffett, J.R., Neale, J.H., 2012. Effects of N-Acetylaspartylglutamate (NAAAG) peptidase inhibition on release of glutamate and dopamine in prefrontal cortex and nucleus accumbens in phencyclidine model of Schizophrenia. *J. Biol. Chem.* 287 (26), 21773-21782.





## Discusión

---



A continuación se presenta una discusión general de los hallazgos mostrados en esta Tesis Doctoral.

### **1. DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS $\alpha_{2A}$ Y $\alpha_{2C}$ EN DISTINTAS FRACCIONES SINÁPTICAS DE LA CPF HUMANA**

Existen divergencias respecto a la localización de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  en la corteza cerebral. Así, en la corteza de ratón se ha descrito que el receptor adrenérgico predominante en la presinapsis es el subtipo  $\alpha_{2A}$  (Bücheler et al, 2002; Limberger et al, 1995). Sin embargo, también hay presencia del subtipo  $\alpha_{2C}$ , puesto que ratones KO para los  $\alpha_{2C}$ -AR mostraron alteraciones en las funciones mediadas por los receptores adrenérgicos presinápticos (Trendelenburg et al, 2001). En la CPF de primates se estableció que el subtipo predominante, por no decir casi exclusivo, era el  $\alpha_{2A}$ -AR (Aoki et al, 1998). Por su parte, inicialmente se pensaba que el  $\alpha_{2A}$ -AR era el único subtipo presente en la CPF humana, ya que los radioligandos usados solamente podían diferenciar entre los subtipos  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2B}$  (De Vos et al, 1992). No obstante, estudios posteriores de fijación de radioligandos con diferentes fármacos selectivos establecieron la existencia de los tres subtipos de  $\alpha_2$ -AR ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ ) y su proporción en diferentes regiones del encéfalo humano (Bylund, 1992, Sastre & García-Sevilla, 1994). También se pudieron realizar estudios de autoradiografía en cerebro humano *postmortem* (Grijalba et al, 1996; Ordway et al, 1993) o estudios de neuroimagen en sujetos vivos (Lehto et al, 2015). Estos estudios demostraron que el  $\alpha_{2A}$ -AR es el subtipo mayoritario en la CPF humana, aunque también se observó la existencia del subtipo  $\alpha_{2C}$ -AR en esta misma región (Grijalba et al, 1996; Lehto et al, 2015; Sastre & García-Sevilla, 1994). Sin embargo, el estudio incluido en esta Tesis Doctoral es el primero, bajo nuestro conocimiento, que estudia una distribución de los  $\alpha_{2A}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR en las fracciones presináptica y postsináptica de la CPFDL humana. Para ello se han utilizado anticuerpos específicos para cada subtipo, validándolos tanto en células que expresan los distintos subtipos de  $\alpha_2$ -AR humanos como en regiones cerebrales con distinta expresión relativa para los dos subtipos. Este estudio nos permitió determinar que los  $\alpha_{2C}$ -AR tienen una distribución similar en ambas fracciones (~40% PSD vs ~60% Pre) mientras que los  $\alpha_{2A}$ -AR tienen una localización mayoritariamente postsináptica (~95% PSD vs ~5% Pre) (Resultados- Artículo 1).

Gracias a las observaciones de los  $\alpha_2$ -AR en la CPF humana mostradas en estudios previos y la nueva distribución descrita en nuestro estudio (Resultados- Artículo 1), tenemos un mayor conocimiento de la localización exacta de estos receptores en esta región cerebral. Comparando los resultados expuestos en nuestro estudio con estudios previos vemos que la distribución sináptica de los subtipos de  $\alpha_2$ -AR parece ser diferente según la especie, la región del encéfalo y la capa cortical que se analice (Aoki et al, 1998; Bücheler et al, 2002; Lee et al, 1998a; Lee et al, 1998b; Pazos et al, 1988; Ruuskanen et al, 2005). En primate se ha observado una distribución

similar en todas las capas de la CPF (Aoki et al, 1998), mientras que en humano se ha visto mayor presencia en las capas I y la III, y en rata se ha detectado mayor presencia en las capas I y IV-V (Pazos et al, 1988).

Además, es importante conocer la distribución presináptica y postsináptica de los  $\alpha_2$ -AR ya que tienen funciones diferentes. Los  $\alpha_2$ -AR presinápticos, cuando se activan, tienen efecto sobre la sedación, modulación del dolor, hipotermia y efectos cardiovasculares como la regulación de la presión sanguínea. Sin embargo, al activarse los  $\alpha_2$ -AR postsinápticos intervienen en la consolidación de la memoria de trabajo (Gilsbach et al, 2011). También es importante conocer qué subtipo de  $\alpha_2$ -AR está implicado en cada una de las diferentes funciones fisiológicas mediadas por estos receptores. Así, los  $\alpha_{2A}$ -AR parecen estar implicados en el control de la sedación, antinocicepción, bradicardia y la consolidación de la memoria de trabajo (Gilsbach et al, 2011; Philipp et al, 2002). Mientras que los  $\alpha_{2C}$ -AR parecen estar más relacionados con la regulación de la liberación de catecolaminas en la glándula adrenal, y la disminución de su funcionalidad puede llevar a una hipertensión crónica que desemboque en una hipertrofia y fallo cardíaco (Gilsbach et al, 2011). Además este subtipo está involucrado en la regulación del procesamiento de la información sensorial (Philipp et al, 2002). Sin embargo, parece que ambos subtipos, a nivel presináptico, están involucrados en la inhibición de la liberación de NA mediante un *feedback* negativo y, también, intervienen en la regulación de la liberación de otras catecolaminas (Brede et al, 2004; Fornai et al, 1990; Gilsbach et al, 2011; Philipp et al, 2002).

Por estas razones el conocimiento de la distribución exacta de los  $\alpha_{2A}$ -AR y los  $\alpha_{2C}$ -AR, en las diferentes fracciones sinápticas, puede ayudar a establecer, de una manera más precisa, las funciones y mecanismos moleculares desencadenados por cada subtipo de  $\alpha_2$ -AR. Esto podría ayudar a entender mejor las bases biológicas de enfermedades psiquiátricas, como la esquizofrenia, y mejorar el tratamiento de dichas patologías (Uys et al, 2017b).

## **2. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS $A_{2A}$ Y $A_{2C}$ EN LA CPF DE SUJETOS CON ESQUIZOFRENIA**

En el trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral se ha demostrado un aumento de la expresión proteica de los  $\alpha_{2A}$ -AR en la región postsináptica y en la fracción enriquecida en sinaptosomas de la CPFDL de sujetos con esquizofrenia con antipsicóticos en sangre (Resultados- Artículo 2). Estos resultados se contraponen a estudios previos que no mostraron ningún cambio en la expresión proteica de los  $\alpha_2$ -AR en la CPF de sujetos con esquizofrenia (Dean, 2003; Klimek et al, 1999). En el primer estudio se determinó la densidad de receptores mediante la fijación del radioligando [ $^3$ H]RX821002, antagonista con afinidad similar por los diferentes subtipos de  $\alpha_2$ -AR, en homogeneizados cerebrales del área 9 de Brodmann (Dean, 2003). Mientras, en el otro estudio se usó el radioligando p-[ $^{125}$ I]-iodoclonidina, agonista con

afinidad parecida para todos los subtipos  $\alpha_2$ -AR, en un estudio de autoradiografía en el área 10 de Broddman (Klimek et al, 1999). A diferencia de estos dos estudios donde se utilizaron radioligandos, en nuestro estudio medimos la expresión proteica de los receptores  $\alpha_{2A}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR a través de la técnica de western blot, con anticuerpos selectivos para cada uno de estos subtipos, en las fracciones presináptica, postsináptica y enriquecida en sinaptosomas. Es importante mencionar que, en estos estudios previos, no se analizó ninguna diferencia por subtipo ni por la localización de los  $\alpha_2$ -AR, por lo que los resultados obtenidos reflejarían la suma de los distintos subtipos de  $\alpha_2$ -AR localizados en las membranas presináptica y postsináptica. Por lo tanto, la falta de diferenciación entre los subtipos de  $\alpha_2$ -AR y su localización pueden ser los responsables de la diferencia de resultados entre los estudios previos y el realizado en este trabajo.

El aumento de expresión de los  $\alpha_{2A}$ -AR descrito en la presente Tesis Doctoral puede responder a un proceso de regulación a la alta, consecuencia del efecto antagonista sobre los  $\alpha_2$ -AR de algunos fármacos antipsicóticos (Richelson & Souder, 2000). Este tipo de mecanismos regulatorios ya se han observado tras un tratamiento crónico con clozapina en ratas, donde se registró una disminución en la expresión de los  $\alpha_1$ -AR en la corteza frontal (Cahir et al, 2004). Por el contrario, no observamos cambios significativos en la expresión de los  $\alpha_{2C}$ -AR en la CPFDL de sujetos con esquizofrenia (Resultados- Artículo 2). Esta ausencia de alteraciones en la expresión de los  $\alpha_{2C}$ -AR puede sorprendernos dado que la mayoría de antipsicóticos muestran una mayor afinidad por este subtipo de  $\alpha_2$ -AR (Brosda et al, 2014). Sin embargo, el efecto autoregulatorio antes sugerido podría mostrar cambios más significativos en los  $\alpha_{2A}$ -AR, ya que es el subtipo de  $\alpha_2$ -AR más numeroso en la CPFDL (Resultados- Artículo 1) (Grijalba et al, 1996). Aun así, cabe destacar que el subtipo  $\alpha_{2C}$ -AR también muestra una tendencia a estar aumentado en los sujetos con esquizofrenia que tenían antipsicóticos en sangre, sobre todo, en la región postsináptica, pero sin ser estadísticamente significativo (Resultados- Artículo 2). Por ello, dada la escasa presencia del subtipo  $\alpha_{2C}$ -AR en la CPFDL humana, seguramente sería necesario comparar un número mucho mayor de sujetos para poder alcanzar un aumento de expresión estadísticamente significativo. Por desgracia dicha posibilidad es difícil tratándose de muestras cerebrales humanas *postmortem*.

En la presente Tesis doctoral se quiso estudiar la funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR para determinar si existía una alteración de dicha funcionalidad en la esquizofrenia y si el tratamiento antipsicótico podía modificarla. En este estudio se utilizó el ligando UK14304, agonista  $\alpha_2$ -AR no selectivo por ningún subtipo de  $\alpha_2$ -AR. Los  $\alpha_2$ -AR son receptores acoplados principalmente a proteínas  $G\alpha_{i/o}$ , pero pueden señalar, además, a través de otros tipos de proteínas  $G\alpha$ , dependiendo del ligando que se una al receptor. Bajo esta premisa, realizamos inicialmente un estudio de caracterización de la funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR en muestras controles, tras su

activación por UK14304. En este estudio se vio que había un aumento significativo de la señalización a través de las proteínas  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  y  $G\alpha_o$  y una tendencia aumentada, pero sin ser significativa, a través de las proteínas  $G\alpha_s$  (Resultados-Artículo 2). De este modo, en nuestro estudio no observamos señalización de estos receptores a través de las proteínas  $G\alpha_s$ , a diferencia de lo reflejado en otros estudios (Eason et al, 1992; Eason et al, 1994; Eason & Liggett, 1995). Estos estudios anteriores midieron la activación de las proteínas  $G\alpha$  de manera indirecta, a través de la actividad de la AC y la acumulación de AMPc. Estas acciones moleculares son desencadenadas por la activación de las proteínas  $G\alpha_s$ , mientras que la activación de las proteínas  $G\alpha_i$  inhibiría la AC y disminuiría la concentración de AMPc (Albarrán-Juárez et al, 2009). En contraposición, en nuestro trabajo, se realizó el análisis directo de la activación de diferentes tipos de proteínas  $G\alpha$  mediante la técnica de SPA, combinando anticuerpos específicos para cada subtipo de proteínas  $G\alpha$  con un ensayo de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S. Además, en los estudios previos dicha actividad se analizó en líneas celulares transfectadas con los diferentes subtipos de  $\alpha_2$ -AR humanos. En nuestro estudio no podemos saber en qué subtipo concreto de  $\alpha_2$ -AR estamos midiendo la funcionalidad ya que se ha realizado en una fracción rica en membranas de la CPFDL humana *postmortem*, donde la principal presencia es de  $\alpha_{2A}$ -AR, pero también hay  $\alpha_{2C}$ -AR. Eason y colaboradores observaron que los  $\alpha_{2A}$ -AR tenían una capacidad de unión a las proteínas  $G\alpha_{i/o}$  y a las  $G\alpha_s$  similar, mientras que los  $\alpha_{2C}$ -AR tenían mayor capacidad de unión a las proteínas  $G\alpha_{i/o}$  (Eason et al, 1992). En nuestro estudio no se pudo diferenciar entre los subtipos de  $\alpha_2$ -AR por lo que la señalización a través de las proteínas  $G\alpha_s$  pudo verse diluida y, puede que por esta razón, no se observara la activación de dichas proteínas  $G\alpha_s$ .

En contraposición, sí vimos que había una señalización de los  $\alpha_2$ -AR a través de las proteínas  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  y  $G\alpha_o$ . Esta señalización se vio disminuida en los sujetos con esquizofrenia (Resultados- Artículo 2) y, bajo nuestro conocimiento, es la primera vez que esto se ha observado. Previamente a este trabajo se describió que la unión de los  $\alpha_2$ -AR con las proteínas  $G\alpha_{i/o}$  activa funciones diferentes según la localización subcelular de estos receptores. A nivel presináptico esta señalización inhibe la neurotransmisión a través de la inhibición de la síntesis de NA y de su liberación al espacio sináptico (Cottingham & Wang, 2012; Langer, 1980; Philipp et al, 2002; Schlicker & Feuerstein, 2017). Mientras que a nivel postsináptico facilita la transmisión excitatoria dependiente de NA en la CPF mediante los canales HCN (Wang et al, 2007a). No obstante, en condiciones patológicas, como el estrés, esta señalización puede verse alterada de manera que se restringe la señalización excitatoria de los  $\alpha_2$ -AR en la CPF vía Gi-AMPc-PKA-CaMKII-AMPA (Yi et al, 2013). La alteración de la funcionalidad de estos  $\alpha_2$ -AR puede modificar la señalización noradrenérgica de la CPF y, con ello, causar los déficits cognitivos reportados en la esquizofrenia. En esta línea, Franowicz y colaboradores observaron cómo una pérdida de la funcionalidad de los  $\alpha_{2A}$ -AR, pero no de los  $\alpha_{2C}$ -AR, debilitaba las tareas

de la corteza frontal en ratones (Franowicz et al, 2002). En nuestro estudio no podemos establecer a qué subtipo de  $\alpha_2$ -AR corresponde esta pérdida de funcionalidad debido a que el agonista UK14304 tiene una afinidad similar por los  $\alpha_{2A}$ -AR y los  $\alpha_{2C}$ -AR. Sin embargo, teniendo en cuenta el porcentaje de cada uno de estos subtipos en la CPFDL, los  $\alpha_{2A}$ -AR podrían ser los que sufrieran estas alteraciones observadas, ya que este subtipo representa el ~87% del total de los  $\alpha_2$ -AR en esta región (Bücheler et al, 2002; Grijalba et al, 1996). Por ello, se justificaría que un aumento en la actividad de los  $\alpha_{2A}$ -AR postsinápticos en la CPFDL podría mejorar los síntomas cognitivos en esquizofrenia, tal y como se ha descrito en primates (Arnsten & Goldman-Rakic, 1985).

Debido a la disminución de la funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR observada en nuestro trabajo, se midió la expresión de las proteínas G $\alpha$  para observar si dicha disminución estaba relacionada con una menor expresión de estas proteínas. En consonancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo, estudios realizados en corteza frontal de cerebro humano *postmortem*, observaron una correlación positiva entre la densidad de los  $\alpha_2$ -AR y las proteínas G $\alpha_{i1/2}$ , G $\alpha_{i2}$  y G $\beta$ , pero no con las proteínas G $\alpha_{i3}$  (Sastre et al, 2001). No obstante, en el presente trabajo vimos que la disminución en la funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR no va acompañada de una disminución en la expresión proteica de las proteínas G $\alpha$ . Estudios previos no han sugerido ningún cambio de expresión de las proteínas G $\alpha_{i2}$ , G $\alpha_0$  (Okada et al, 1994), G $\alpha_{i1}$  ni G $\alpha_{q/11}$  (García-Bea et al, 2019) en sujetos con esquizofrenia. Por contra, en nuestro estudio observamos un aumento de expresión de las proteínas G $\alpha_{i2}$  y G $\alpha_0$  en la fracción postsináptica de sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre, y un aumento de las proteínas G $\alpha_0$  en la fracción presináptica de los sujetos con esquizofrenia sin antipsicóticos en sangre (Resultados- Artículo 2). Una de las razones de esta aparente discrepancia entre los estudios que analizaron previamente la expresión de proteínas G $\alpha$  en sujetos con esquizofrenia y el presentado en este trabajo, podría ser debido a la fracción subcelular analizada. En los estudios previos se midió la expresión de dichas proteínas en la fracción rica en membranas (Okada et al, 1994; García-Bea et al, 2019), mientras que en nuestro trabajo se realizó en la fracción presináptica y en la fracción postsináptica. Por lo tanto, la diferencia en los resultados se podría explicar por la utilización de diferentes preparaciones del tejido humano *postmortem*. Estos cambios de expresión, según la fracción subcelular, podrían indicarnos que hay diferentes mecanismos regulatorios sobre los  $\alpha_2$ -AR dependientes de su localización.

La disminución de la señalización a través de las proteínas G $\alpha_{i2}$  y G $\alpha_{i3}$  observada en el presente trabajo parece ser consecuencia del tratamiento antipsicótico (Resultados- Artículo 2). Eason y colaboradores observaron que un tratamiento a largo plazo con un agonista  $\alpha_2$ -AR en un cultivo celular causaba una desensibilización en dichos receptores. Esta desensibilización se produjo antes en los  $\alpha_{2A}$ -AR que en los  $\alpha_{2C}$ -AR, y estaba acompañada de una reducción en la

densidad de los  $\alpha_{2A}$ -AR, mientras que no hubo cambio en la densidad de los  $\alpha_{2C}$ -AR. Además, se vio una disminución de las proteínas  $G\alpha_i$  (Eason & Liggett, 1992). En nuestro estudio, el tratamiento crónico se realizó con antipsicóticos, que actúan como antagonistas de los  $\alpha_2$ -AR, por lo que podría dar lugar al efecto contrario, desembocando en un aumento de la densidad de los  $\alpha_{2A}$ -AR y de las proteínas  $G\alpha_{i2}$  y  $G\alpha_o$  (Resultados-Artículo 2). Este efecto podría ser una respuesta compensatoria al antagonismo a largo plazo sobre los  $\alpha_2$ -AR produciendo una regulación al alza de estos.

En el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral el factor suicidio podría suponer un sesgo para los resultados de expresión de  $\alpha_2$ -AR, dado que hay un porcentaje elevado de los sujetos con esquizofrenia que cometieron suicidio. Sin embargo, la proporción de suicidios entre sujetos con esquizofrenia con antipsicóticos en sangre o sin presencia de ellos es muy similar (7 de 12 frente a 10 de 12) y no da lugar a diferencias significativas entre subgrupos que puedan considerarlo un factor de confusión. Varios estudios realizados con sujetos con alguna patología psiquiátrica y que fallecieron por suicidio, observaron una alteración en la densidad (Callado et al, 1998; González et al, 1994; Meana & García-Sevilla, 1987; Meana et al, 1992; Ordway et al, 1994; De Paermentier et al, 1997) y en la funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR (González-Maeso et al, 2002; Valdizán et al, 2010). Sin embargo, en estos estudios observaron que las alteraciones estaban relacionadas con el diagnóstico de depresión, no con el factor suicidio. Además, en otro estudio se analizó la densidad y afinidad de los  $\alpha_2$ -AR en cerebros de sujetos fallecidos por suicidio sin patología psiquiátrica conocida y no obtuvieron ninguna diferencia significativa con los sujetos control (Sastre et al, 2001). Por lo tanto, las alteraciones de expresión y funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR parecen estar relacionadas con las patologías psiquiátricas específicas y no con el suicidio.

Sabemos que los  $\alpha_{2A}$ -AR se han visto alterados en otras patologías psiquiátricas, como la depresión, por lo que las alteraciones vistas en este trabajo podrían no ser exclusivas de la esquizofrenia. Sin embargo, en estudios realizados con sujetos que padecían depresión se vio un aumento de la funcionalidad de los  $\alpha_{2A}$ -AR en CPF (González-Maeso et al, 2002; Valdizán et al, 2010) y un aumento de la expresión de los  $\alpha_2$ -AR (Callado et al, 1998; García-Sevilla et al, 1999; Rivero et al, 2014), que parecía revertirse por el tratamiento antidepresivo (Rivero et al, 2014). En nuestro estudio, en contraposición a estos resultados, vemos que hay una disminución de la funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR en esquizofrenia y que el aumento de expresión de los  $\alpha_{2A}$ -AR es debido al tratamiento antipsicótico (Resultados- Artículo 2). Por lo tanto, esta comparativa puede indicarnos que los resultados obtenidos en este trabajo son propios de la esquizofrenia y no se deben a alteraciones comunes con otras patologías psiquiátricas como la depresión.

Es preciso recordar que existen numerosos estudios que muestran una relación entre los  $\alpha_2$ -AR y la cognición (Arnsten & Goldman-Rakic, 1985; Franowicz & Arnsten, 1999; Wang et al,



2007a), por lo que la alteración de dichos receptores podría estar involucrada en los déficits cognitivos observados en la esquizofrenia. La prueba de la IPP, utilizada tanto en humanos como en modelos animales, parece estar modulada por actividades que se integran en la CPF de los humanos (Tóth et al, 2017). Tanto sujetos con esquizofrenia como ratones KO para los  $\alpha_{2C}$ -AR, no respondieron a la IPP (Braff et al, 2001; Sallinen et al, 1998; Tóth et al, 2017). En contraposición, los ratones KO para  $\alpha_{2A}$ -AR lo hicieron de una manera exagerada (Sallinen et al, 1998). No obstante, el uso de clozapina revirtió las alteraciones vistas en los ratones KO para  $\alpha_{2C}$ -AR, mientras que la combinación de risperidona y clonidina lo hizo en los ratones KO para  $\alpha_{2A}$ -AR (Le Pen & Moreau, 2002). Esta reversión se podría producir por el bloqueo de los  $\alpha_{2C}$ -AR presinápticos, inducido por los antipsicóticos, que disminuiría la inhibición sobre la liberación de neurotransmisores como la NA. Por su parte, la clonidina podría estimular los  $\alpha_{2A}$ -AR postsinápticos, lo que aumentaría la excitabilidad neuronal mejorando procesos cognitivos (Berridge & Devilbiss, 2011; Galeotti et al, 2004). Por tanto, es importante tener en cuenta la localización sináptica de estos receptores y las células en las que estos se expresan en la CPFDL, para valorar tanto su posible implicación en las funciones cognitivas como para la acción de posibles nuevos tratamientos frente a los síntomas cognitivos. Por consiguiente, el desarrollo de nuevos fármacos que presenten agonismo sobre los  $\alpha_{2A}$ -AR postsinápticos (Betti et al, 2019) y antagonismo frente a los  $\alpha_{2C}$ -AR presinápticos (Uys et al, 2017b) podría ser una estrategia prometedora para mejorar las alteraciones cognitivas en la esquizofrenia.

### **3. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y EPIGENÉTICA DE LOS GENES ADRA2A Y ADRA2C EN LA CPF DE SUJETOS CON ESQUIZOFRENIA**

En esta Tesis Doctoral se quiso estudiar la existencia de posibles alteraciones tanto en el ARNm de los genes ADRA2A y ADRA2C como en la regulación epigenética de sus promotores, ya que no existen, bajo nuestro conocimiento, estudios previos que lo analicen. A raíz de este estudio se observó un aumento de expresión en el ARNm del ADRA2A en los sujetos con esquizofrenia con antipsicóticos en sangre (Resultados- Artículo 3), lo que se corresponde con el aumento de la expresión proteica de los  $\alpha_{2A}$ -AR en estos mismos sujetos (Resultados- Artículo 2). Estos resultados sugieren que el uso de fármacos antipsicóticos parece aumentar la transcripción del gen ADRA2A y su traducción a  $\alpha_{2A}$ -AR en sujetos que padecen esquizofrenia. Sin embargo, el aumento del ARNm de ADRA2C visto en este trabajo (Resultados- Artículo 3) no se acompañó de un aumento significativo de la expresión proteica de  $\alpha_{2C}$ -AR (Resultados- Artículo 2), aunque se pudo observar una tendencia a una mayor expresión proteica de estos receptores. Este aumento del ARNm del ADRA2C puede acompañarse de mecanismos regulatorios postranscripcionales que hagan que el mismo no se traslade a la expresión proteica de los  $\alpha_{2C}$ -AR, como ya se ha observado para diferentes genes en humano (Jiang et al, 2020). Esta interrupción de la traducción del ARNm puede ser causada por diferentes mecanismos, como

puede ser una salida errática del ARNm del núcleo al citosol, donde se une toda la maquinaria necesaria para que se produzca dicha traducción, (Besse & Ephrussi, 2008) o la unión de ARNm o ARNs al ARNm en el citosol, impidiendo que se unan los ribosomas al ARNm y puedan traducirlo (Deng et al, 2008; Latchman, 2010). Esta diferencia regulatoria entre el ARNm del ADRA2A y el del ADRA2C puede deberse también a una mayor alteración en el ADRA2C por parte de los antipsicóticos, ya que tienen una mayor afinidad por los  $\alpha_{2C}$ -AR, por lo que quizás se necesitaría estar más tiempo medicados para ver esta regulación posttranscripcional sobre el ARNm del ADRA2A.

Para comprobar las alteraciones que pueden causar los antipsicóticos en el ARNm de ADRA2A y ADRA2C, se analizaron estos ARNm en ratas tratadas de forma aguda o crónica con antipsicóticos. En estas muestras vimos que el ARNm del ADRA2C estaba aumentado de manera significativa tras un tratamiento con clozapina, tanto de forma crónica como aguda (Resultados- Artículo 3). Estos resultados pueden indicar que este antipsicótico altera de manera rápida la expresión de este ARNm y que dicha alteración se mantiene en el tiempo. Sin embargo, el ARNm de ADRA2A en estas mismas ratas tratadas no mostró ningún cambio significativo (Resultados- Artículo 3). Estos resultados se contraponen con los obtenidos a partir de la CPFDL humana en este trabajo, donde se vio un aumento de expresión del ARNm del ADRA2A en los sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre (Resultados- Artículo 3). Los resultados obtenidos con el ARNm de humano concuerdan con el aumento de la expresión proteica de  $\alpha_{2A}$ -AR que vemos en este trabajo (Resultados- Artículo 2). Estos resultados podrían indicarnos que, el tratamiento con antipsicóticos sería el desencadenante del aumento de expresión del ARNm de ADRA2A y de la expresión proteica de los  $\alpha_{2A}$ -AR en sujetos que tienen alteraciones neurobiológicas propias de la esquizofrenia. En contraposición, el aumento del ARNm de ADRA2C visto en las ratas tratadas también se observa en el ARNm del ADRA2C estudiado en los sujetos con esquizofrenia (Material suplementario- Artículo 3), sin embargo este aumento no aparece en los sujetos con esquizofrenia que presentan antipsicóticos en sangre. Estos resultados podrían parecerse contradictorios. No obstante, cabe recordar que los sujetos incluidos en nuestro estudio que no mostraron antipsicóticos en sangre en el momento de la autopsia no significa que no hayan estado tratados previamente. De estos sujetos desconocemos por completo durante cuánto tiempo estuvieron medicados, con qué antipsicóticos y cuánto tiempo llevaban sin estar tratados. Además, como ya se ha comentado anteriormente, los fármacos antipsicóticos tienen una mayor afinidad por los  $\alpha_{2C}$ -AR, y esto podría causar un efecto más potente o más rápido en los mecanismos regulatorios de estos receptores.

Para controlar si el suicidio podía estar actuando como un factor de confusión, en este estudio se realizó una comparativa de la expresión del ARNm de ADRA2A y ADRA2C entre una cohorte de sujetos con depresión fallecidos por suicidio y la cohorte de sujetos con esquizofrenia, dónde

una gran parte cometieron suicidio. Se escogió esta población comparativa ya que se ha descrito un aumento del ARNm del ADRA2A y de su expresión proteica en sujetos con depresión que cometieron suicidio (Escribá et al, 2004). En la cohorte de sujetos con depresión y sujetos controles no se encontró ningún cambio significativo (Resultados- Artículo 3) a diferencia de lo que vieron Escribá y colaboradores. Esta diferencia podría estar relacionada con el sexo, aunque hasta ahora no se hayan descrito alteraciones relacionadas con el sexo, ya que en nuestra población hay un mayor porcentaje de mujeres (61%) y en su estudio hay un porcentaje mayor de hombres (67%). Cabe destacar que en la mayor parte de estudios de depresión hay un porcentaje mayor de mujeres, dado que presentan una mayor prevalencia de esta patología. Las diferencias entre los dos estudio podrían deberse también al método de extracción de ARN de las muestras ya que puede darse una eficiencia diferente debido al uso de distintos kits de extracción o de sondas que marcan secuencias diferentes dentro del ARNm del ADRA2A. Por lo tanto, los cambios descritos anteriormente en la cohorte de esquizofrenia no parecen deberse a un factor de confusión debido al suicidio, sino a cambios propios de la patología. Además, en un estudio que analizó la relación entre numerosos genes y posibles comportamientos suicidas, se determinó que el ADRA2A no parecía ser un gen que estuviera relacionado con este tipo de comportamientos (Sokolowski & Wasserman, 2020).

Con el objetivo de profundizar más en los posibles mecanismos regulatorios de la expresión de los  $\alpha_2$ -AR, se estudiaron diversas marcas epigenéticas que regulan los promotores de los genes ADRA2A y ADRA2C, aunque dichas marcas epigenéticas no sean los únicos mecanismos regulatorios de estos genes. Algunos ejemplos de regulación epigenética no incluidos en este estudio son la metilación del ADN (Nestler et al, 2016), la remodelación de cromatina llevada a cabo por proteínas dependientes de ATP (Maze et al, 2013) o el efecto regulatorio del ARN asociado a cromatina, como puede ser el ARN no codificante (Mitchell et al, 2014).

Por una parte, se vio que la convivencia de la marca epigenética permisiva H3K4me3 y la marca represiva H3K27me3 en un promotor rico en islas CpG, como el ADRA2A (Resultados- Artículo 3), se puede dar en el fenómeno conocido como cromatina bivalente (explicado en el apartado 1.6.1.) (Court & Arnaud, 2017). La presencia aumentada de la marca permisiva AcH4K16 provoca una mayor transcripción del gen ADRA2A. Además, la marca epigenética AcH4K16 es predominante en la histona H4, por lo que tiene un efecto sobre las acetilaciones en K5, K8 y K12 de esta misma histona (Dion et al, 2005). A pesar de no estar seguros de estar midiendo las modificaciones epigenéticas en las mismas células, lo que sí pudimos ver es que existe una correlación positiva entre las marcas H3K4me3 y H3K27me3 (Resultados- Artículo 3). Esto nos indica que tienen una influencia la una sobre la otra y puede darse el efecto de cromatina bivalente en el promotor del gen ADRA2A.

Por otra parte, en el promotor del gen ADRA2C, observando las subpoblaciones de los sujetos con esquizofrenia, se vio que los sujetos con antipsicóticos en sangre mostraban un aumento de expresión de la marca permisiva Ach4K5, mientras que en los que no tenían antipsicóticos en sangre se observaba un aumento de expresión en la marca permisiva Ach3K9 (Resultados- Artículo 3). La falta de correlación entre estas alteraciones en las modificaciones epigenéticas y la transcripción génica en ambas subpoblaciones (sujetos con esquizofrenia con antipsicóticos en sangre o sujetos con esquizofrenia sin antipsicóticos en sangre) puede producirse por la actuación de otras marcas epigenéticas u otros tipos de regulación epigenética que no hemos abordado en este estudio. Esta falta de correlación también se puede deber a que, aunque pensamos que en gran parte hemos medido las marcas epigenéticas en neuronas, no hemos hecho un cribado previo que nos lo asegure.

Previamente se ha visto que los antipsicóticos pueden alterar mecanismos postranscripcionales, causando un aumento de la enzima HDAC2, dando lugar a la hipoacetilación del promotor GRM2 (Kurita et al, 2012), y un aumento de la histona metiltransferasa MLL2, tras un tratamiento con clozapina (Huang et al, 2007). También se ha visto un aumento de la histona metiltransferasa EZH1 en esquizofrenia y que, tras el tratamiento antipsicótico, disminuye (Johnstone et al, 2018). Por lo tanto, sería interesante conocer el efecto que tienen los antipsicóticos sobre la marca epigenética Ach4K5, puesto que en este trabajo hemos visto un aumento significativo en el promotor del gen ADRA2C en los sujetos con antipsicóticos en sangre (Resultados- Artículo 3). Además, es preciso remarcar que no existen apenas estudios previos dónde se analicen marcas epigenéticas en la esquizofrenia y ninguno relacionado con nuestros genes de estudio. Por lo tanto, este trabajo es novedoso y aporta un nuevo punto de vista de lo que puede ocurrir tanto en los promotores de los genes ADRA2A y ADRA2C como en la patología de la esquizofrenia.

#### **4. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE ESPINOFILINA EN CEREBRO HUMANO**

En el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se pudo observar que la espinofilina mostraba, en geles SDS-PAGE, dos bandas específicas (Resultados- Artículo 4). La banda superior tiene un peso molecular mayor del esperado (~120kDa vs 89.5kDa, calculado teóricamente). Esto podría deberse a una leve insolubilidad de la proteína por la región hélice superenrollada (Allen et al, 1997), o porque la zona rica en prolina que tiene en su secuencia dificulta su migración a lo largo del gel SDS-PAGE (Hames, 1998). La banda inferior (~95kDa) aumenta tras sufrir procesos proteolíticos, por lo que parece ser resultado de la proteólisis de la banda más pesada, hallazgo descrito por primera vez en este trabajo (Resultados- Artículo 4). Sin embargo, la distribución de las dos bandas es diferente, tanto a nivel subcelular como en las distintas regiones del encéfalo

(Resultados- Artículo 4), lo que podría indicarnos que podrían tener funciones diferentes o distintas vías de degradación.

La espinofilina es una proteína que sufre procesos de fosforilación y desfosforilación para poder desarrollar diferentes funciones como regular la transmisión sináptica (Grossman et al, 2004) o regular de una manera más eficaz la plasticidad sináptica (Feng et al, 2000; Sarrouilhe et al, 2006). La espinofilina fosforilada se encuentra, principalmente, en membranas de la fracción postsináptica, mientras que la espinofilina desfosforilada tiene una mayor presencia en la fracción citosólica (Hsieh-Wilson et al, 2003). La fosforilación suele producirse por la presencia de otras moléculas, como la proteína PP1 (Muly et al, 2004b), y esto causa una disminución de la interacción de la espinofilina con la actina (Futter et al, 2005; Hsieh-Wilson et al, 2003). No podemos descartar que los procesos de fosforilación y desfosforilación que sufre la espinofilina puedan contribuir a su proteólisis. Las condiciones utilizadas en nuestro estudio no fueron las óptimas para ver diferencias significativas, pero se pudo observar una tendencia proteolítica de la espinofilina por la acción de fosfatasas (Resultados- Artículo 4).

La espinofilina es una proteína que se ha estudiado principalmente en roedores, por lo que la información de su distribución en distintas regiones del encéfalo se ha realizado, hasta ahora, en estas especies animales. La región con mayor expresión de espinofilina en el encéfalo de rata es el hipocampo (Allen et al, 1997), a diferencia de lo que hemos observado en humano, donde muestra una mayor expresión en la CPDFL (Resultados- Artículo 4). Tanto en el caudado como en la corteza se ve una expresión elevada de espinofilina en rata, mientras que el cerebelo e hipocampo muestran una expresión más baja (Ouimet et al, 2004). En contraposición, en el encéfalo de ratón la expresión es más baja en estriado que en hipocampo (Baucum et al, 2013), como vemos en encéfalo humano (Resultados- Artículo 4). Estas observaciones nos indican que la distribución de la espinofilina en las regiones del encéfalo varía según la especie. Este estudio de caracterización establece las bases para poder cuantificar las dos isoformas de la espinofilina en el cerebro *postmortem* con diferentes patologías.

##### **5. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE ESPINOFILINA EN LA CPF DE SUJETOS CON ESQUIZOFRENIA**

La separación de las fracciones subcelulares desarrollada en este estudio nos ha permitido evaluar la expresión proteica de la espinofilina en la fracción postsináptica y en la fracción enriquecida en sinaptosomas. Pese a que se ha observado espinofilina expresada en la membrana de la región preterminal de axones (Muly et al, 2004a), en nuestro estudio no hemos podido detectarla ni cuantificarla en la fracción presináptica (Resultados- Artículo 5). Esta falta de detección puede deberse a una baja expresión en la región presináptica, dado que las

funciones relacionadas con la espinofilina son principalmente a nivel de espinas dendríticas (Feng et al, 2000), lo que correspondería con la fracción postsináptica (Sarrouilhe et al, 2006).

En nuestro estudio pudimos observar la disminución de la banda inferior de espinofilina, tanto en la fracción enriquecida en sinaptosomas como en la fracción postsináptica, en los sujetos con esquizofrenia que mostraron antipsicóticos en sangre (Resultados- Artículo 5). No es la primera vez que se muestran alteraciones en la expresión de espinofilina en enfermedades psiquiátricas, en las cuales existen alteraciones en la transmisión sináptica. Hay varios estudios que analizaron la expresión de espinofilina, bien proteica o bien de su ARNm, en la CPFDL de sujetos con esquizofrenia sin un veredicto claro. Algunos determinaron que no había ningún cambio (Catts & Weickert, 2012; Koh et al, 2003; Weickert et al, 2004), mientras que otro mostró un aumento (Baracksay et al, 2006). Los diferentes resultados obtenidos en dichos estudios de expresión de espinofilina se pueden deber al análisis en conjunto de las distintas capas de la corteza, al uso de diferentes kits para la extracción de ARN, las sondas frente a este ARN o a la técnica utilizada para su detección, ya que alguno utilizó qPCR (Catts & Weickert, 2012) y otros hibridación in situ (Baracksay et al, 2006; Weickert et al, 2004). El análisis conjunto de la corteza puede difuminar la diferencia de expresión proteica en zonas concretas, mientras que, si se estudiara por capas, las alteraciones podrían detectarse en mayor proporción y así obtener diferencias significativas (Glausier & Lewis, 2013; Kollouri et al, 2005). Además, existen otros estudios que observaron alteraciones de la expresión de espinofilina en otras regiones del encéfalo, como el tálamo, donde se vio un aumento en sujetos con esquizofrenia (Clinton et al, 2005), o en la corteza auditiva (Deo et al, 2013; Sweet et al, 2009), el bulbo olfatorio (Egbujo et al, 2015) y el hipocampo (Law et al, 2004a), donde se describió una disminución de dicha proteína en esquizofrenia.

Estudios previos también han estudiado posibles alteraciones en la expresión de espinofilina en diferentes patologías neuropsiquiátricas. Se ha visto una disminución de espinofilina en cerebro *postmortem* de sujetos con Alzheimer (Akram et al, 2008; Mi et al, 2017) y en modelos animales de Parkinson (Edler et al, 2018). También se ha observado un aumento del ARNm de espinofilina a corto plazo tras la exposición de ratas a estrés pero, tras este aumento inicial, el ARNm volvió a los niveles del principio (Chen et al, 2020).

La presencia de cambios significativos solamente en una de las dos bandas de espinofilina nos indica que ambas pueden tener funciones y regulaciones diferentes. Por lo tanto, sería interesante indagar en el conocimiento de cada una de estas isoformas para poder conocer sus diferencias y, de este modo, poder discernir qué función concreta media cada una.

También hay que resaltar el efecto de los antipsicóticos observado sobre la expresión proteica de la isoforma menos pesada de espinofilina, que vemos disminuida (Resultados- Artículo 5). Este hecho puede indicarnos que los fármacos antipsicóticos juegan un papel en la regulación de la banda inferior de espinofilina causando una disminución en su expresión proteica. Sabemos que los antipsicóticos alteran la morfología y la conectividad del cerebro, principalmente en la corteza (Benes et al, 1985; Meshul et al, 1992; Uranova et al, 1991). En relación a ello, un estudio previo observó la disminución del ARNm de espinofilina en la CPFDL de sujetos en tratamiento antipsicótico (Weickert et al, 2004), como observamos en nuestro estudio en la banda inferior de espinofilina. En contraposición, hay otros estudios que notificaron que no había diferencias en la expresión de espinofilina por el tratamiento antipsicótico (Koh et al, 2003; Sweet et al, 2009), aunque en estos casos los sujetos con antipsicóticos eran un número muy bajo. Sin embargo, se ha visto que algunos antipsicóticos sí afectan a la expresión de espinofilina en otras especies animales. Se ha observado cómo un tratamiento crónico con haloperidol causa una disminución de la expresión de espinofilina en ratas (Critchlow et al, 2006) y primates (Lidow et al, 2001), mientras que el tratamiento crónico con clozapina aumenta dicha expresión en ratas (Critchlow et al, 2006). En lo relativo a nuestro estudio, los sujetos con antipsicóticos en sangre tienen una amplia variedad de antipsicóticos, por lo que no se han podido establecer subgrupos para determinar el efecto de cada antipsicótico sobre la expresión proteica de espinofilina. Estos datos, unidos a los cambios en el cerebro que se producen por un tratamiento crónico con antipsicóticos, como la disminución del volumen cerebral o de la materia gris (Ho et al, 2011; Konopaske et al, 2007), podrían llevarnos a hipotetizar la posibilidad de la existencia de un número menor de espinas dendríticas en la CPFDL tras un tratamiento antipsicótico.

La existencia de diferencias en la expresión de espinofilina en sujetos con esquizofrenia puede verse condicionada por un posible sesgo debido al factor suicidio. En nuestra población de sujetos con esquizofrenia hay una proporción similar de sujetos suicidas con antipsicóticos en sangre y sin presencia de ellos (7 de 12 vs 10 de 12). Se analizó la posible asociación entre el suicidio y el tratamiento antipsicótico para modificar la expresión de espinofilina mediante el test de Fisher. Como el resultado fue negativo (Resultados- Artículo 5) se descartó que en nuestro estudio el suicidio pudiera ser un factor de confusión.

## **6. RECEPTORES ADRENÉRGICOS $\alpha_{2A}$ Y ESPINOFILINA EN LA CPF DE SUJETOS CON ESQUIZOFRENIA**

En el presente trabajo hemos analizado tanto la expresión proteica de los  $\alpha_{2A}$ -AR y los  $\alpha_{2C}$ -AR como su funcionalidad, y la expresión génica o epigenética de sus respectivos genes, ADRA2A y ADRA2C, en la CPFDL de sujetos con esquizofrenia. Los resultados de dicho trabajo no han confirmado nuestra hipótesis inicial, que los  $\alpha_{2A}$ -AR eran hipofuncionantes en esquizofrenia y,

esto podría relacionarse con los síntomas cognitivos de dicha patología. Sin embargo, estos resultados han mostrado cómo el tratamiento con antipsicóticos sí altera la expresión proteica de los  $\alpha_{2A}$ -AR y disminuye la funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR a través de las proteínas  $G\alpha_{i/o}$ . Además también hemos observado cómo el tratamiento parece disminuir una de las isoformas de la espinofilina, proteína que está involucrada en la neurogénesis y arborización dendrítica (Feng et al, 2000; Sarrouilhe et al, 2006). Todo ello podría asociarse con el empeoramiento de la cognición en los sujetos con esquizofrenia a causa del tratamiento antipsicótico.

Como ya se ha explicado anteriormente (ver el apartado 3.2.), la espinofilina y los  $\alpha_2$ -AR se unen y, esta unión favorece la señalización de estos receptores a través de las proteínas  $G\alpha$  (Richman et al, 2001). Por lo tanto, la disminución de espinofilina puede concordar con la disminución de funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR que observamos en este estudio en sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre. Esta disminución de la actividad, podría, a su vez, producir un aumento de la expresión de estos receptores como mecanismo compensatorio. Se ha visto que ratones KO para la espinofilina mostraban una mayor sensibilidad al antidepresivo desipramina y, que ésta disminuyó la actividad de los  $\alpha_{2A}$ -AR postsinápticos en el locus coeruleus (Cottingham et al, 2012). Si nuestro estudio siguiera este patrón, los antipsicóticos podrían causar una disminución de la expresión de espinofilina y con ello una menor actividad funcional de los  $\alpha_{2A}$ -AR. Además, sería interesante investigar si se produce una alteración en la expresión de  $\beta$ -arrestina, ya que compete con la espinofilina en la unión a los  $\alpha_2$ -AR y provoca la endocitosis de estos receptores (Gilsbach & Hein, 2012; Wang et al, 2004). El aumento de expresión de estos receptores, tanto en la fracción enriquecida en sinaptosomas como en la fracción postsináptica, puede indicar una posible alteración en la expresión de  $\beta$ -arrestina por el tratamiento con antipsicóticos.

## 7. FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL TRABAJO DESARROLLADO EN ESTA TESIS DOCTORAL

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral muestra fortalezas respecto al trabajo previo realizado en este campo, pero también existen algunas limitaciones.

La mayoría del proyecto de investigación que engloba esta Tesis Doctoral se realizó con cerebro humano *postmortem*, lo cual es en sí una fortaleza y a la vez una limitación. El ser humano es el beneficiario deseable de todos los avances que se puedan hacer en este campo para mejorar los síntomas de la esquizofrenia, y no existe mejor sustrato para nuestros experimentos que el tejido nativo humano (McCullumsmith & Meador-Woodruff, 2011). A pesar de realizar un diseño experimental muy elaborado, dado que se ha intentado reducir al mínimo los sesgos que se pudieran crear al escoger los sujetos, hay datos a los que no podemos acceder. Sería útil conocer información respectiva al periodo total de consumo de antipsicóticos, y cuales han tomado a lo largo de su vida, principalmente en relación a aquellos sujetos que no



presentaban antipsicóticos en sangre en el momento de la muerte. Estos datos podrían aportarnos más información del efecto que tienen los antipsicóticos y si hay alguno que tenga una mayor relevancia en las alteraciones observadas. No obstante, no se pueden controlar todas las variables de vida de los sujetos como se hace en los estudios con animales, por lo que tenemos un grupo de estudio más heterogéneo. Sin embargo, una robustez de este diseño es que se han emparejado los sujetos con esquizofrenia y controles por ciertas variables que sí se conocen, como son el sexo, la edad, el intervalo *postmortem* y el periodo de almacenamiento. Además, la información relativa al diagnóstico *antemortem* y la toxicología en sangre en el momento de la muerte hacen más exacta la distribución de los sujetos en los diferentes grupos.

Otra fortaleza de este estudio es la separación de las fracciones subcelulares, pudiendo determinar así la presencia de los subtipos de  $\alpha_2$ -AR, diferentes tipos de proteína G $\alpha$  y espinofilina, en la fracción enriquecida en sinaptosomas, fracción presináptica y fracción postsináptica. Sin embargo, la funcionalidad de los  $\alpha_2$ -AR a través de los diferentes subtipos de proteínas G $\alpha$  se tuvo que realizar en otra fracción subcelular, la fracción enriquecida en membranas, debido a que no era compatible la realización de los experimentos de SPA y el uso de fracciones presináptica y postsináptica. El principal inconveniente fueron las concentraciones elevadas de detergente que se usaron para separar las fracciones presináptica y postsináptica en las ultracentrifugaciones. A esto hay que añadir que el tejido del que se parte en este estudio contiene muestras de la CPFDL en su totalidad, por lo que los resultados obtenidos son a nivel global de esta región cerebral, pero no sabemos qué ocurre en cada una de las capas de esta corteza ni podemos asegurar que lo que hemos medido pertenezca exclusivamente a células neuronales.

La realización por primera vez, hasta donde llega nuestro conocimiento, del estudio de modificaciones epigenéticas en los promotores de los genes ADRA2A y ADRA2C de sujetos con esquizofrenia es un gran valor de este trabajo. Sin embargo, a pesar de que creemos que la mayor parte de la inmunoprecipitación se debe a modificaciones epigenéticas situadas en neuronas, somos conscientes de que parte de estas inmunoprecipitaciones pueden corresponder a otras células del sistema nervioso, como pueden ser los astrocitos. Esto se puede dar al no haber separado previamente las neuronas del resto de células de la CPF y, de este modo, las inmunoprecipitaciones se hubieran realizado solamente a partir de la cromatina de neuronas. Sin embargo, H3K4me3 es la marca epigenética que está más presente en nuestras muestras y dicha marca está más expresada en los promotores de los genes de las células neuronales que en los astrocitos (Tansey & Hill, 2018), debido a que esta marca está asociada a funciones neuronales y de señalización sináptica (Dincer et al, 2015). Por lo tanto, aunque no hayamos realizado la separación previa entre neuronas y otros tipos celulares, es probable que el sustrato utilizado en este trabajo sea, en una proporción elevada, neuronas.

A todo lo mencionado anteriormente, debemos añadir que todas las alteraciones mostradas en esta Tesis Doctoral asociadas a la presencia de fármacos antipsicóticos no se pueden adjudicar al efecto de uno de ellos en concreto, ni discernir entre típicos y atípicos. Esto se debe a que los sujetos incluidos en este estudio tienen un amplio abanico de antipsicóticos, y solamente conocemos los detectados, gracias al análisis toxicológico, en sangre tras la muerte de estos sujetos. Por lo que, sería interesante, poder estudiar el efecto concreto de cada antipsicótico con una población distinta haciendo una distribución en función del tratamiento antipsicótico que reciba cada sujeto. Así podría determinarse si hay algún antipsicótico responsable del aumento de expresión de los  $\alpha_{2A}$ -AR, del aumento de ARNm de ADRA2A o sobre las marcas epigenéticas, especialmente sobre ACh4K5. Además, para poder observar la alteración que tiene el tratamiento antipsicótico sobre esta marca epigenética, ACh4K5, podría realizarse un tratamiento crónico en un modelo animal de esquizofrenia con diferentes tipos de antipsicóticos.

En este trabajo, se determinó la distribución de los  $\alpha_{2A}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR, en las diferentes fracciones sinápticas de la CPFDL humana y se observó un comportamiento diferente de estos receptores tras la influencia del tratamiento antipsicótico en la expresión, tanto proteica como de ARNm o en los mecanismos epigenéticos que regulan su transcripción. Sin embargo, no se ha podido determinar si las alteraciones descritas se deben a un antipsicótico concreto o, a qué subtipo de  $\alpha_2$ -AR corresponden las alteraciones funcionales observadas. Por consiguiente y, teniendo en cuenta estas alteraciones, sería importante seguir investigando en este campo, puesto que necesitamos herramientas que permitan diferenciar los subtipos  $\alpha_{2A}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR y, de este modo, determinar si la disminución de la funcionalidad es en ambos tipos o sólo en uno de ellos. Con estas nuevas estrategias podría determinarse de una manera más exacta a qué subtipo pertenecen todas las alteraciones observadas e, incluso, podría conocerse cómo afecta cada antipsicótico a la expresión y funcionalidad de cada uno de los subtipos de  $\alpha_2$ -AR. A las alteraciones observadas en los  $\alpha_2$ -AR se le suma la alteración de la espinofilina producida por antipsicóticos, por lo que sería interesante establecer el efecto que tienen diferentes antipsicóticos sobre esta proteína. Además de poder realizar la búsqueda de roles diferentes que tienen cada una de las dos isoformas de espinofilina detectadas y analizadas en este estudio. También sería interesante, realizar en paralelo, el análisis de expresión de espinofilina y de  $\beta$ -arrestina para observar si hay una relación entre el tratamiento antipsicótico, los  $\alpha_2$ -AR y la expresión de estas dos proteínas, las cuales deberían tener una correlación inversa.

Para finalizar, es necesario remarcar que seguir ahondando en este campo puede proporcionarnos una mejor comprensión de las alteraciones etiopatogénicas de la esquizofrenia. De este modo, estudiar más a fondo la espinofilina podría acercarnos a entender algunas alteraciones que llevan a la aparición de los síntomas cognitivos. Asimismo, el estudio de los

subtipos de  $\alpha_2$ -AR, podría dar lugar a la síntesis de nuevos fármacos más específicos en su acción sobre cada uno de estos subtipos. Esta aproximación podría dar lugar a un tratamiento más dirigido a una mejora cognitiva en las personas con esquizofrenia. Estos fármacos enfocados a la sintomatología cognitiva, sin tratamiento efectivo a día de hoy, darían a las personas que padecen esquizofrenia una mayor autonomía y mejor calidad de vida.





# Conclusiones

---



Las principales conclusiones extraídas de esta Tesis Doctoral son:

1. Los subtipos  $\alpha_{2A}$ -AR y  $\alpha_{2C}$ -AR se expresan en diferente proporción en las fracciones presináptica y postsináptica de la CPFDL humana. Así, mientras los  $\alpha_{2A}$ -AR se localizan principalmente en la región postsináptica, los  $\alpha_{2C}$ -AR muestran una distribución más homogénea entre ambas fracciones.
2. Los sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre muestran un aumento en la expresión proteica de los  $\alpha_{2A}$ -AR, tanto en la fracción enriquecida en sinaptosomas como en la fracción postsináptica de la CPFDL. Por el contrario, en los  $\alpha_{2C}$ -AR no se observa ningún cambio significativo.
3. La señalización de los  $\alpha_2$ -AR a través de las proteínas  $G\alpha_o$  está disminuida en la CPFDL de los sujetos con esquizofrenia. Además, los sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre muestran una disminución en la señalización de los  $\alpha_2$ -AR a través de las proteínas  $G\alpha_{i2}$  y  $G\alpha_{i3}$  en la CPFDL.
4. La expresión proteica de las proteínas  $G\alpha_o$  está significativamente aumentada en la fracción presináptica de la CPFDL de los sujetos con esquizofrenia. Mientras que, en la fracción postsináptica, hay un aumento de estas proteínas  $G\alpha_o$  en los sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre.
5. La expresión proteica de las proteínas  $G\alpha_{i2}$  se encuentra significativamente aumentada en la fracción postsináptica de la CPFDL de los sujetos con esquizofrenia y, en los sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre se acentúa este aumento de expresión. Por el contrario no se ha observado ningún cambio significativo en la expresión proteica de las proteínas  $G\alpha_{i3}$ .
6. Los sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre muestran un aumento significativo en la expresión génica del ADRA2A en la CPFDL. Además, estos sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre muestran las marcas epigenéticas del promotor del ADRA2A modificadas, predisponiendo a la transcripción de este gen en la CPFDL.
7. La expresión génica del ADRA2C se encuentra significativamente aumentada en la CPFDL de sujetos con esquizofrenia. Además, las marcas epigenéticas estudiadas en el promotor del ADRA2C predisponen a la transcripción de este gen en la CPFDL de los sujetos con esquizofrenia.

Estudio de  $\alpha 2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

8. La espinofilina muestra dos isoformas en el cerebro humano. Estas isoformas tienen una expresión diferente en distintas regiones encefálicas, y en las fracciones subcelulares de la CPFDL humana.
9. La isoforma de espinofilina de menor peso molecular es un producto proteolítico de la isoforma de mayor peso molecular.
10. Los sujetos con esquizofrenia y antipsicóticos en sangre muestran una disminución en la expresión proteica de la isoforma de espinofilina de menor peso molecular, tanto en la fracción enriquecida en sinaptosomas como en la fracción postsináptica de la CPFDL.





## Referencias



- Abbasi, S.H., Behpournia, H., Ghoreishi, A., Salehi, B., Raznahan, M., Rezazadeh, S.A., Rezaei, F., and Akhondzadeh, S. (2010). The effect of mirtazapine add on therapy to risperidone in the treatment of schizophrenia: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Schizophrenia Research* *116*, 101-106.
- Achim, A.M. and Lepage, M. (2005). Episodic memory-related activation in schizophrenia: meta-analysis. *The British Journal of Psychiatry* *187*, 500-509.
- Adhikari, B.M., Hong, L.E., Sampath, H., Chiappelli, J., Jahanshad, N., Thompson, P.M., Rowland, L.M., Calhoun, V.D., Du, X., Chen, S., et al. (2019). Functional network connectivity impairments and core cognitive deficits in schizophrenia. *Human Brain Mapping* *40*, 4593-4605.
- Aguilar-Valles, A., Jung, S., Poole, S., Flores, C., and Luheshi, G.N. (2012). Leptin and interleukin-6 alter the function of mesolimbic dopamine neurons in a rodent model of prenatal inflammation. *Psychoneuroendocrinology* *37*, 956-969.
- Aguilar-Valles, A., Rodrigue, B., and Matta-Camacho, E. (2020). Maternal immune activation and the development of dopaminergic neurotransmission of the offspring: relevance for schizophrenia and other psychoses. *Frontiers in Psychiatry* *11*, 852.
- Akram, A., Christoffel, D., Rocher, A.B., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Herrmann, F.R., Haroutunian, V., Giannakopoulos, P., et al. (2008). Stereologic estimates of total spinophilin-immunoreactive spine number in area 9 and the CA1 field: relationship with the progression of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* *29*, 1296-1307.
- Albarrán-Juárez J., Gilsbach R., Piekorz R.P., Pexa K., Beetz N., Schneider J., Nürnberg B., Birnbaumer L., and Hein L. (2009). Modulation of alpha2-adrenoceptor functions by heterotrimeric Galphai protein isoforms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *331*, 35-44.
- Aleman, A., and de Haan, E.H. (2000). Antipsychotics and working memory in schizophrenia. *Science* *289*, 56-68.
- Alladi, C.G., Etain, B., Bellivier, F., and Marie-Claire, C. (2018). DNA methylation as a biomarker of treatment response variability in serious mental illnesses: a systematic review focused on bipolar disorder, schizophrenia, and major depressive disorder. *International Journal of Molecular Sciences* *19*, 3026.
- Allen, P.B., Ouimet, C.C., and Greengard, P. (1997). Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 9956-9961.
- American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4<sup>th</sup> edition (DSM-4).
- American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 5<sup>th</sup> edition (DSM-5).
- Aoki, C., Go, C.G., Venkatesan, C., and Kurose, H. (1994). Perikaryal and synaptic localization of alpha 2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity. *Brain Research* *650*, 181-204.
- Aoki, C., Venkatesan, C., Go, C.G., Forman, R., and Kurose, H. (1998). Cellular and subcellular sites for noradrenergic action in the monkey dorsolateral prefrontal cortex as revealed by the immunocytochemical localization of noradrenergic receptors and axons. *Cerebral Cortex* *8*, 269-277.
- Arnsten, A.F.T. (1997). Catecholamine regulation of the prefrontal cortex. *Journal of Psychopharmacology* *11*, 151-162.
- Arnsten, A.F.T. (2009). Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nature Reviews. Neuroscience* *10*, 410-422.

## Estudio de $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

- Arnsten, A.F.T. (2004). Adrenergic targets for the treatment of cognitive deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology* *174*, 25–31.
- Arnsten, A.F.T. (2011). Catecholamine influences on dorsolateral prefrontal cortical networks. *Biological Psychiatry* *69*, e89–99.
- Arnsten, A.F.T., and Contant, T.A. (1992). Alpha-2 adrenergic agonists decrease distractibility in aged monkeys performing the delayed response task. *Psychopharmacology* *108*, 159–169.
- Arnsten, A.F.T., and Goldman-Rakic, P.S. (1985). Alpha 2-adrenergic mechanisms in prefrontal cortex associated with cognitive decline in aged nonhuman primates. *Science* *230*, 1273–1276.
- Arnsten, A.F.T., and Jin, L.E. (2012). Guanfacine for the treatment of cognitive disorders: a century of discoveries at Yale. *The Yale Journal of Biology and Medicine* *85*, 45–58.
- Arnsten, A.F.T., and Wang, M. (2016). Targeting prefrontal cortical systems for drug development: potential therapies for cognitive disorders. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* *56*, 339–360.
- Arnsten, A.F.T., Cai, J.X., and Goldman-Rakic, P.S. (1988). The alpha-2 adrenergic agonist guanfacine improves memory in aged monkeys without sedative or hypotensive side effects: evidence for alpha-2 receptor subtypes. *The Journal of Neuroscience* *8*, 4287–4298.
- Arnsten, A.F.T., Steere, J.C., and Hunt, R.D. (1996). The contribution of  $\alpha$ 2-noradrenergic mechanisms to prefrontal cortical cognitive function: potential significance for attention-deficit hyperactivity disorder. *Archives of General Psychiatry* *53*, 448–455.
- Arnsten, A.F.T., Wang, M.J., and Paspalas, C.D. (2012). Neuromodulation of thought: flexibilities and vulnerabilities in prefrontal cortical network synapses. *Neuron* *76*, 223–239.
- Arnsten, A.F.T., Girgis, R.R., Gray, D.L., and Mailman, R.B. (2017). Novel dopamine therapeutics for cognitive deficits in schizophrenia. *Biological Psychiatry* *81*, 67–77.
- Asor, E., and Ben-Shachar, D. (2012). Platelets: a possible glance into brain biological processes in schizophrenia. *World Journal of Psychiatry* *2*, 124–133.
- Baracska, K.L., Haroutunian, V., and Meador-Woodruff, J.H. (2006). Dopamine receptor signaling molecules are altered in elderly schizophrenic cortex. *Synapse* *60*, 271–279.
- Barrachina, M., Moreno, J., Villar-Menéndez, I., Juvés, S., and Ferrer, I. (2012). Histone tail acetylation in brain occurs in an unpredictable fashion after death. *Cell and Tissue Banking* *13*, 597–606.
- Baucum, A.J., Brown, A.M., and Colbran, R.J. (2013). Differential association of postsynaptic signaling protein complexes in striatum and hippocampus. *Journal of Neurochemistry* *124*, 490–501.
- Baumeister, A.A., and Hawkins, M.F. (2004). The serotonin hypothesis of schizophrenia: a historical case study on the heuristic value of theory in clinical neuroscience. *Journal of the History of the Neurosciences* *13*, 277–291.
- Benes, F.M. (2010). Amygdalocortical circuitry in schizophrenia: from circuits to molecules. *Neuropsychopharmacology* *35*, 239–257.
- Benes, F.M., Paskevich, P.A., Davidson, J., and Domesick, V.B. (1985). Synaptic rearrangements in medial prefrontal cortex of haloperidol-treated rats. *Brain Research* *348*, 15–20.
- Beraki, S., Diaz-Heijtz, R., Tai, F., and Ögren, S.O. (2009). Effects of repeated treatment of phencyclidine on cognition and gene expression in C57BL/6 mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology* *12*, 243–255.
- Berridge, C.W., and Devilbiss, D.M. (2011). Psychostimulants as cognitive enhancers: the prefrontal cortex,

- catecholamines, and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry* 69, e101-111.
- Besse, F., and Ephrussi, A. (2008). Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, 971-980.
- Betti, A.H., Antonio, C.B., Herzfeldt, V., Pitta, M.G., da Rocha Pitta, I., do Rego, J.L., do Rego, J.C., Vaudry, D., and Rates, S.M.K. (2019). PT-31, a putative  $\alpha$ 2-adrenoceptor agonist, is effective in schizophrenia cognitive symptoms in mice. *Behavioural Pharmacology* 30, 574-587.
- Bill, D.J., Hughes, I.E., and Stephens, R.J. (1989). The effects of acute and chronic desipramine on the thermogenic and hypoactivity responses to alpha 2-agonists in reserpinized and normal mice. *British Journal of Pharmacology* 96, 144-152.
- Birnbaum, R., and Weinberger, D.R. (2017). Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. *Nature Reviews. Neuroscience* 18, 727-740.
- Bohacek, J., and Mansuy, I.M. (2013). Epigenetic inheritance of disease and disease risk. *Neuropsychopharmacology* 38, 220-236.
- Brady, A.E., Wang, Q., Allen, P.B., Rizzo, M., Greengard, P., and Limbird, L.E. (2005).  $\alpha$ 2-adrenergic agonist enrichment of spinophilin at the cell surface involves  $\beta\gamma$  subunits of Gi proteins and is preferentially induced by the  $\alpha$ 2A-subtype. *Molecular Pharmacology* 67, 1690-1696.
- Braff, D.L., Geyer, M.A., and Swerdlow, N.R. (2001). Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology* 156, 234-258.
- Brede, M., Philipp, M., Knaus, A., Muthig, V., and Hein, L. (2004).  $\alpha$ 2-Adrenergic receptor subtypes — novel functions uncovered in gene-targeted mouse models. *Biology of the Cell* 96, 343-348.
- Bridge, T.P., Kleinman, J.E., Karoum, F., and Wyatt, R.J. (1985). Postmortem central catecholamines and antemortem cognitive impairment in elderly schizophrenics and controls. *Neuropsychobiology* 14, 57-61.
- Brosda, J., Jantschak, F., and Pertz, H.H. (2014).  $\alpha$ 2-Adrenoceptors are targets for antipsychotic drugs. *Psychopharmacology* 231, 801-812.
- Brozoski, T.J., Brown, R.M., Rosvold, H.E., and Goldman, P.S. (1979). Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 205, 929-932.
- Bücheler, M.M., Hadamek, K., and Hein, L. (2002). Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* 109, 819-826.
- Bylund D.B. (1992). Subtypes of  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-adrenergic receptors. *The FASEB Journal* 6, 832-839.
- Cahir, M., Mawhinney, T., and King, D.J. (2004). Differential region-specific regulation of central alpha 1-adrenoceptor binding following chronic haloperidol and clozapine administration in the rat. *Psychopharmacology* 172, 196-201.
- Caldeira, G.L., Peça, J., and Carvalho, A.N. (2019). New insights on synaptic dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Neurobiology* 57, 62-70.
- Callado L.F., Meana J.J., Grijalba B., Pazos A., Sastre M., and García-Sevilla J.A. (1998). Selective increase of alpha2A-adrenoceptor agonist binding sites in brains of depressed suicide victims. *Journal of Neurochemistry* 70, 1114-1123.
- Cariaga-Martinez, A., Saiz-Ruiz, J., and Alelú-Paz, R. (2016). From linkage studies to epigenetics: what we know and what we need to know in the neurobiology of schizophrenia. *Frontiers in Neuroscience* 10, 202.

## Estudio de $\alpha 2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

- Catts, V.S., and Weickert, C.S. (2012). Gene expression analysis implicates a death receptor pathway in schizophrenia pathology. *PLoS One* 7, e35511.
- Celada, P., Puig, M.V., and Artigas, F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 7, 25.
- Chen, F., Polsinelli, B., Nava, N., Treccani, G., Elfving, B., Müller, H.K., Musazzi, L., Popoli, M., Nyengaard, J.R., and Wegener, G. (2020). Structural plasticity and molecular markers in hippocampus of male rats after acute stress. *Neuroscience* 438, 100–115.
- Cho, S.J., Yook, K.Y., Kim, B., Choi, T.K., Lee, K.S., Kim, Y.W., Lee, J.E., Suh, S., Yook, K.H., and Lee, S.H. (2011). Mirtazapine augmentation enhances cognitive and reduces negative symptoms in schizophrenia patients treated with risperidone: a randomized controlled trial. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 35, 208-211.
- Clinton, S.M., Ibrahim, H.M., Frey, K.A., Davis, K.L., Haroutunian, V., and Meador-Woodruff, J.H. (2005). Dopaminergic abnormalities in select thalamic nuclei in schizophrenia: involvement of the intracellular signal integrating proteins calcyon and spinophilin. *American Journal of Psychiatry* 162, 1859–1871.
- Coffman, B.A., Haigh, S.M., Murphy, T.K., and Salisbury, D.F. (2016). Event-related potentials demonstrate deficits in acoustic segmentation in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 173, 109–115.
- Comer, A.L., Carrier, M., Tremblay, M.E., and Cruz-Martín, A. (2020). The inflamed brain in schizophrenia: the convergence of genetic and environmental risk factors that lead to uncontrolled neuroinflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14, 274.
- Cottingham, C., Li, X., and Wang, Q. (2012). Noradrenergic antidepressant responses to desipramine in vivo are reciprocally regulated by arrestin3 and spinophilin. *Neuropharmacology* 62, 2354-2362.
- Cottingham, C., and Wang, Q. (2012).  $\alpha 2$  adrenergic receptor dysregulation in depressive disorders: implications for the neurobiology of depression and antidepressant therapy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36, 2214-2225.
- Coull, J.T. (1994). Pharmacological manipulations of the  $\alpha 2$  -noradrenergic system. *Drugs & Aging* 5, 116–126.
- Court, F., and Arnaud, P. (2017). An annotated list of bivalent chromatin regions in human ES cells: a new tool for cancer epigenetic research. *Oncotarget* 8, 4110–4124.
- Coyle, J.T. (2017). Schizophrenia: basic and clinical. *Advances in Neurobiology* 15, 255-280.
- Critchlow, H.M., Maycox, P.R., Skepper, J.N., and Krylova, O. (2006). Clozapine and haloperidol differentially regulate dendritic spine formation and synaptogenesis in rat hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences* 32, 356-365.
- Cui, L.B., Liu, K., Li, C., Wang, L.X., Guo, F., Tian, P., Wu, Y.J., Guo, L., Liu, W.M., Xi, Y.B., et al. (2016). Putamen-related regional and network functional deficits in first-episode schizophrenia with auditory verbal hallucinations. *Schizophrenia Research* 173, 13-22.
- Darby, M.M., and Sabunciyan, S. (2014). Repetitive elements and epigenetic marks in behavior and psychiatric disease. *Advances in Genetics* 86, 185-252.
- Davis, K.L., Kahn, R.S., Ko, G., and Davidson, M. (1991). Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *The American Journal of Psychiatry* 148, 1474-1486.
- De Paermentier F., Mauger J.M., Lowther S., Crompton M.R., Katona C.L., and Horton R.W. (1997). Brain alpha-adrenoceptors in depressed suicides. *Brain Research* 757, 60-68.
- De Vos, H., Vauquelin, G., De Keyser, J., De Backer, J.P., and Van Liefde, I. (1992). Regional distribution of

- alpha 2A- and alpha 2B-adrenoceptor subtypes in postmortem human brain. *Journal of Neurochemistry* *58*, 1555–1560.
- Dean, B. (2003). [3H]RX 821002 in human dorsolateral prefrontal cortex: no changes in postmortem tissue from subjects with schizophrenia. *Psychiatry Research* *119*, 25–31.
- Delay, J., and Deniker, P. (1955). Neuroleptic effects of chlorpromazine in therapeutics of neuropsychiatry. *Journal of Clinical and Experimental Psychopathology* *16*, 104–112.
- Deng, Y., Singer, R.H., and Gu, W. (2008). Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes & Development* *22*, 1037-1050.
- Deo, A.J., Goldszer, I.M., Li, S., DiBitetto, J.V., Henteleff, R., Sampson, A., Lewis, D.A., Penzes, P., and Sweet, R.A. (2013). PAK1 protein expression in the auditory cortex of schizophrenia subjects. *PLoS One* *8*, e59458.
- Devoto, P., Flore, G., Pani, L., and Gessa, G.L. (2001). Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Molecular Psychiatry* *6*, 657-664.
- Di Sebastiano, A.R., Fahim, S., Dunn, H.A., Walther, C., Ribeiro, F.M., Cregan, S.P., Angers, S., Schmid, S., and Ferguson, S.S.G. (2016). role of spinophilin in group I metabotropic glutamate receptor endocytosis, signaling, and synaptic plasticity. *The Journal of Biological Chemistry* *291*, 17602–17615.
- Dienel, S.J., and Lewis, D.A. (2019). Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia. *Neurobiology of Disease* *131*, 104208.
- Dincer A., Gavin D.P., Xu K., Zhang B., Dudley J.T., Schadt E.E., and Akbarian S. (2015). Deciphering H3K4me3 broad domains associated with gene-regulatory networks and conserved epigenomic landscapes in the human brain. *Translational Psychiatry* *5*, e679.
- Dion, M.F., Altschuler, S.J., Wu, L.F., and Rando, O.J. (2005). Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* *102*, 5501–5506.
- Dunn, A.L., Michie, P.T., Hodgson, D.M., and Harms, L. (2020). Adolescent cannabinoid exposure interacts with other risk factors in schizophrenia: a review of the evidence from animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* *116*, 202-220.
- Eason, M.G., and Liggett, S.B. (1992). Subtype-selective desensitization of alpha 2-adrenergic receptors. Different mechanisms control short and long term agonist-promoted desensitization of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2. *The Journal of Biological Chemistry* *267*, 25473–25479.
- Eason, M.G., and Liggett, S.B. (1995). Identification of a Gs coupling domain in the amino terminus of the third intracellular loop of the alpha 2A-adrenergic receptor. Evidence for distinct structural determinants that confer Gs versus Gi coupling. *The Journal of Biological Chemistry* *270*, 24753-24760.
- Eason, M.G., Kurose, H., Holt, B.D., Raymond, J.R., and Liggett, S.B. (1992). Simultaneous coupling of alpha 2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs. *The Journal of Biological Chemistry* *267*, 15795-15801.
- Eason, M.G., Jacinto, M.T., and Liggett, S.B. (1994). Contribution of ligand structure to activation of alpha 2-adrenergic receptor subtype coupling to Gs. *Molecular Pharmacology* *45*, 696-702.
- Eastwood, S.L., Lyon, L., George, L., Andrieux, A., Job, D., and Harrison, P.J. (2007). Altered expression of synaptic protein mRNAs in STOP (MAP6) mutant mice. *Journal of Psychopharmacology* *21*, 635-644.
- Edler, M.C., Salek, A.B., Watkins, D.S., Kaur, H., Morris, C.W., Yamamoto, B.K., and Baucum, A.J. (2018). Mechanisms regulating the association of Protein Phosphatase 1 with spinophilin and neurabin. *ACS*

## Estudio de $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

Chemical Neuroscience 9, 2701–2712.

- Egbujo, C.N., Sinclair, D., Borgmann-Winter, K.E., Arnold, S.E., Turetsky, B.I., and Hahn, C.G. (2015). Molecular evidence for decreased synaptic efficacy in the postmortem olfactory bulb of individuals with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 168, 554–562.
- Elkis, H., and Buckley, P.F. (2016). Treatment-resistant schizophrenia. *The Psychiatric Clinics of North America* 39, 239-265.
- Escribá, P.V., Ozaita, A., and García-Sevilla, J.A. (2004). Increased mRNA expression of alpha2A-adrenoceptors, serotonin receptors and mu-opioid receptors in the brains of suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 29, 1512–1521.
- Feng, J., Yan, Z., Ferreira, A., Tomizawa, K., Liauw, J.A., Zhuo, M., Allen, P.B., Ouimet, C.C., and Greengard, P. (2000). Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9287–9292.
- Fleischhacker, W.W., Arango, C., Arteel, P., Barnes, T.R.E., Carpenter, W., Duckworth, K., Galderisi, S.R., Halpern, L., Knapp, M., Marder, S., et al. (2014). Schizophrenia—time to commit to policy change. *Schizophrenia Bulletin* 40, S165–S194.
- Flügge, G., Van Kampen, M., Meyer, H., and Fuchs, E. (2003).  $\alpha$ 2A and  $\alpha$ 2C-adrenoceptor regulation in the brain:  $\alpha$ 2A changes persist after chronic stress. *European Journal of Neuroscience* 17, 917–928.
- Foley, C., Corvin, A., and Nakagome, S. (2017). Genetics of schizophrenia: ready to translate? *Current Psychiatry Reports* 19, 1–9.
- Fornai, F., Blandizzi, C., and del Tacca, M. (1990). Central alpha-2 adrenoceptors regulate central and peripheral functions. *Pharmacological Research* 22, 541–554.
- Fourla, D.D., Papakonstantinou, M.P., Vrana, S.M., and Georgoussi, Z. (2012). Selective interactions of spinophilin with the C-terminal domains of the  $\delta$ - and  $\mu$ -opioid receptors and G proteins differentially modulate opioid receptor signaling. *Cellular Signalling* 24, 2315-2328.
- Franowicz, J.S., and Arnsten, A.F.T. (1999). Treatment with the noradrenergic alpha-2 agonist clonidine, but not diazepam, improves spatial working memory in normal young rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 21, 611-621.
- Franowicz, J.S., Kessler, L.E., Borja, C.M.D., Kobilka, B.K., Limbird, L.E., and Arnsten, A.F.T. (2002). Mutation of the alpha2A-adrenoceptor impairs working memory performance and annuls cognitive enhancement by guanfacine. *The Journal of Neuroscience* 22, 8771–8777.
- Freedman, R. (2003). Schizophrenia. *The New England Journal of Medicine* 349, 1738-1749.
- Friedman, J.I., Temporini, H., and Davis, K.L. (1999). Pharmacologic strategies for augmenting cognitive performance in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 45, 1–16.
- Friedman, J.I., Stewart, D.G., and Gorman, J.M. (2004). Potential noradrenergic targets for cognitive enhancement in schizophrenia. *CNS Spectrums* 9, 350-355.
- Fuster J.M. (2001). Prefrontal Cortex. 11969–11976.
- Futter, M., Uematsu, K., Bullock, S.A., Kim, Y., Hemmings, H.C., Nishi, A., Greengard, P., and Nairn, A.C. (2005). Phosphorylation of spinophilin by ERK and cyclin-dependent PK 5 (Cdk5). *Proceeding of the National Academic of Sciences* 102, 3489–3494.
- Galeotti, N., Bartolini, A., and Ghelardini, C. (2004). Alpha-2 agonist-induced memory impairment is mediated by the alpha-2A-adrenoceptor subtype. *Behavioural Brain Research* 153, 409-417.
- García-Bea, A., Miranda-Azpiazu, P., Muguruza, C., Marmolejo-Martinez-Artesero, S., Diez-Alarcia, R.,



- Gabilondo, A.M., Callado, L.F., Morentin, B., González-Maeso, J., and Meana, J.J. (2019). Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor expression and functionality in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: Selective biased agonism via G  $\alpha$ <sub>1</sub>-proteins. *European Neuropsychopharmacology* 29, 1453-1463.
- García-Sevilla J.A, Escribá P.V, Ozaita A., Harpe R., Walzer C., Eytan A., and Guimón J. (1999). Up-regulation of immunolabeled  $\alpha$ <sub>2a</sub>-adrenoceptors, Gi coupling proteins, and regulatory receptor kinases in the prefrontal cortex of depressed suicides. *Journal of Neurochemistry* 72, 282-291.
- Garey, L.J., Ong, W.Y., Patel, T.S., Kanani, M., Davis, A., Mortimer, A.M., Barnes, T.R., and Hirsch, S.R. (1998). Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 65, 446-453.
- Gavin, D.P., and Akbarian, S. (2012). Epigenetic and post-transcriptional dysregulation of gene expression in schizophrenia and related disease. *Neurobiology of Disease* 46, 255-262.
- Gilbert, T.M., Zürcher, N.R., Catanese, M.C., Tseng, C.E.J., Di Biase, M.A., Lyall, A.E., Hightower, B.G., Parmar, A.J., Bhanot, A., Wu, C.J, et al. (2019). Neuroepigenetic signatures of age and sex in the living human brain. *Nature Communications* 10, 2945.
- Giltsbach, R., and Hein, L. (2012). Are the pharmacology and physiology of  $\alpha$ <sub>2</sub> adrenoceptors determined by  $\alpha$ <sub>2</sub>-heteroreceptors and autoreceptors respectively? *British Journal of Pharmacology* 165, 90-102.
- Giltsbach, R., Albarrán-Juárez, J., and Hein, L. (2011). Pre- versus postsynaptic signaling by  $\alpha$ (2)-adrenoceptors. *Current Topics in Membranes* 67, 139-160.
- Glantz, L.A., and Lewis, D.A. (2000). Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 57, 65-73.
- Glausier, J.R., and Lewis, D.A. (2013). Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 251, 90-107.
- Glennon, R.A., Titeler, M., and McKenney, J.D. (1984). Evidence for 5-HT<sub>2</sub> involvement in the mechanism of action of hallucinogenic agents. *Life Sciences* 35, 2505-2511.
- Gokhale, A., Mullin, A.P., Zlatic, S.A., Easley, C.A., Merritt, M.E., Raj, N., Larimore, J., Gordon, D.E., Peden, A.A., Sanyal, S., et al. (2015). The N-ethylmaleimide-sensitive factor and dysbindin interact to modulate synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience* 35, 7643-7653.
- Goldman-Rakic, P.S. (1987). Circuitry of the frontal association cortex and its relevance to dementia. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 6, 299-309.
- González A.M., Pascual J., Meana J.J., Barturen F., del Arco C., Pazos A., and García-Sevilla J.A. (1994). Autoradiographic demonstration of increased  $\alpha$ <sub>2</sub>-adrenoceptor agonist binding sites in the hippocampus and frontal cortex of depressed suicide victims. *Journal of Neurochemistry* 63, 256-265.
- González-Maeso J., Rodríguez-Puertas R., Meana, J.J., García-Sevilla, J.A., and Guimón J (2002). Neurotransmitter receptor-mediated activation of G-proteins in brains of suicide victims with mood disorders: selective supersensitivity of alpha(2A)-adrenoceptors. *Molecular Psychiatry* 7, 755-767.
- Grijalba, B., Callado, L.F., Meana, J.J., García-Sevilla, J.A., and Pazos A. (1996). Alpha 2-adrenoceptor subtypes in the human brain: a pharmacological delineation of [3H]RX-821002 binding to membranes and tissue sections. *European Journal of Pharmacology* 310, 83-93.
- Grossman, S.D., Futter, M., Snyder, G.L., Allen, P.B., Nairn, A.C., Greengard, P., and Hsieh-Wilson, L.C. (2004). Spinophilin is phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II resulting in regulation of its binding to F-actin. *Journal of Neurochemistry* 90, 317-324.
- Guan, J.S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T.J.F., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., et al. (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic

## Estudio de $\alpha 2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

- plasticity. *Nature* 459, 55–60.
- Guo, J.Y., Ragland, J.D., and Carter, C.S. (2019). Memory and cognition in schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 24, 633–642.
- Gupta-Agarwal, S., Franklin, A.V., DeRamus, T., Wheelock, M., Davis, R.L., McMahon, L.L., and Lubin, F.D. (2012). G9a/GLP histone lysine dimethyltransferase complex activity in the hippocampus and the entorhinal cortex is required for gene activation and silencing during memory consolidation. *The Journal of Neuroscience* 32, 5440–5453.
- Gürel, Ç., Kuşçu, G.C., Yavaşoğlu, A., and Biray Avcı, Ç.B. (2020). The clues in solving the mystery of major psychosis: the epigenetic basis of schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 113, 51–61.
- Hains, A.B., and Arnsten, A.F.T. (2009). Cognition: neuropharmacology. *Encyclopedia of Neuroscience*. 1087–1094.
- Hames B.D. (1998). *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach* 3rd edition. Oxford University Press.
- Harvey, P.D., and Isner, E.C. (2020). Cognition, social cognition, and functional capacity in early-onset schizophrenia. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America* 29, 171–182.
- Hein, L., and Kobilka, B.K. (1995). Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology* 34, 357–366.
- Hirjak, D., Wolf, R.C., Paternoga, I., Kubera, K.M., Thomann, A.K., Stieltjes, B., Maier-Hein, K.H., and Thomann, P.A. (2016). Neuroanatomical markers of neurological soft signs in recent-onset schizophrenia and Asperger-syndrome. *Brain Topography* 29, 382–394.
- Ho, B.C., Andreasen, N.C., Ziebell, S., Pierson, R., and Magnotta, V. (2011). Long-term antipsychotic treatment and brain volumes: a longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 68, 128–137.
- Hsieh-Wilson, L.C., Benfenati, F., Snyder, G.L., Allen, P.B., Nairn, A.C., and Greengard, P. (2003). Phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with actin filaments. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 1186–1194.
- Hu, J., Vidovic, M., Chen, M.M., Lu, Q.Y., and Song, Z.M. (2008). Activation of alpha 2A adrenoceptors alters dendritic spine development and the expression of spinophilin in cultured cortical neurones. *Brain Research* 1199, 37–45.
- Huang, H.S., and Akbarian, S. (2007). GAD1 mRNA expression and DNA methylation in prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *PLoS One* 2, e809.
- Huang, H.S., Matevossian, A., Whittle, C., Kim, S.Y., Schumacher, A., Baker, S.P., and Akbarian, S. (2007). Prefrontal dysfunction in schizophrenia involves Mixed-Lineage Leukemia 1-Regulated histone methylation at GABAergic gene promoters. *The Journal of Neuroscience* 27, 11254–11262.
- Husa, A.P., Moilanen, J., Murray, G.K., Marttila, R., Haapea, M., Rannikko, I., Barnett, J.H., Jones, P.B., Isohanni, M., Remes, A.M., et al. (2017). Lifetime antipsychotic medication and cognitive performance in schizophrenia at age 43 years in a general population birth cohort. *Psychiatry Research* 247, 130–138.
- Ibi, D., and González-Maeso, J. (2015). Epigenetic signaling in schizophrenia. *Cellular Signalling* 27, 2131–2136.
- 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., et al. (2017). Antipsychotic-induced Hdac2 transcription via NF- $\kappa$ B leads to synaptic and cognitive side effects. *Nature Neuroscience* 20, 1247–1259.

- Ibrahim, H.M., and Tamminga, C.A. (2011). Schizophrenia: treatment targets beyond monoamine systems. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 51, 189–209.
- Ide, M., and Lewis, D.A. (2010). Altered cortical CDC42 signaling pathways in schizophrenia: implications for dendritic spine deficits. *Biological Psychiatry* 68, 25–32.
- Imamura, A., Morimoto, Y., Ono, S., Kurotaki, N., Kanegae, S., Yamamoto, N., Kinoshita, H., Tsujita, T., Okazaki, Y., and Ozawa, H. (2020). Genetic and environmental factors of schizophrenia and autism spectrum disorder: insights from twin studies. *Journal of Neural Transmission* 127, 1501–1515.
- Insel, T.R. (2010). Rethinking schizophrenia. *Nature* 468, 187–193.
- Jäkälä, P., Sirviö, J., Riekkinen, M., Koivisto, E., Kejonen, K., Vanhanen, M., and Riekkinen, P. (1999). Guanfacine and clonidine, alpha 2-agonists, improve paired associates learning, but not delayed matching to sample, in humans. *Neuropsychopharmacology* 20, 119-130.
- Jakovcevski, M., Ruan, H., Shen, E.Y., Dincer, A., Javidfar, B., Ma, Q., Peter, C.J., Cheung, I., Mitchell, A.C., Jiang, Y., et al. (2015). Neuronal Kmt2a/Mll1 histone methyltransferase is essential for prefrontal synaptic plasticity and working memory. *The Journal of Neuroscience* 35, 5097–5108.
- Jarome, T.J., and Lubin, F.D. (2014). Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory* 115, 116–127.
- Jarskog, L.F., Miyamoto, S., and Lieberman, J.A. (2007). Schizophrenia: new pathological insights and therapies. *Annual Review of Medicine* 58, 49–61.
- Javitt, D.C. (2010). Glutamatergic theories of schizophrenia. *The Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences* 47, 4-16.
- Ji, X.H., Ji, J.Z., Zhang, H., and Li, B.M. (2008). Stimulation of alpha2-adrenoceptors suppresses excitatory synaptic transmission in the medial prefrontal cortex of rat. *Neuropsychopharmacology* 33, 2263-2271.
- Jiang, L., Wang, M., Lin, S., Jian, R., Li, X., Chan, J., Dong, G., Fang, H., Robinson, A.E., and Snyder, M.P. (2020). A quantitative proteome map of the human body. *Cell* 183, 269-283.
- Jin, H., and Mosweu, I. (2017). The societal cost of schizophrenia: a systematic review. *Pharmacoeconomics* 35, 25–42.
- Jin, X.C., Ma, C.L., and Li, B.M. (2007). The  $\alpha(2A)$ -adrenoceptor agonist guanfacine improves spatial learning but not fear conditioning in rats. *Acta physiologica Sinica* 59, 739-744.
- Johnstone A.L., O'Reilly J.J., Patel A.J., Guo Z., Andrade N.S., Magistri M., Nathanson L., Esanov R., Miller B.H., Turecki G., Brothers S.P., Zeier Z., and Wahlestedt C. (2018). EZH1 is an antipsychotic-sensitive epigenetic modulator of social and motivational behavior that is dysregulated in schizophrenia. *Neurobiology of Disease* 119, 149-158.
- Kabbani, N., and Levenson, R. (2006). Antipsychotic-induced alterations in D2 dopamine receptor interacting proteins within the cortex. *Neuroreport* 17, 299-301.
- Kahn, R.S., and Keefe, R.S.E. (2013). Schizophrenia is a cognitive illness: time for a change in focus. *JAMA Psychiatry* 70, 1107–1112.
- Kalkman, H.O., and Loetscher, E. (2003). alpha2C-Adrenoceptor blockade by clozapine and other antipsychotic drugs. *European Journal of Pharmacology* 462, 33-40.
- Kano, S., Colantuoni, C., Han, F., Zhou, Z., Yuan, Q., Wilson, A., Takayanagi, Y., Lee, Y., Rapoport, J., Eaton, W., et al. (2013). Genome-wide profiling of multiple histone methylations in olfactory cells: further implications for cellular susceptibility to oxidative stress in schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 18, 740–742.

## Estudio de $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

- Karlsson, H., and Dalman, C. (2020). Epidemiological studies of prenatal and childhood infection and schizophrenia. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 44, 35-47.
- Kasper, S., and Resinger, E. (2003). Cognitive effects and antipsychotic treatment. *Psychoneuroendocrinology* 28, 27-38.
- Kawaura, K., Karasawa, J.I., Chaki, S., and Hikichi, H. (2014). Stimulation of postsynapse adrenergic  $\alpha$ 2A receptor improves attention/cognition performance in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Behavioural Brain Research* 270, 349-356.
- Kelker, M.S., Dancheck, B., Ju, T., Kessler, R.P., Hudak, J., Nairn, A.C., and Peti, W. (2007). Structural basis for spinophilin–neurabin receptor interaction. *Biochemistry* 46, 2333–2344.
- Khavari, B., and Cairns, M.J. (2020). Epigenomic dysregulation in schizophrenia: in search of disease etiology and biomarkers. *Cells* 9, 1837.
- Kim, S., Bobeica, I., Gamo, N.J., Arnsten, A.F.T., and Lee, D. (2012a). Effects of  $\alpha$ -2A adrenergic receptor agonist on time and risk preference in primates. *Psychopharmacology* 219, 363–375.
- Kim, S., Zavitsanou, K., Gurguis, G., and Webster, M.J. (2012b). Neuropathology markers and pathways associated with molecular targets for antipsychotic drugs in postmortem brain tissues: exploration of drug targets through the Stanley Neuropathology Integrative Database. *European Neuropsychopharmacology* 22, 683-694.
- Klimek, V., Rajkowska, G., Luker, S.N., Dilley, G., Meltzer, H.Y., Overholser, J.C., Stockmeier, C.A., and Ordway, G.A. (1999). Brain noradrenergic receptors in major depression and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 21, 69–81.
- Koh, P.O., Bergson, C., Undie, A.S., Goldman-Rakic, P.S., and Lidow, M.S. (2003). Up-regulation of the D1 dopamine receptor-interacting protein, calcyon, in patients with schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 60, 311-319.
- Kolluri, N., Sun, Z., Sampson, A.R., and Lewis, D.A. (2005). Lamina-specific reductions in dendritic spine density in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 162, 1200–1202.
- Konopaske, G.T., Dorph-Petersen, K.A., Pierri, J.N., Wu, Q., Sampson, A.R., and Lewis, D.A. (2007). Effect of chronic exposure to antipsychotic medication on cell numbers in the parietal cortex of macaque monkeys. *Neuropsychopharmacology* 32, 1216–1223.
- Koshibu, K., Gräff, J., Beullens, M., Heitz, F.D., Berchtold, D., Russig, H., Farinelli, M., Bollen, M., and Mansuy, I.M. (2009). Protein Phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *The Journal of Neuroscience* 29, 13079–13089.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Kraguljac, N.V., White, D.M., Hadley, J.A., Visscher, K., Knight, D., ver Hoef, L., Falola, B., and Lahti, A.C. (2015). Abnormalities in large scale functional networks in unmedicated patients with schizophrenia and effects of risperidone. *Neuroimage Clinical* 10, 146–158.
- Krajcovic, B., Fajnerova, I., Horacek, J., Kelemen, E., Kubik, S., Svoboda, J., and Stuchlik, A. (2019). Neural and neuronal discoordination in schizophrenia: from ensembles through networks to symptoms. *Acta Physiologica* 226, e13282.
- Krystal, J.H., Perry, E.B., Gueorguieva, R., Belger, A., Madonick, S.H., Abi-Dargham, A., Cooper, T.B., Macdougall, L., Abi-Saab, W., and D'Souza, D.C. (2005). Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. *Archives of General Psychiatry* 62, 985-994.
- 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., et al. (2012). HDAC2 regulates atypical antipsychotic responses through the modulation of mGlu2 promoter activity. *Nature Neuroscience* 15, 1245–1254.
- Labrie, V., Pai, S., and Petronis, A. (2012). Epigenetics of major psychosis: progress, problems, and perspectives. *Trends in Genetics* 28, 427–435.
- Lähdesmäki, J., Sallinen, J., MacDonald, E., and Scheinin, M. (2004). Alpha2A-adrenoceptors are important modulators of the effects of D-amphetamine on startle reactivity and brain monoamines. *Neuropsychopharmacology* 29, 1282–1293.
- Landek-Salgado, M.A., Faust, T.E., and Sawa, A. (2016). Molecular substrates of schizophrenia: homeostatic signaling to connectivity. *Molecular Psychiatry* 21, 10–28.
- Langer, S.Z. (1977). Sixth gaddum memorial lecture, National Institute for Medical Research, Mill Hill, January 1977. Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. *British Journal of Pharmacology* 60, 481–497.
- Langer S.Z. (1980). Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacological Reviews* 32, 337–362.
- Laskaris, L.E., Di Biase, M.A., Everall, I., Chana, G., Christopoulos, A., Skafidas, E., Copley, V.L., and Pantelis, C. (2016). Microglial activation and progressive brain changes in schizophrenia. *British Journal of Pharmacology* 173, 666–680.
- Latchman D.S. (2010). Gene control. Ed Garland Science.
- Law, A.J., Weickert, C.S., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., and Harrison, P.J. (2004a). Reduced spinophilin but not microtubule-associated protein 2 expression in the hippocampal formation in schizophrenia and mood disorders: molecular evidence for a pathology of dendritic spines. *American Journal of Psychiatry* 161, 1848–1855.
- Law, A.J., Hutchinson, L.J., Burnet, P.W.J., and Harrison, P.J. (2004b). Antipsychotics increase microtubule-associated protein 2 mRNA but not spinophilin mRNA in rat hippocampus and cortex. *Journal of Neuroscience Research* 76, 376–382.
- Le Pen, G., and Moreau, J.L. (2002). Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine, olanzapine and risperidone but not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology* 27, 1–11.
- Lee, A., Wissekerke, A.E., Rosin, D.L., and Lynch, K.R. (1998a). Localization of alpha2C-adrenergic receptor immunoreactivity in catecholaminergic neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 84, 1085–1096.
- Lee, A., Rosin, D.L., and Van Bockstaele, E.J. (1998b). Ultrastructural evidence for prominent postsynaptic localization of alpha2C-adrenergic receptors in catecholaminergic dendrites in the rat nucleus locus coeruleus. *The Journal of Comparative Neurology* 394, 218–229.
- Lee, K.Y., Lee, B.D., Park, J.M., Lee, Y.M., Moon, E., Jeong, H.J., Kim, S.Y., Suh, H., Chung, Y.I., and Kim, S.C. (2019). Investigation of maternal effects, maternal-fetal interactions, and parent-of-origin effects (imprinting) for candidate genes positioned on chromosome 18q21, in probands with schizophrenia and their first-degree relatives. *Psychiatry Investigation* 16, 450–458.
- Lehto J, Virta J.R., Oikonen V., Roivainen A., Luoto P., Arponen E., Helin S., Heitamäki j., Holopainen A., Kailajärvi M., et al. (2015). Test-retest reliability of 11 C-ORM-13070 in PET imaging of  $\alpha$  2C -adrenoceptors in vivo in the human brain. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 42, 120–127.
- Lett, T.A., Voineskos, A.N., Kennedy, J.L., Levine, B., and Daskalakis, Z.J. (2014). Treating working memory deficits in schizophrenia: a review of the neurobiology. *Biological Psychiatry* 75, 361–370.

## Estudio de $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

- Lewis, D.A., and González-Burgos, G. (2008). Neuroplasticity of neocortical circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 33, 141-165.
- Lewis, D.A., Hashimoto, T., and Morris, H.M. (2008). Cell and receptor type-specific alterations in markers of gaba neurotransmission in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Neurotoxicity Research* 14, 237-248.
- Li, B.M., and Mei, Z.T. (1994). Delayed-response deficit induced by local injection of the alpha 2-adrenergic antagonist yohimbine into the dorsolateral prefrontal cortex in young adult monkeys. *Behavioral and Neural Biology* 62, 134-139.
- Li, B.M., Mao, Z.M., Wang, M., and Mei, Z.T. (1999). Alpha-2 adrenergic modulation of prefrontal cortical neuronal activity related to spatial working memory in monkeys. *Neuropsychopharmacology* 21, 601-610.
- Lidow, M.S., Song, Z.M., Castner, S.A., Allen, P.B., Greengard, P., and Goldman-Rakic, P.S. (2001). Antipsychotic treatment induces alterations in dendrite- and spine-associated proteins in dopamine-rich areas of the primate cerebral cortex. *Biological Psychiatry* 49, 1-12.
- Liu, W., Yuen, E.Y., Allen, P.B., Feng, J., Greengard, P., and Yan, Z. (2006). Adrenergic modulation of NMDA receptors in prefrontal cortex is differentially regulated by RGS proteins and spinophilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18338-18343.
- Lochman, J., Balcar, V.J., Státný, F., and Serý, O. (2013). Preliminary evidence for association between schizophrenia and polymorphisms in the regulatory Regions of the ADRA2A, DRD3 and SNAP-25 Genes. *Psychiatry Research* 205, 7-12.
- Lopez-Castroman, J., Gómez, D.D., Belloso, J.J.C., Fernandez-Navarro, P., Perez-Rodriguez, M.M., Villamor, I.B., Navarrete, F.F., Ginestar, C.M., Currier, D., Torres, M.R., et al. (2010). Differences in maternal and paternal age between schizophrenia and other psychiatric disorders. *Schizophrenia Research* 116, 184-190.
- López-Gil, X., Artigas, F., and Adell, A. (2009). Role of different monoamine receptors controlling MK-801-induced release of serotonin and glutamate in the medial prefrontal cortex: relevance for antipsychotic action. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 12, 487-499.
- Lu, L., and Ordway, G.A. (1997). Alpha2C-adrenoceptors mediate inhibition of forskolin-stimulated cAMP production in rat striatum. *Brain Research Molecular Brain Research* 52, 228-234.
- Lu, R., Chen, Y., Cottingham, C., Peng, N., Jiao, K., Limbird, L.E., Wyss, J.M., and Wang, Q. (2010). Enhanced hypotensive, bradycardic, and hypnotic responses to  $\alpha$ 2-adrenergic agonists in spinophilin-null mice are accompanied by increased G protein coupling to the  $\alpha$ 2a-adrenergic receptor. *Molecular Pharmacology* 78, 279-286.
- Lubin, F.D., Gupta, S., Parrish, R.R., Grissom, N.M., and Davis, R.L. (2011). Epigenetic mechanisms: critical contributors to long-term memory formation. *The Neuroscientist* 17, 616-632.
- Luck, S.J., Hahn, B., Leonard, C.J., and Gold, J.M. (2019). The hyperfocusing hypothesis: a new account of cognitive dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 45, 991-1000.
- Madras, B.K. (2013). History of the discovery of the antipsychotic dopamine D2 receptor: a basis for the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Journal of the History of the Neurosciences* 22, 62-78.
- Magalhaes, A.C., Dunn, H., and Ferguson, S.S. (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *British Journal of Pharmacology* 165, 1717-1736.
- Mahgoub, M., and Monteggia, L.M. (2013). Epigenetics and psychiatry. *Neurotherapeutics* 10, 734-741.
- Malaspina, D., Corcoran, C., Fahim, C., Berman, A., Harkavy-Friedman, J., Yale, S., Goetz, D., Goetz, R., Harlap, S., and Gorman, J. (2002). Paternal age and sporadic schizophrenia: evidence for de novo mutations.

- American Journal of Medical Genetics *114*, 299-303.
- Maletic, V., Eramo, A., Gwin, K., Offord, S.J., and Duffy, R.A. (2017). The role of norepinephrine and its  $\alpha$ -adrenergic receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder and schizophrenia: a systematic review. *Frontiers in Psychiatry* *8*, 42.
- Marcus, M.M., Jardemark, K.E., Wadenberg, M.L., Langlois, X., Hertel, P., and Svensson, T.H. (2005). Combined  $\alpha_2$  and D2/3 receptor blockade enhances cortical glutamatergic transmission and reverses cognitive impairment in the rat. *International Journal of Neuropsychopharmacology* *8*, 315–327.
- Marder, S.R., and Cannon, T.D. (2019). Schizophrenia. *New England Journal of Medicine* *381*, 1753-1761.
- Maric, N.P., Jovicic, M.J., Mihaljevic, M., and Miljevic, C. (2016). Improving current treatments for schizophrenia. *Drug Development Research* *77*, 357–367.
- Maze, I., Noh, K.M., and Allis, C.D. (2013). Histone regulation in the CNS: basic principles of epigenetic plasticity. *Neuropsychopharmacology* *38*, 3-22.
- McCullumsmith, R.E., and Meador-Woodruff, J.H. (2011). Novel approaches to the study of postmortem brain in psychiatric illness: old limitations and new challenges. *Biological Psychiatry* *69*, 127–133.
- McCutcheon, R.A., Marques, T., and Howes, O.D. (2020). Schizophrenia—an overview. *JAMA Psychiatry* *77*, 201–210.
- Meador-Woodruff, J.H., and Healy, D.J. (2000). Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Research Brain Research Reviews* *31*, 288-294.
- Meana, J.J., Barturen, F., and García-Sevilla, J.A. (1992). Alpha 2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. *Biological Psychiatry* *31*, 471-490.
- Meana J.J., and García-Sevilla J.A. (1987). Increased  $\alpha_2$ -adrenoceptor density in the frontal cortex of depressed suicide victims. *Journal of Neural Transmission* *70*, 377-381.
- Meltzer, H.Y., and Massey, B.W. (2011). The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Current Opinion in Pharmacology* *11*, 59-67.
- Meshul, C.K., Janowsky, A., Casey, D.E., Stallbaumer, R.K., and Taylor, B. (1992). Effect of haloperidol and clozapine on the density of “perforated” synapses in caudate, nucleus accumbens, and medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology* *106*, 45-52.
- Mi, Z., Abrahamson, E.E., Ryu, A.Y., Fish, K.N., Sweet, R.A., Mufson, E.J., and Ikonovic, M.D. (2017). Loss of precuneus dendritic spines immunopositive for spinophilin is related to cognitive impairment in early Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging* *55*, 159–166.
- Mill, J., Tang, T., Kaminsky, Z., Khare, T., Yazdanpanah, S., Bouchard, L., Jia, P., Assadzadeh, A., Flanagan, J., Schumacher, A., et al. (2008). Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *American Journal of Human Genetics* *82*, 696–711.
- Mitchell, A., Roussos, P., Peter, C., Tsankova, N., and Akbarian, S. (2014). The future of neuroepigenetics in the human brain. *Progress in Molecular Biology in Translational Science* *128*, 199–228.
- Moura, E., Pinto, C.E., Serrão, M.P., Afonso, J., and Vieira-Coelho, M.A. (2012). Adrenal  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in the aging normotensive and spontaneously hypertensive rat. *Neurobiology of Aging* *33*, 969-978.
- Moyer, C.E., Erickson, S.L., Fish, K.N., Thiels, E., Penzes, P., and Sweet, R.A. (2016). Developmental trajectories of auditory cortex synaptic structures and gap-prepulse inhibition of acoustic startle between early adolescence and young adulthood in mice. *Cerebral Cortex* *26*, 2115–2126.

## Estudio de $\alpha 2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

- Muguruza, C., Moreno, J.L., Umali, A., Callado, L.F., Meana, J.J., and González-Maeso, J. (2013). Dysregulated 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding in postmortem frontal cortex of schizophrenic subjects. *European Neuropsychopharmacology* 23, 852–864.
- Muly, E.C., Smith, Y., Allen, P.B., and Greengard, P. (2004a). Subcellular distribution of spinophilin immunolabeling in primate prefrontal cortex: localization to and within dendritic spines. *Journal of Comparative Neurology* 469, 185–197.
- Muly, E.C., Allen, P.B., Mazloom, M., Aranbayeva, Z., Greenfield, A.T., and Greengard, P. (2004b). Subcellular distribution of neurabin immunolabeling in primate prefrontal cortex: comparison with spinophilin. *Cerebral Cortex* 14, 1398–1407.
- Nativio, R., Donahue, G., Berson, A., Lan, Y., Amlie-Wolf, A., Tuzer, F., Toledo, J.B., Gosai, S.J., Gregory, B.D., Torres, C., et al. (2018). Dysregulation of the epigenetic landscape of normal aging in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience* 21, 497-505.
- Nestler, E.J., Peña, C.J., Kundakovic, M., Mitchell, A., and Akbarian, S. (2016). Epigenetic basis of mental illness. *Neuroscientist* 22, 447–463.
- Nielsen, R.E., Levander, S., Kjaersdam Tellús, G., Jensen, S.O.W., Østergaard Christensen, T., and Leucht, S. (2015). Second-generation antipsychotic effect on cognition in patients with schizophrenia—a meta-analysis of randomized clinical trials. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 131, 185–196.
- Nørbak-Emig, H., Ebdrup, B.H., Fagerlund, B., Svarer, C., Rasmussen, H., Friberg, L., Allerup, P.N., Rostrup, E., Pinborg, L.H., and Glenthøj, B.Y. (2016). Frontal D<sub>2/3</sub> Receptor availability in schizophrenia patients before and after their first antipsychotic treatment: relation to cognitive functions and psychopathology. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 19, pyw006.
- Ohi, K., Sumiyoshi, C., Fujino, H., Yasuda, Y., Yamamori, H., Fujimoto, M., Shiino, T., Sumiyoshi, T., and Hashimoto, R. (2018). Genetic overlap between general cognitive function and schizophrenia: a review of cognitive GWASs. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 3822.
- Okada, F., Tokumitsu, Y., Takahashi, N., Crow, T.J., and Roberts, G.W. (1994). Reduced concentrations of the alpha-subunit of GTP-binding protein Go in schizophrenic brain. *Journal of Neural Transmission. General Section* 95, 95–104.
- Olesen, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Wittchen, H.U., Jönsson, B., on behalf of the CDBE2010 study group, and the European Brain Council (2012). The economic cost of brain disorders in Europe. *European Journal of Neurology* 19, 155–162.
- Omachi, Y., and Sumiyoshi, T. (2018). Dose reduction/discontinuation of antipsychotic drugs in psychosis; effect on cognition and functional outcomes. *Frontiers in Psychiatry* 9, 447.
- Ordway G., Widdowson P., Smith K., and Halaris A. (1994). Agonist binding to  $\alpha 2$ -adrenoceptors is elevated in the locus coeruleus from victims of suicide. *Journal of Neurochemistry* 63, 617-624.
- Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia> [Consultado el 27 de noviembre de 2020].
- Ouimet, C.C., Katona, I., Allen, P.B., Freund, T.F., and Greengard, P. (2004). Cellular and subcellular distribution of spinophilin, a PP1 regulatory protein that bundles F-actin in dendritic spines. *Journal of Comparative Neurology* 479, 374–388.
- Ovenden, E.S., McGregor, N.W., Emsley, R.A., and Warnich, L. (2018). DNA methylation and antipsychotic treatment mechanisms in schizophrenia: progress and future directions. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 81, 38-49.
- Owen, M.J., Sawa, A., and Mortensen, P.B. (2016). Schizophrenia. *Lancet* 388, 86–97.
- Pandurangi, A.K., and Buckley, P.F. (2020). Inflammation, antipsychotic drugs, and evidence for



- effectiveness of anti-inflammatory agents in schizophrenia. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 44, 227-244.
- Pazos, A., González, A.M., Pascual, J., Meana, J.J., Barturen, F., and García-Sevilla, J.A. (1988). Alpha 2-adrenoceptors in human forebrain: autoradiographic visualization and biochemical parameters using the agonist [3H]UK-14304. *Brain Research* 475, 361-365.
- Peter, C.J., and Akbarian, S. (2011). Balancing histone methylation activities in psychiatric disorders. *Trends in Molecular Medicine* 17, 372-379.
- Philipp M., Brede M., and Hein L. (2002). Physiological significance of  $\alpha$ 2-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 283, R287-R295.
- Puig, M.V., and Miller, E.K. (2012). The role of prefrontal dopamine D1 receptors in the neural mechanisms of associative learning. *Neuron* 74, 874-886.
- Punzi, G., Bharadwaj, R., and Ursini, G. (2018). Neuroepigenetics of schizophrenia. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 158, 195-226.
- Qu, L., Zhou, Q., Xu, Y., Guo, Y., Chen, X., Yao, D., Han, G.W., Liu, Z.J., Stevens, R.C., Zhong, G., et al. (2019). Structural basis of the diversity of adrenergic receptors. *Cell Reports* 29, 2929-2935.
- Ragusa, M.J., Dancheck, B., Critton, D.A., Nairn, A.C., Page, R., and Peti, W. (2010). Spinophilin directs Protein Phosphatase 1 specificity by blocking substrate binding sites. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 459-464.
- Ramos, B.P., and Arnsten, A.F.T. (2007). Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacology & Therapeutics* 113, 523-536.
- Ramos, B.P., Birnbaum, S.G., Lindenmayer, I., Newton, S.S., Duman, R.S., and Arnsten, A.F.T. (2003). Dysregulation of Protein Kinase A Signaling in the aged prefrontal cortex: new strategy for treating age-related cognitive decline. *Neuron* 40, 835-845.
- Ramos, B.P., Stark, D., Verduzco, L., van Dyck, C.H., and Arnsten, A.F.T. (2006).  $\alpha$ 2A-adrenoceptor stimulation improves prefrontal cortical regulation of behavior through inhibition of cAMP signaling in aging animals. *Learning & Memory* 13, 770-776.
- Rice, H.E., Smith, C.B., Silk, K.R., and Rosen, J. (1984). Platelet alpha 2-adrenergic receptors in schizophrenic patients before and after phenothiazine treatment. *Psychiatry Research* 12, 69-77.
- Richelson E., and Souder T. (2000). Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors. Focus on newer generation compounds. *Life Sciences* 68, 29-39.
- Richetto, J., and Meyer, U. (2021). Epigenetic modifications in schizophrenia and related disorders: molecular scars of environmental exposures and source of phenotypic variability. *Biological Psychiatry* 89, 215-226.
- Richman, J.G., Brady, A.E., Wang, Q., Hensel, J.L., Colbran, R.J., and Limbird, L.E. (2001). Agonist-regulated interaction between  $\alpha$ 2-adrenergic receptors and spinophilin. *Journal of Biological Chemistry* 276, 15003-15008.
- Rivero, G., Gabilondo, A.M., García-Sevilla, J.A, La Harpe, R., Callado, L.F., and Meana, J.J. (2014). Increased  $\alpha$ 2- and  $\beta$ 1-adrenoceptor densities in postmortem brain of subjects with depression: differential effect of antidepressant treatment. *Journal of Affective Disorders* 167, 343-350.
- Robbins, T.W., and Arnsten, A.F.T. (2009). The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annual Review of Neuroscience* 32, 267-287.
- Rudenko, A., and Tsai, L.H. (2014). Epigenetic modifications in the nervous system and their impact upon

## Estudio de $\alpha$ 2-AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

- cognitive impairments. *Neuropharmacology* 80, 70-82.
- Ruuskanen J.O., Laurila J., Xhaard H., Rantanen V.V., Vuoriluoto K., Wurster S., Marjamäki A., Vainio M., Johnson M.S., and Scheinin M. (2005). Conserved structural, pharmacological and functional properties among the three human and five zebrafish  $\alpha$ 2-adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology* 144, 165-177.
- Sakata, K., and Duke, S.M. (2014). Lack of BDNF expression through promoter IV disturbs expression of monoamine genes in the frontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 260, 265-275.
- Sallee, F., Connor, D.F., and Newcorn, J.H. (2013). A review of the rationale and clinical utilization of  $\alpha$ 2-adrenoceptor agonists for the treatment of attention-deficit/hyperactivity and related disorders. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 23, 308-319.
- Sallinen, J., Haapalinna, A., Viitamaa, T., Kobilka, B.K., and Scheinin, M. (1998). Adrenergic  $\alpha$ 2C-receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. *The Journal of Neuroscience* 18, 3035-3042.
- Sallinen, J., Holappa, J., Koivisto, A., Kuokkanen, K., Chapman, H., Lehtimäki, J., Piepponen, P., Mijatovic, J., Tanila, H., Virtanen, R., et al. (2013). Pharmacological characterisation of a structurally novel  $\alpha$ 2c-adrenoceptor antagonist ORM-10921 and its effects in neuropsychiatric models. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 113, 239-249.
- Samara, M.T., Klupp, E., Helfer, B., Rothe, P.H., Schneider-Thoma, J., and Leucht, S. (2018). Increasing antipsychotic dose for non response in schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018, CD011883.
- Santana, N., Mengod, G., and Artigas, F. (2013). Expression of  $\alpha$ (1)-adrenergic receptors in rat prefrontal cortex: cellular co-localization with 5-HT(2A) receptors. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 16, 1139-1151.
- Sara, S.J., and Hervé-Minvielle, A. (1995). Inhibitory influence of frontal cortex on locus coeruleus neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6032-6036.
- Sarrouilhe, D., di Tommaso, A., Métayé, T., and Ladeveze, V. (2006). Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie* 88, 1099-1113.
- Sastre, M., and García-Sevilla, J.A. (1994). Alpha 2-adrenoceptor subtypes identified by [3H]RX821002 binding in the human brain: the agonist guanoxabenz does not discriminate different forms of the predominant alpha 2A subtype. *Journal of Neurochemistry* 63, 1077-1085.
- Sastre M., Guimón J., and García-Sevilla, J.A. (2001). Relationships between beta- and alpha2-adrenoceptors and G coupling proteins in the human brain: effects of age and suicide. *Brain Research* 898, 242-255.
- Satoh, A., Nakanishi, H., Obaishi, H., Wada, M., Takahashi, K., Satoh, K., Hirao, K., Nishioka, H., Hata, Y., Mizoguchi, A., et al. (1998). Neurabin-II/spinophilin: an actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *Journal of Biological Chemistry* 273, 3470-3475.
- Sawaguchi, T., and Goldman-Rakic, P.S. (1991). D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science* 251, 947-950.
- Schlicker, E., and Feuerstein, T. (2017). Human presynaptic receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 172, 1-21.
- Sekar, A., Bialas, A.R., de Rivera, H., Davis, A., Hammond, T.R., Kamitaki, N., Tooley, K., Presumey, J., Baum, M., Van Doren, V., et al. (2016). Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530, 177-183.

- Smigielski, L., Jagannath, V., Rössler, W., Walitza, S., and Grünblatt, E. (2020). Epigenetic mechanisms in schizophrenia and other psychotic disorders: a systematic review of empirical human findings. *Molecular Psychiatry* 25, 1718–1748.
- Smith, F.D., Oxford, G.S., and Milgram, S.L. (1999). Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a Protein Phosphatase-1-interacting protein. *Journal of Biological Chemistry* 274, 19894–19900.
- Sokolowski, M., and Wasserman, D. (2020). Genetic origins of suicidality? A synopsis of genes in suicidal behaviours, with regard to evidence diversity, disorder specificity and neurodevelopmental brain transcriptomics. *European Neuropsychopharmacology* 37, 1-11.
- Steiner, J., Brisch, R., Schiltz, K., Dobrowolny, H., Mawrin, C., Krzyżanowska, M., Bernstein, H.G., Jankowski, Z., Braun, K., Schmitt, A., et al. (2016). GABAergic system impairment in the hippocampus and superior temporal gyrus of patients with paranoid schizophrenia: a post-mortem study. *Schizophrenia Research* 177, 10-17.
- Stilo, S.A., and Murray, R.M. (2019). Non-Genetic factors in schizophrenia. *Current Psychiatry Reports* 21, 100.
- Sui, L., Wang, Y., Ju, L.H., and Chen, M. (2012). Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory* 97, 425-440.
- Sullivan, P.F., Kendler, K.S., and Neale, M.C. (2003). Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives of General Psychiatry* 60, 1187-1192.
- Sweet, R.A., Henteloff, R.A., Zhang, W., Sampson, A.R., and Lewis, D.A. (2009). Reduced dendritic spine density in auditory cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34, 374–389.
- Tandon, R., Nasrallah, H.A., and Keshavan, M.S. (2009). Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia Research* 110, 1-23.
- Tang, B., Dean, B., and Thomas, E.A. (2011). Disease- and age-related changes in histone acetylation at gene promoters in psychiatric disorders. *Translational Psychiatry* 1, e64.
- Tansey K.E., and Hill M.J. (2018). Enrichment of schizophrenia heritability in both neuronal and glia cell regulatory elements. *Translational Psychiatry* 8, 7.
- Teffer, K., and Semendeferi, K. (2012). Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. *Progress in Brain Research* 195, 191-218.
- Thomas, E.A. (2017). Histone posttranslational modifications in schizophrenia. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 978, 237-254.
- Topolov, M.K., and Getova, D.P. (2016). Cognitive impairment in schizophrenia, neurotransmitters and the new atypical antipsychotic aripiprazole. *Folia Medica* 58, 12-18.
- Tóth, A., Petykó, Z., Gálosi, R., Szabó, I., Karádi, K., Feldmann, Á., Kállai, V., Karádi, Z., and Lénárd, L. (2017). Neuronal coding of auditory sensorimotor gating in medial prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research* 326, 200-208.
- Trendelenburg, A.U., Klebroff, W., Hein, L., and Starke, K. (2001). A study of presynaptic  $\alpha 2$ -autoreceptors in  $\alpha 2A/D$ -,  $\alpha 2B$ - and  $\alpha 2C$ -adrenoceptor-deficient mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 364, 117–130.
- Tripathi, A., Kar, S.K., and Shukla, R. (2018). Cognitive deficits in schizophrenia: understanding the biological correlates and remediation strategies. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* 16, 7–17.

## Estudio de $\alpha 2$ -AR y espinofilina en la CPF *postmortem* de sujetos con SZ

- Uranova, N.A., Orlovskaya, D.D., Apel, K., Klintsova, A.J., Haselhorst, U., and Schenk, H. (1991). Morphometric study of synaptic patterns in the rat caudate nucleus and hippocampus under haloperidol treatment. *Synapse* 7, 253-259.
- Uys, M., Shahid, M., Sallinen, J., Dreyer, W., Cockeran, M., and Harvey, B.H. (2016). The  $\alpha 2C$ -adrenoceptor antagonist, ORM-10921, has antipsychotic-like effects in social isolation reared rats and bolsters the response to haloperidol. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 71, 108-116.
- Uys, M., Shahid, M., Sallinen, J., and Harvey, B.H. (2017a). The  $\alpha 2C$ -adrenoceptor antagonist, ORM-10921, exerts antidepressant-like effects in the Flinders Sensitive Line rat. *Behavioural Pharmacology* 28, 9-18.
- Uys, M., Shahid, M., and Harvey, B.H. (2017b). Therapeutic potential of selectively targeting the  $\alpha 2c$ -adrenoceptor in cognition, depression, and schizophrenia—new developments and future perspective. *Frontiers in Psychiatry* 8, 144.
- Van de Leemput, J., Hess, J.L., Glatt, S.J., and Tsuang, M.T. (2016). Genetics of schizophrenia: historical insights and prevailing evidence. *Advances in Genetics* 96, 99-141.
- Van Os, J., and Kapur, S. (2009). Schizophrenia. *The Lancet* 374, 635-645.
- Valdizán E.M., Díez-Alarcia R. González-Maeso J., Pilar-Cuéllar F., García-Sevilla J.A., Meana J.J., and Pazos A. (2010).  $\alpha 2$ -adrenoceptor functionality in postmortem frontal cortex of depressed suicide victims. *Biological Psychiatry* 68, 869-872.
- Veselinović, T., Scharpenberg, M., Heinze, M., Cordes, J., Mühlbauer, B., Juckel, G., Habel, U., Rüter, E., Timm, J., and Gründer, G. (2019). Disparate effects of first and second generation antipsychotics on cognition in schizophrenia- Findings from the randomized NeSSy trial. *European Neuropsychopharmacology* 29, 720-739.
- Vijayraghavan, S., Wang, M., Birnbaum, S.G., Williams, G.V., and Arnsten, A.F.T. (2007). Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nature Neuroscience* 10, 376-384.
- Vijayraghavan, S., Major, A.J., and Everling, S. (2016). Dopamine D1 and D2 receptors make dissociable contributions to dorsolateral prefrontal cortical regulation of rule-guided oculomotor behavior. *Cell Reports* 16, 805-816.
- Vincent, S.L., Adamec, E., Sorensen, I., and Benes, F.M. (1994). The effects of chronic haloperidol administration on GABA-immunoreactive axon terminals in rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 17, 26-35.
- Wang, M., Ramos, B.P., Paspalas, C.D., Shu, Y., Simen, A., Duque, A., Vijayraghavan, S., Brennan, A., Dudley, A., Nou, E., et al. (2007a).  $\alpha 2A$ -Adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* 129, 397-410.
- Wang, M., Yang, Y., Wang, C.J., Gamo, N.J., Jin, L.E., Mazer, J.A., Morrison, J.H., Wang, X.J., and Arnsten, A.F.T. (2013). NMDA receptors subserve persistent neuronal firing during working memory in dorsolateral prefrontal cortex. *Neuron* 77, 736-749.
- Wang, Q., and Limbird, L.E. (2002). Regulated interactions of the alpha 2A adrenergic receptor with spinophilin, 14-3-3zeta, and arrestin 3. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 50589-50596.
- Wang, Q., Zhao, J., Brady, A.E., Feng, J., Allen, P.B., Lefkowitz, R.J., Greengard, P., and Limbird, L.E. (2004). Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors. *Science* 304, 1940-1944.
- Wang, X., Zeng, W., Kim, M.S., Allen, P.B., Greengard, P., and Muallem, S. (2007b). Spinophilin/neurabin reciprocally regulate signaling intensity by G protein-coupled receptors. *The EMBO Journal* 26, 2768-2776.

- Webster, M.J., Elashoff, M., and Weickert, C.S. (2011). Molecular evidence that cortical synaptic growth predominates during the first decade of life in humans. *International Journal of Developmental Neuroscience* 29, 225–236.
- Weickert, C.S., Straub, R.E., McClintock, B.W., Matsumoto, M., Hashimoto, R., Hyde, T.M., Herman, M.M., Weinberger, D.R., and Kleinman, J.E. (2004). Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain. *Archives of General Psychiatry* 61, 544–555.
- Weickert, C.S., Rothmond, D.A., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., and Straub, R.E. (2008). Reduced DTNBP1 (dysbindin-1) mRNA in the hippocampal formation of schizophrenia patients. *Schizophrenia Research* 98, 105–110.
- Williams, R.B., Marchuk, D.A., Gadde, K.M., Barefoot, J.C., Grichnik, K., Helms, M.J., Kuhn, C.M., Lewis, J.G., Schanberg, S.M., Stafford-Smith, M., et al. (2003). Serotonin-related gene polymorphisms and central nervous system serotonin function. *Neuropsychopharmacology* 28, 533–541.
- Woolley, D.W., and Shaw, E. (1954). A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 40, 228–231.
- World Health Organization (1992). The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: diagnostic criteria for research.
- Xin, Y., Chanrion, B., O'Donnell, A.H., Milekic, M., Costa, R., Ge, Y., and Haghghi, F.G. (2012). MethylomeDB: a database of DNA methylation profiles of the brain. *Nucleic Acids Research* 40, D1245–D1249.
- Xu, J., Chen, Y., Lu, R., Cottingham, C., Jiao, K., and Wang, Q. (2008). Protein kinase a phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with the  $\alpha$ 2A-adrenergic receptor (AR) and alters temporal properties of  $\alpha$ 2A AR internalization. *Journal of Biological Chemistry* 283, 14516–14523.
- Yamaguchi, Y., Lee, Y.A., and Goto, Y. (2015). Dopamine in socioecological and evolutionary perspectives: implications for psychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience* 9, 219.
- Yi, F., Liu, S.S., Luo, F., Zhang, X.H., and Li, B.M. (2013). Signaling mechanism underlying  $\alpha$ 2A -adrenergic suppression of excitatory synaptic transmission in the medial prefrontal cortex of rats. *The European Journal of Neuroscience* 38, 2364–2373.
- Yin, D.M., Chen, Y.J., Sathyamurthy, A., Xiong, W.C., and Mei, L. (2012). Synaptic dysfunction in schizophrenia. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 970, 493–516.
- Zamanpoor, M. (2020). Schizophrenia in a genomic era: a review from the pathogenesis, genetic and environmental etiology to diagnosis and treatment insights. *Psychiatric Genetics* 30, 1–9.
- Zhu, J., Zhuo, C., Liu, F., Qin, W., Xu, L., and Yu, C. (2016). Distinct disruptions of resting-state functional brain networks in familial and sporadic schizophrenia. *Scientific Reports* 6, 23577.