



C/EBPs EN LA ACTIVACIÓN GLIAL

Tesis doctoral presentada por

Aroa Ejarque Ortiz

Barcelona, febrero 2008

Esta tesis se ha realizado bajo la dirección del Dr. Josep Saura Martí y el Dr. Joan Serratosa Serdà en el Departamento de Isquemia Cerebral y Neurodegeneración del Instituto de Investigaciones Biomedicas de Barcelona.

Tesis adscrita al Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.

Programa de Neurociencias, bienio 2003-2005

Barcelona, abril de 2008

ABREVIACIONES

20-HETE	Ácido 20-hidroxicicosatetraenoico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNF	factor neurotrófico dependiente de actividad
AINEs	antiinflamatorios no esteroideos
AP-1, -2	activating protein-1, -2
APC	células presentadoras de antígeno
APP	proteína precursora del péptido beta-amiloide
ARN	ácido ribonucleico
ATF	activating transcription factor
ATP	adenosina tri-fosfato
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BHE	barrera hematoencefálica
BTEB	basic transcription element-binding protein
CD	cluster of differentiation
CdKIs	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina
CNPasa	cyclic nucleotide phosphohydrolase
CNTF	factor neurotrófico ciliar
COX-1	ciclooxigenasa-1
COX-2	ciclooxigenasa-2
CR3	receptor del complemento 3
CREB	cAMP response element-binding
CSF	factor estimulador de colonias
DFF	DMEM:F12 con suero FBS
EAE	encefalomielitis autoinmune experimental
ELA	esclerosis lateral amiotrófica
EM	esclerosis múltiple
EP	enfermedad de Parkinson
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GABA	ácido gamma-aminobutírico
GDNF	cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GLAST	transportador de glutamato/aspartato

GLT-1	transportador de glutamato-1
GLUT4	transportador de glucosa-4
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
IBA-1	ionized calcium-binding adapter molecule-1
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular-1
IFN	interferón
IL	interleuquina
IL-1ra	antagonista del receptor de interleuquina 1
ILF1	interleukin enhancer binding factor
IP-10	proteína inducible por interferón-10
LAP	liver-enriched transcriptional activator protein
LIF	factor inhibidor de leucemia
LIP	liver-enriched transcriptional inhibitor protein
LPS	lipopolisacárido
MAC	complejo de ataque de membrana
MAO-B	monoaminoxidasa-B
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno
MBP	proteína básica de la mielina
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
M-CSF	factor estimulador de colonias de macrófagos
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MIP-1α	macrophage inflammatory protein 1 alpha
MIP-1β	macrophage inflammatory protein 1 beta
MMP3	metaloproteinasa-3
MOG	glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos
MPTP	1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina
NADPH	nicotinamida-adenina fosfato deshidrogenasa
NF-1	factor nuclear-1
NF-AT	factor nuclear de células T activadas
NF-Y	factor nuclear-Y
NF-κB	factor nuclear-kappa B
NGF	factor de crecimiento nervioso
NK	natural killer
NMDA	ácido N-metil-D-aspartico

NO	óxido nítrico
NOS-II	sintasa de óxido nítrico-II
NT-3	factor neurotrófico-3
OPCs	células precursoras de oligodendrocitos
PDFAαR	platelet derived growth factor alpha receptor
PGE2	prostaglandina E2
PPARγ	peroxisome proliferator agonist receptor- gamma
PRRs	receptores de reconocimiento de patrones
RAGE	receptor for advanced glycation end products
ROS	radicales de oxígeno
SCD1	stearoyl-coA desaturase 1
SNC	sistema nervioso central
SOD	superóxido dismutasa
STATs	signal transducers and activators of transcription
TGF-α	factor transformante de crecimiento - alfa
TGF-β	factor transformante de crecimiento - beta
TLRs	receptores toll-like
TNF	factor de necrosis tumoral
TNFR I	receptor de factor de necrosis tumoral I
TNFR II	receptor de factor de necrosis tumoral II
USF	upstream stimulating factor
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	<i>SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y CÉLULAS GLIALES</i>	3
1.1.1	Oligodendrocitos	5
1.1.1.	Astroцитos	6
1.1.2.	Microglía	15
1.1.3.	Células NG2+	20
1.1.4.	Otras células inmunitarias del SNC	21
1.2.	<i>ACTIVACIÓN GLIAL</i>	24
1.2.1.	Proliferación	28
1.2.2.	Fagocitosis y presentación de antígeno	28
1.2.3.	Mediadores inflamatorios.....	33
1.2.4.	Factores de transcripción en la activación glial	45
1.3.	<i>ACTIVACIÓN GLIAL EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....</i>	60
1.3.1.	Enfermedad de Alzheimer	61
1.3.2.	Enfermedad de Parkinson	63
1.3.3.	Esclerosis Múltiple.....	64
1.3.4.	Esclerosis Lateral Amiotrófica	66
2	OBJETIVOS	69
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
3.1	<i>MATERIALES.....</i>	75
3.1.1	Productos	75
3.1.2	Anticuerpos	77
3.1.3	Primers	78
3.1.4	ARN de interferencia: oligonucleótidos de ARN de cadena corta	79
3.1.5	ARN de interferencia: oligonucleótidos de ADN para plásmido pTER	80
3.2	<i>CULTIVOS CELULARES</i>	81
3.2.1	Cultivos primarios.....	81
3.2.2	Cultivos de líneas celulares	89
3.3	<i>TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS</i>	92
3.3.1	Western Blot	92
3.3.2	Inmunocitoquímica	99
3.3.3	Tinción de núcleos con Hoechst-33258	106
3.3.5	ELISA.....	108
3.3.6	Co-inmunoprecipitación.....	111
3.4	<i>BIOLOGÍA MOLECULAR.....</i>	113
3.4.1	Genotipado de ratones.....	113
3.4.2	Generación de plásmidos pTER.....	118
3.4.3	Transfección de plásmidos	127
3.4.4	Selección clonal	130
3.4.5	Transfección de cultivos mixtos con siRNA.....	133
3.4.6	PCR en tiempo real.....	134
3.5	<i>SAPA (Streptavidin Agarose Pulldown Assay)</i>	141
3.6	<i>EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....</i>	143
3.6.1	Extracción de proteína total.....	143
3.6.2	Extracción de proteína nuclear (método osmótico)	144
3.6.3	Extracción de proteína nuclear a partir de tejido (método osmótico)	147
3.6.4	Extracción de proteína nuclear (método RIPA).....	148
3.6.5	Extracción de proteína nuclear (para experimentos de SAPA).....	148

3.6.6	Extracción de proteína nuclear (para co-inmunoprecipitación).....	151
3.7	OTRAS TÉCNICAS.....	153
3.7.1	Determinación de nitritos en medio de cultivo.....	153
3.7.2	Citometría de flujo.....	154
3.8	TRATAMIENTOS.....	157
3.8.1	Tratamiento con LPS in vivo.....	157
3.8.2	Tratamientos in vitro.....	157
4	RESULTADOS.....	159
4.1	PRIMER TRABAJO.....	161
	<i>Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia</i> Ejarque-Ortiz A., Medina M.G., Tusell J.M., Pérez-González A.P., Serratosa J., Saura J. <i>Glia</i> 55(2): 178-88 (2007)	
4.2	SEGUNDO TRABAJO.....	175
	<i>CCAAT/enhancer binding protein-alpha is down-regulated by toll-like receptor agonists in microglial cells</i> Ejarque-Ortiz A., Tusell J.M., Serratosa J., Saura J. <i>Journal of Neuroscience Research</i> 85 (5): 985-983 (2007)	
4.3	TERCER TRABAJO.....	187
	<i>CCAAT/enhancer binding protein delta in microglial activation</i> Ejarque-Ortiz A., Gresa N., Straccia M., Carme Solà C., Maria Tusell J.M., Serratosa J., Saura J <i>Submitted to Journal of Neurochemistry</i>	
4.4	CUARTO TRABAJO.....	215
	<i>CCAAT/enhancer binding protein beta regula la expresión de genes proinflamatorios durante la activación glial</i> Ejarque-Ortiz A. y Straccia M., Serratosa J., Saura J.	
5	DISCUSIÓN.....	241
6	CONCLUSIONES.....	249
7	ANEXO.....	253
	<i>P21^{Cip1} In Glial Activation.....</i>	255
	Tusell J.M., Ejarque-Ortiz A., Solà C., Saura J. and Serratosa J.....	255
	<i>Submitted to Glia.....</i>	255
8	BIBLIOGRAFÍA.....	287

1 INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y CÉLULAS GLIALES

El término neuroglía proviene de la palabra compuesta por “neuro” y “glía”, del griego “gliok”, que significa “cemento, pegamento”. Dicho término fue acuñado por primera vez en 1856 por el patólogo Rudolph Virchow (1821-1902) en referencia a “una sustancia conjuntiva, una especie de cemento, en el que los elementos nerviosos se encuentran embebidos”. Dicha definición, sin embargo, se estableció antes incluso de que se produjera el descubrimiento de los elementos celulares que forman parte de la misma. Así, Virchow utilizó este término para denominar a una sustancia o sincitio y no a las células gliales en sí mismas.

Cinco años antes de que Virchow publicara estas observaciones, Heinrich Müller (1820-1864) observó la presencia de fibras radiales en la retina de diferentes especies animales y les atribuyó la identidad de célula tras observar que dichas fibras presentaban un soma y un núcleo. Müller publicó sus observaciones, junto con unos dibujos que se consideran las primeras imágenes de una célula glial, el mismo año en el que Virchow definió la neuroglía por primera vez. Sin embargo, fue éste el primero que introdujo la teoría de la existencia de un tejido neuroglial.

Pronto neuroglía y células neurogliales derivaron en sinónimos, con el asentamiento de la Teoría Celular pronunciada por Theodor Schwann (1810-1882), por la que “todos los organismos están formados por células y éstas constituyen la unidad fisiológica de la vida”. En 1909 Otto Deiters proporcionó la primera imagen de lo que hoy conocemos como astrocitos en su libro “Histology of the Nervous System”, describiéndolas como parte del tejido conjuntivo, descrito anteriormente por Virchow presentes en la sustancia blanca y también en la gris.

Con la llegada de la “reazione nera” o técnica de impregnación con cromato de plata de Camillo Golgi (1843-1926), que permitía teñir tanto neuronas como células gliales, se produjo un gran avance en la observación de los elementos que componían el sistema nervioso, hasta tal punto que Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) aseguró que “todos los tejidos neurales están formados por la neurona y la célula glial”. Sin embargo, la glía siempre era identificada por eliminación como las células que no eran neuronas hasta que Cajal introdujo una nueva tinción con sublimado de oro en 1913 que permitía teñir los astrocitos de forma más completa que nunca y también permitía reconocer más claramente

otras células nerviosas que se teñían más pobremente, pero que no habían podido ser identificadas hasta entonces. A éstas “otras células nerviosas”, Ramón y Cajal las llamó “el tercer elemento”.

Más adelante, en 1921, Pío del Río-Hortega (1882-1945) desarrolló la tinción de carbonato de plata amoniacal, que teñiría de forma específica ese “tercer elemento” al que Ramón y Cajal se refería. Gracias a esta nueva tinción dos nuevas poblaciones fueron descubiertas: la oligodendroglía y la microglía.

Así, vemos que ya a principios del siglo XX quedaron establecidas las poblaciones que componían la neuroglía. Encontramos, pues, dos grupos claramente diferenciados en función de su origen: En primer lugar está la macroglía, que en el sistema nervioso central (SNC) se compone de las células astrogliales y oligodendrocitos, formados en la placa neural de forma paralela a las neuronas (en el sistema nervioso periférico (SNP) las células de Schwann se encontrarían dentro de este grupo). Por otro lado encontramos la microglía, que está constituida por células de menor tamaño con origen mesodérmico.

Ya a finales del siglo XIX, Carl Ludwig Schleich propuso una teoría de la existencia de una interacción neurona-glía, en la cual él abogaba por un papel importante de la glía, y no como un mero elemento estructural. Sin embargo no fue hasta mediados de los 80 del siglo XX cuando se empezó a descubrir sus papeles fisiológicos en mayor profundidad.

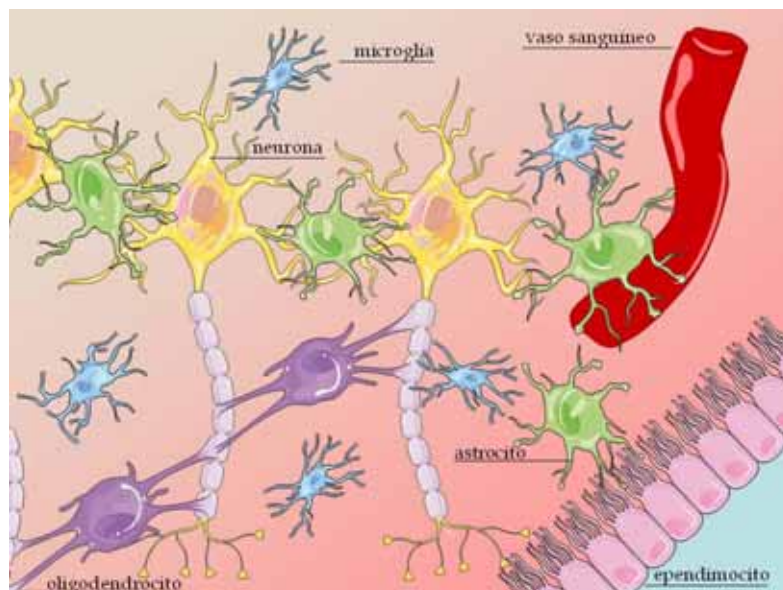


Figura 1. Principales tipos celulares del SNC (imagen modificada de http://www.servier.com/SMART/SlideKits/Neural_cells.asp).

1.1.1 OLIGODENDROCITOS

Identificados por primera vez en 1928 por Pío del Río Hortega mediante la técnica del carbonato de plata, los oligodendrocitos presentan un soma grande, esférico con ramificaciones cortas y finas. En sus ramificaciones son frecuentes los microtúbulos y al contrario que los astrocitos, no presenta gliofilamentos. Su morfología, sin embargo, cambia durante su desarrollo (Bannister et al, 1998).

MARCADORES

Existen varios marcadores específicos para la oligodendrogía. Por una parte se utiliza la detección de actividades enzimáticas como la CNPasa, la hidrolasa de colesterol, la anhidrasa carbónica y la 5' nucleotidasa. La proteína básica de mielina (MBP) y la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG) también son muy utilizadas para la identificación de los oligodendrocitos.

ORIGEN

Los oligodendrocitos, como las neuronas y los astrocitos, tienen un origen neuroectodérmico. Aunque en un principio se pensó que estas células procedían de la glía radiada, ahora se sabe que su origen se encuentra en regiones concretas del tubo neural, donde las células progenitoras se diferencian pasando por diversos estadios intermedios caracterizados por la expresión de distintos antígenos de membrana (Miller, 2002).

TIPOS

Como ocurre con los astrocitos, los oligodendrocitos presentan una elevada variabilidad morfológica según su localización y su función. Por ello encontramos clasificaciones que los dividen en dos, tres o incluso cuatro grupos en función de los criterios que se tienen en cuenta (Ramirez-Exposito et al, 1998; Butt, 2005; Bannister et al, 1998). Sin embargo, una clasificación clásica atendiendo

a su localización y características tintoriales los dividen en dos grandes grupos: oligodendrocitos satélite y oligodendrocitos interfasciculares.

Los **oligodendrocitos interfasciculares** son los de mayor tamaño medio (20 μm) con un núcleo de gran tamaño. Están asociados a la sustancia blanca y llevan a cabo los procesos de mielinización durante el desarrollo y el mantenimiento de las vainas en el adulto.

Los **oligodendrocitos satélite** son de menor tamaño (10 μm) y quedan restringidos a la sustancia gris. Se encuentran en íntimo contacto con el soma neuronal y, a pesar de que hay un gran número de trabajos que los diferencian por su morfología, su función aún hoy en día no se ha determinado de forma clara.

FUNCIONES

Ya en 1928 Pío del Río-Hortega propuso que los oligodendrocitos eran las células que generaban la mielina que envuelve los axones neuronales. Sin embargo, esto no se pudo demostrar hasta la aparición de la microscopía electrónica. Un único oligodendrocito puede presentar hasta sesenta ramificaciones, cada una de las cuales envuelven un axón, a diferencia de las células de Schwann, en el SNP, las cuales envuelven un único axón (Butt, 2005).

Aunque la producción de mielina es la función más conocida de los oligodendrocitos, también se han propuesto otras funciones adicionales. Por una parte, se les ha implicado en el control del ambiente del neuropilo, sobretodo en cuanto al transporte de agua y cloro, además de presentar canales de Na^+ (Ramírez-Expósito et al, 1998). Además se ha visto, tanto in vitro como in vivo, que los oligodendrocitos pueden producir toda una batería de factores tróficos, como el BDNF o el NT-3 entre otros. Por medio de dichos factores, los oligodendrocitos pueden afectar tanto al desarrollo como al mantenimiento de las neuronas y de otros oligodendrocitos (revisado por Du et al, 2002).

1.1.1. ASTROCITOS

Los astrocitos constituyen la población glial más abundante del SNC. A lo largo de la evolución la proporción de éstos frente a la de neuronas ha ido en

aumento de tal manera que en organismos menos evolucionados como la sanguijuela hay una proporción de un astrocito por cada 25 ó 26 neuronas, mientras que en el cerebro humano la proporción se ve incrementada a 1,4 astrocitos por cada neurona (Heneka et al, 2007), lo cual supone aproximadamente el 50% del volumen cerebral humano (Chen et al, 2003). Dicho cambio no hace sino reflejar el importante papel que éstas células han ido adquiriendo en el SNC a lo largo de la evolución. En efecto, los astrocitos presentan un amplio número de funciones que son determinantes para el desarrollo, funcionamiento y supervivencia de las neuronas, tales como el mantenimiento de la homeostasis iónica, el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BHE), la síntesis, captación y también liberación de glutamato. Así, se ha visto que las neuronas no pueden sobrevivir sin la interacción cercana con los astrocitos en el cerebro, de tal manera que allí donde hay muerte de astrocitos las neuronas no logran sobrevivir (Chen et al, 2003).

MARCADORES

Los astrocitos representan una población heterogénea, ya que en ella existen pocos genes que se expresen de forma ubicua, de tal manera que existen muchas diferencias entre los astrocitos de diferentes regiones (Volterra et al, 2005). Por ello, el estudio de los astrocitos mediante marcadores específicos ha sido de gran importancia. Existen diferentes marcadores que se pueden utilizar para tal fin. Uno de ellos es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), el marcador más utilizado para identificar a los astrocitos. Es una proteína específica de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos que les confiere el mantenimiento de su estructura tridimensional, a la vez que proporciona una considerable flexibilidad y curvatura. Otro marcador muy empleado es el S-100 β , perteneciente a una familia de proteínas de unión a calcio involucradas en diferentes funciones como la reorganización del citoesqueleto.

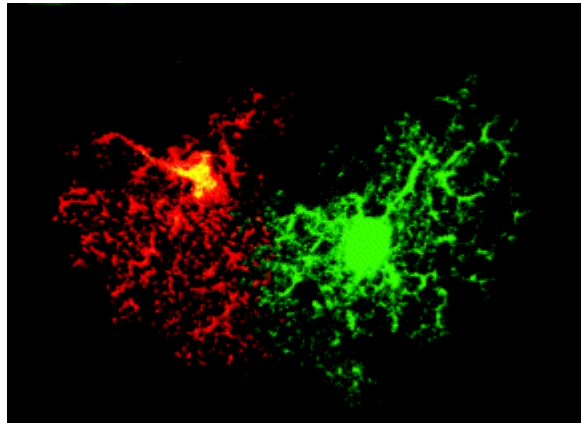


Fig. 2. Imagen de dos astrocitos de la región CA1 marcadas intracelularmente con los trazadores Lucifer Yellow (LY, verde) y biocytin-conjugated cascade blue (CB, rojo). Aquí se ve cómo sólo las prolongaciones más finas se solapan. (Ogata, 2002).

Tanto GFAP como S100 β son marcadores muy útiles y ampliamente utilizados para la identificación de astrocitos. Sin embargo, no todos los astrocitos, sobretodo de la sustancia gris, expresan suficiente GFAP para ser positivos con técnicas inmunohistoquímicas habituales (Walz, 2000). Además, el S100 β marca células que no son astrocitos (Rickmann et al, 1995). Por eso, para un estudio más exhaustivo de la distribución de los astrocitos se requiere utilizar la inyección intracelular de trazadores.

Los astrocitos presentan una distribución altamente organizada en la que definen un espacio tridimensional, un dominio anatómico propio en el que sus grandes prolongaciones se ramifican en otras más finas de tal manera que aproximadamente sólo un 5% total del volumen de los astrocitos se superponen (Bushong et al, 2002; Ogata et al, 2002).

ORIGEN

Los primeros astrocitos procedentes del neuroectodermo constituyen la glía radiada. Estas células conectan mediante prolongaciones la superficie ventricular y la pial sirviendo de guía para la migración de los neuroblastomas hasta su posición definitiva dentro de las paredes del tubo neural primitivo. La mayoría de la glía radial retrae sus prolongaciones y se diferencia en astrocitos maduros.

TIPOS

Aunque existe más de una clasificación, la más utilizada es la descrita por Andriezen y Doelliker ya a finales del siglo XIX, que distingue los astrocitos en dos grandes poblaciones de acuerdo a sus características morfológicas y distribución dentro del SNC. Estos dos grupos se han mantenido con el tiempo y se conocen como astrocitos protoplasmáticos y astrocitos fibrosos. Los **astrocitos protoplasmáticos**, presentes en la sustancia gris, se caracterizan por su morfología arborescente, con un gran número de prolongaciones con muchas ramificaciones. Por su parte, los **astrocitos fibrosos**, presentes en la sustancia blanca, tienen formas más estrelladas con prolongaciones largas y poco ramificadas (revisado en Reichenbach et al, 2005).

Sin embargo, como ya se ha comentado, los astrocitos presentan una elevada heterogeneidad en lo que respecta a determinados marcadores, por lo que esta clasificación podría ser, tal vez, mucho más compleja.

FUNCIONES

Los astrocitos forman un sincitio continuo con una intercomunicación rápida y coordinada debido a que se unen unos a otros mediante las uniones intercelulares llamadas uniones gap o *gap junctions*. Las uniones gap interconectan tanto las prolongaciones de un mismo astrocito como las prolongaciones de diferentes astrocitos, mediando el paso indiscriminado de moléculas menores de 1000 kDa, de tal forma que permiten minimizar las diferencias entre ellas. Los astrocitos también integran a otras células del SNC en ese “sincitio funcional” gracias a que forman uniones gap con oligodendrocitos y células ependimales, cubren los capilares sanguíneos con los llamados podocitos o pies perivasculares y envuelven las sinapsis que se encuentran en su “dominio” (Verkhratsky et al, 2006). Sin embargo, los astrocitos, lejos de ser meros elementos de soporte, presentan un gran abanico de funciones cruciales para el desarrollo y funcionamiento de las neuronas.

Neurogénesis y sinaptogénesis

Aunque la mayoría de los astrocitos maduran más tarde que las neuronas durante el desarrollo embrionario, un estudio reciente mostró cómo los astrocitos hipocampales pueden promover la neurogénesis en el cerebro adulto de ratas a partir de precursores neuronales mediante factores solubles y de membrana (Hongjun Song, 2002).

Además, se ha demostrado la existencia de precursores neuronales con características astrocíticas, como la expresión de GFAP y la presencia de uniones gap entre otros. Las células progenitoras neuronales (NSCs), células que pueden dar lugar a nuevas neuronas, se encuentran principalmente en dos zonas del cerebro adulto, la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado. Diferentes estudios han demostrado la capacidad de los astrocitos de dar lugar a dichas células progenitoras neuronales tanto *in vitro* (Itoh et al, 2006) como *in vivo* (revisado por Ihrle et al, 2007).

La formación de las sinapsis se produce durante del desarrollo postnatal una vez que los astrocitos se han diferenciado, y diversos estudios han demostrado que esto podría ser debido al hecho de que la sinaptogénesis requiere grandes cantidades de colesterol, que las neuronas obtendrían a partir de los astrocitos. Además, los astrocitos también juegan un papel importante en la maduración de terminales postsinápticas mediante la producción de factores como el TNF- α o el ADNF (revisado por Pfrieger, 2002).

Gliotransmisión

Inicialmente se creyó que los astrocitos no podían participar en la transmisión de información debido a que son células no excitables eléctricamente. Sin embargo, ahora son considerados células excitables, ya que cuando son activados, bien por señales internas o externas, pueden liberar mensajes a las células vecinas. A este proceso se le ha denominado "gliotransmisión". Así, los gliotransmisores, entre los que encontraríamos el glutamato, el ATP o la adenosina liberados por los astrocitos actúan sobre las neuronas, células gliales o vasos sanguíneos modulando su actividad (revisado por Volterra et al, 2005).

La excitación de los astrocitos no se produce mediante cambios en el potencial de membrana, sino por variaciones de la concentración de Ca^{2+}

intracelular. Así, se ha documentado la existencia de dos formas de excitación diferentes: excitación dependiente de neurona y excitación espontánea. Mientras que la **excitación dependiente de neurona** se genera por las señales químicas producidas en el circuito neuronal como el glutamato, la acetilcolina, el GABA, el ATP o el NO entre otras, la **excitación espontánea** viene determinada por oscilaciones de las concentraciones de Ca^{2+} que son generadas por la liberación, principalmente, desde reservorios intracelulares como el retículo endoplasmático. Dichas ondas de Ca^{2+} pueden propagarse de forma intracelular, pero también pueden propagarse de forma intercelular (revisado por Nedergaard et al, 2003; Volterra et al, 2005; Newman, 2003b).

Los astrocitos rodean gran parte de las sinapsis neuronales del SNC. Se han descrito gliotransmisores como el glutamato (Nedergaard et al, 2003; Haydon, 2001) y más recientemente el ATP y la adenosina (su compuesto derivado), que permitirían a los astrocitos ejercer un control sobre la actividad neuronal (Newman, 2003a).

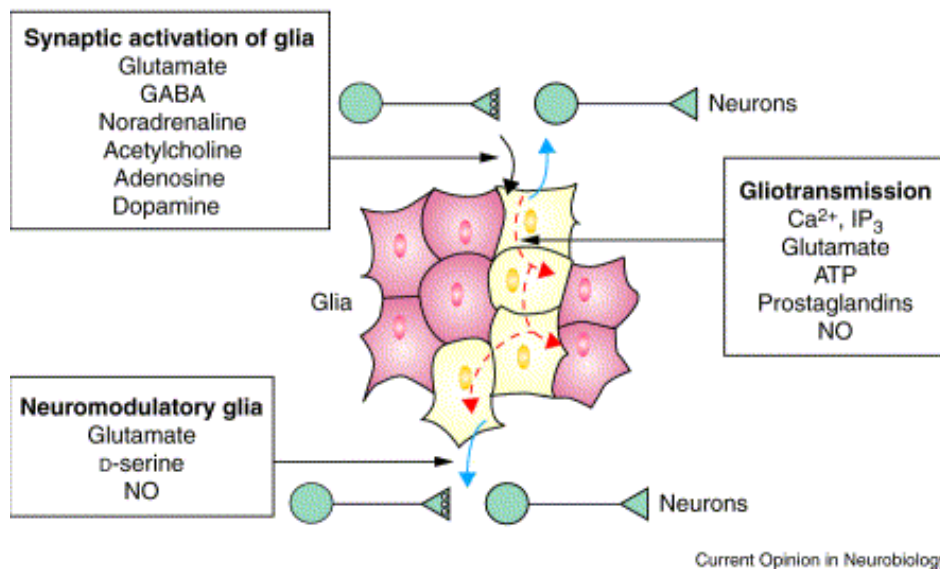


Fig. 3. Comunicación bidireccional neurona-glia. Los neurotransmisores liberados en el espacio sináptico pueden activar receptores en los astrocitos, produciendo el incremento de Ca^{2+} intracelular. Dicho incremento puede producir una respuesta neuromoduladora, bien localmente o también a distancia, mediante la liberación de “gliotransmisores” (Bezzi et al, 2001).

Captación y metabolismo del glutamato

A pesar de que el glutamato es un neurotransmisor crucial para la transmisión sináptica, una concentración elevada conlleva la denominada “muerte por excitotoxicidad” de las neuronas. Así pues, el mantenimiento de la concentración de dicho neurotransmisor por debajo de los niveles neurotóxicos es muy importante para la viabilidad neuronal. Los astrocitos son los encargados de captar el exceso de glutamato presente en el espacio sináptico mediante transportadores sodio-dependientes llamados GLAST y GLT-1 en humanos (Anderson et al, 2000). Tras su captación, los astrocitos lo convertirán en glutamina, la molécula precursora del glutamato, y lo secretarán al medio, de donde las neuronas pueden captarla para sintetizar de nuevo glutamato (Chen et al, 2003).

Mantenimiento de la homeóstasis iónica

Los astrocitos tienen mecanismos pasivos y activos para limitar los cambios de K^+ en el medio extracelular, cuya concentración es muy importante para mantener el potencial de membrana de las neuronas. Asimismo, existen también diferentes mecanismos para regular los niveles de H^+ , que pueden aumentar en situaciones isquémicas debido a la producción de ácido láctico durante la producción glicolítica de ATP y su utilización (revisado por Chen et al, 2003).

Control de flujo sanguíneo

Los astrocitos envuelven las células endoteliales de los vasos sanguíneos con los podocitos creando lo que se conoce como “unidad gliovascular”. Esta unión permite a los astrocitos regular el flujo sanguíneo en función de la actividad neuronal. Así, los mediadores químicos procedentes de las neuronas producirían en los astrocitos la salida del Ca^{2+} del retículo endoplasmático hacia el citosol. A partir de ahí la ola de Ca^{2+} se propaga hasta el podocito del astrocito, donde activa la fosfolipasa A2, la cual genera ácido araquidónico. Este ácido graso puede ser procesado bien por la enzima COX, para finalmente producir derivados de prostaglandinas vasodilatadoras, o bien por el citocromo p450, para convertirlo en

ácido 20-hidroxicosatotetraenoico (20-HETE), compuesto vasoconstrictor (Verkhatsky et al, 2006; Volterra et al, 2005).

Metabolismo energético

Los astrocitos juegan un papel central en el metabolismo energético del SNC, debido a que, aunque parece que también la neurona podría captarla directamente, son los principales encargados de captar de los vasos sanguíneos la mayoría de la glucosa que las neuronas utilizan. Una vez dentro de los astrocitos, la glucosa puede pasar directamente a las neuronas, ser metabolizada hasta formar lactato o ser almacenada en forma de glucógeno. Los astrocitos son el único almacén que hay en el SNC de glucógeno, el cual se metaboliza en determinadas condiciones de hipoglucemia. La glucosa es metabolizada a lactato, los astrocitos lo liberan al medio extracelular, desde donde entrará a las neuronas, de tal manera que pasa a ser incorporado ya al ciclo de Krebs (Nedergaard et al, 2003; Tsacopoulos et al, 1996).

Como en el caso del flujo sanguíneo, la captación de glucosa está acoplada a la actividad neuronal. Así, el glutamato liberado por las neuronas es captado por los astrocitos. Simultáneamente a la entrada del glutamato se produce una entrada Na^+ , cuya extracción conlleva un aumento de la demanda de ATP en los astrocitos. La depleción de ATP estimulará finalmente la captación de glucosa (ver figura 4) (Magistretti, 2006).

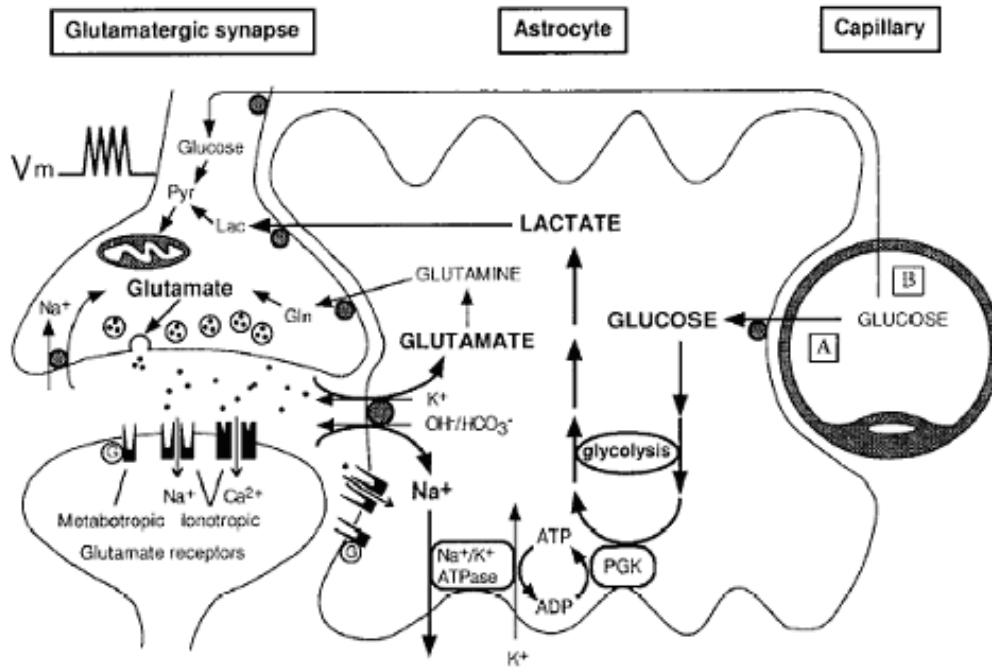


Fig. 4. Representación esquemática del mecanismo de la glicólisis en astrocitos inducida por glutamato durante la activación fisiológica. El glutamato liberado en el espacio sináptico despolariza la neurona postsináptica actuando sobre los receptores glutamatérgicos. La acción del glutamato finaliza de forma eficiente por el sistema de recaptación localizado mayoritariamente en los astrocitos. El glutamato es cotransportado con Na^+ . La concentración de Na^+ aumenta, causando la activación del cotransportador Na^+/K^+ ATPasa. Dicha activación estimula la captación y utilización de glucosa (Tsacopoulos et al, 1996).

Mantenimiento de la BHE

Los astrocitos presentan diferentes fenotipos dependiendo de su localización y asociación con otros tipos celulares. Se ha visto que la gran mayoría de dichos fenotipos están relacionados con la interacción específica con vasos sanguíneos. Así, los astrocitos cubren gran parte de la superficie capilar y contribuyen a la formación y el funcionamiento de la misma. Se ha visto por ejemplo que contribuyen a la formación de uniones estrechas o *tight junctions* en las células endoteliales mediante la secreción de TGF- α y GDNF, así como a la expresión y polarización de transportadores y sistemas enzimáticos especializados de la BHE (revisado por Abbott et al, 2006). Además, los astrocitos secretan por los podocitos proteoglicano heparán sulfato, laminina y fibronectina, contribuyendo así a la formación de la lámina basal de los vasos sanguíneos con los que limitan (Bannister et al, 1998; Bannister et al, 1998).

Eliminación de especies reactivas de oxígeno

Los astrocitos presentan una elevada cantidad de glutatión y enzimas de su metabolismo, así como de ascorbato, los cuales ayudan a eliminar ROS, que son altamente neurotóxicas (revisado por Chen et al, 2003).

1.1.2. MICROGLÍA

La microglía, descrita por Pío del Río Hortega como el “verdadero tercer elemento”, constituye entre el 5% y el 20% de la población glial total en el SNC. Fue este mismo investigador quien realizó el primer estudio sistemático de esta población celular, describiendo los cambios morfológicos que se producen durante la activación glial, e intuyendo los factores que la desencadenaban.

La microglía constituye el sistema inmunitario del SNC (Kreutzberg, 1996) y como tal, sus principales funciones van dirigidas a detectar y eliminar cualquier posible patógeno, así como los restos celulares presentes en el parénquima. Al igual que los astrocitos, la microglía se distribuye de forma territorial, aunque sus prolongaciones no se adhieren unas a otras (Raivich et al, 2004a).

Cuando la microglía se activa sufre un proceso con una serie de cambios morfológicos y funcionales progresivos, en el que podemos diferenciar tres estados. En primer lugar encontramos la llamada *microglía quiescente* o en reposo, que constituye el estado basal en el SNC adulto normal y que presenta gran número ramificaciones finas y alargadas. En segundo lugar está *la microglía activada*, que presenta unas ramificaciones acortadas y engrosadas, y que es la principal responsable de la síntesis de proteínas proinflamatorias que median gran parte de sus funciones en condiciones patológicas. Por último, tenemos la llamada *microglía ameboide*, la cual, como su propio nombre indica, presenta una morfología más globular. Esta última es la encargada de fagocitar patógenos, restos celulares, depósitos proteicos, etc (Streit, 2002).

MARCADORES

El primer marcaje selectivo utilizado para identificar las células microgliales fue el del carbonato de plata amoniacal desarrollado por Pío del Río

Hortega. Éste, sin embargo, es un marcaje poco reproducible y muy variable entre especies.

Existen gran cantidad de marcadores para identificar a las células microgliales diferenciándolas del resto de poblaciones gliales. Sin embargo, nos encontramos con más problemas cuando queremos diferenciar a la microglía fagocítica de los macrófagos que se infiltran en el SNC en situaciones patológicas, debido a que muchos marcadores son proteínas de membrana compartidas por estas dos poblaciones celulares.

La microglía presenta un gran número de antígenos de superficie, de forma que el marcaje de muchos de éstos permite identificarla. Así, podemos identificar la microglía mediante el marcaje de CD11b (Mac-1 en ratón y CR3 en rata) o F4/80 (en ratón). Una de las formas más usadas hasta el momento para la identificación de la microglía es mediante la utilización de las lectinas. Estas moléculas se unen a los azúcares terminales de las cadenas laterales de los oligosacáridos de las glicoproteínas del SNC que se encuentran integradas en la membrana plasmática. Una lectina muy utilizada es la del tomate (Acarin et al, 1994), que reconoce específicamente la galactosa. Sin embargo, a pesar de que ésta es una de las formas más fáciles y rápidas, no marca exclusivamente las células microgliales, sino que también marca los macrófagos y las células endoteliales. Otros marcadores de membrana como el CD45 o el MHC se expresan a bajos niveles en la microglía quiescente, pero su expresión aumenta en la microglía activada. Así, la intensidad del CD45 permite diferenciar la microglía quiescente de la microglía activada e incluso de los macrófagos infiltrados (con una mayor intensidad de marcaje) (Carson et al, 2007).

Actualmente se está extendiendo la utilización del marcaje de IBA-1, *ionized calcium-binding adapter molecule*, una proteína de membrana cuya expresión sólo se ha identificado en células microgliales, células dendríticas y osteoclastos. De esta forma, el marcaje de esta proteína nos permite diferenciar a la microglía de los macrófagos infiltrados (Ladeby et al, 2005) .

ORIGEN

A diferencia de las otras poblaciones gliales, la microglía no presenta un origen ectodérmico, sino mesodérmico. Sin embargo, aún hoy en día hay

diferentes hipótesis sobre su exacta procedencia. Hasta ahora, se han descrito cuatro tipos celulares con la habilidad de transformarse en células microgliales: macrófagos fetales, monocitos, células progenitoras hematopoyéticas y progenitores mesodérmicos presentes en tejidos embrionarios (Ladeby et al, 2005)

Hay tres vías de entrada de los precursores microgliales, dependiendo de la región cerebral y del estado de desarrollo. Inicialmente, los progenitores microgliales colonizan el SNC por rutas extravasculares. Así, durante el desarrollo embrionario, antes incluso de la existencia de vascularización, se produciría ya la entrada de precursores microgliales a partir de tejidos mesodérmicos. Dichos precursores se agrupan formando las llamadas “fuentes de microglía”, grupos celulares localizados en zonas anatómicas muy concretas formados por células ameboides que migran al resto del parénquima cerebral y se diferencian transformándose de forma gradual en microglía ramificada conforme el SNC se desarrolla. Además, los macrófagos fetales, presentes ya en el día 8 del desarrollo embrionario en roedores, cuando la neurulación se ha completado, también formarían células microgliales. Dichos macrófagos son diferentes de los existentes en el adulto y parece que derivan de progenitores diferentes (Streit, 2005). Se ha propuesto que éstos provienen de órganos independientes de la línea monocítica a partir de progenitores anteriores a la vascularización.

En fases más tardías, principalmente en estadios perinatales y postnatales se produce la entrada de otros progenitores microgliales a partir del torrente sanguíneo, a través de la no totalmente desarrollada BHE. Dicha entrada contribuye de una forma importante a la colonización del tejido cerebral (Ling et al, 1993; Ling, 1979).

En el adulto y el neonato, debido a que la microglía del parénquima tiene un ciclo de renovación bajo en condiciones fisiológicas, ésta es capaz de autorrenovarse por sí sola, y parece que sólo una pequeña proporción se repoblaría a partir de lo que algunos autores denominan microglía perivascular y otros macrófagos perivascuales, los cuales parece que podrían, ocasionalmente, penetrar en el parénquima y diferenciarse a microglía. (Streit, 2005; Chan et al, 2007a). Dicha población perivascular se renueva continuamente por progenitores derivados de la médula ósea que se infiltran desde el torrente sanguíneo.

En condiciones patológicas, la densidad de la población microglial aumenta en el lugar en el que tiene lugar el daño. Cuando la BHE se rompe,

dicho aumento es debido a la proliferación de la microglía residente y también a la infiltración de macrófagos del torrente sanguíneo (revisado por Chan et al, 2007b; Ladeby et al, 2005). Sin embargo, un estudio reciente, muestra que la contribución de macrófagos sanguíneos a la población microglial es despreciable cuando la BHE está intacta (Ajami et al, 2007).

TIPOS

La microglía presenta una distribución ubicua dentro del SNC, con diferencias regionales de tal manera que tiene una presencia destacada en zonas como el hipocampo, el telencéfalo olfatorio y en regiones de los ganglios basales y de la sustancia negra (Lawson et al, 1990).

Existen patrones microgliales de expresión muy diferentes debido en gran parte a la composición del microambiente en el que se encuentra. Así, encontramos que las células MHC-II y CD4 positivas se localizan en su mayoría en la sustancia blanca del SNC. Morfológicamente, las mayores diferencias las encontramos entre las células de la sustancia blanca y la gris de tal manera que mientras que **la microglía de la sustancia blanca** presenta ramificaciones paralelas y perpendiculares a las fibras nerviosas, **la microglía de la sustancia gris** presenta una mayor ramificación en todas las direcciones. Los patrones de expresión proteica pueden ser, además, muy diferentes en función tanto del modelo como de la zona del SNC estudiados no sólo en condiciones basales, sino también en condiciones de activación (revisado por Carson et al, 2007).

FUNCIONES

A diferencia de los astrocitos, las funciones de la microglía en condiciones fisiológicas son mucho más desconocidas. Sin embargo, día a día se postulan nuevas funciones que la microglía ejerce cuando se encuentra activada. La microglía activada no solamente se encarga de eliminar restos celulares, patógenos o depósitos proteicos del medio extracelular, sino que también participa de una forma activa en procesos tan importantes como la neurogénesis o la remodelación y maduración de la sinapsis (Walton et al, 2006; Battista et al,

2006; Ziv et al, 2006). De esta forma, la microglía no sólo es capaz de captar la actividad neuronal, sino que también es capaz de influir en la supervivencia y en la misma función neuronal. Todo esto apoya la existencia de una activa relación neurona-microglía (Streit, 2002; van Rossum et al, 2004; Hanisch, 2002; Streit et al, 2005).

“Rastrear” el medio extracelular

Como ya se ha comentado antes, en condiciones fisiológicas la microglía presenta un estado quiescente o de reposo. En dichas condiciones, y a pesar de no presentar una función clara como las que realiza en los diferentes estados de activación, se ha visto que la función principal de la microglía es monitorizar y proteger el bienestar de las neuronas rastreando el medio con el fin de detectar cualquier posible cambio.

La microglía presenta una distribución tridimensional homogénea altamente organizada, a pesar de su elevada motilidad. Así, y aunque el soma presenta una posición más o menos fija, las prolongaciones se mueven continuamente por el medio extracelular de tal manera que en unas pocas horas el cerebro es completamente rastreado (Nimmerjahn et al, 2005).

La microglía establece contactos dinámicos con otras células del SNC como neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos (Nimmerjahn et al, 2005). Además, presenta numerosos receptores que le permiten detectar cualquier cambio sutil que se produzca, como receptores de neurotransmisores, tanto purinérgicos, como gabaérgicos, dopaminérgicos y noradrenérgicos (revisado por Pocock et al, 2007), receptores de inmunoglobulinas y receptores del complemento entre otros. Todo estos recursos servirían para captar múltiples señales con el fin de mantener o aumentar sus niveles de actividad (Bezzi et al, 2001).

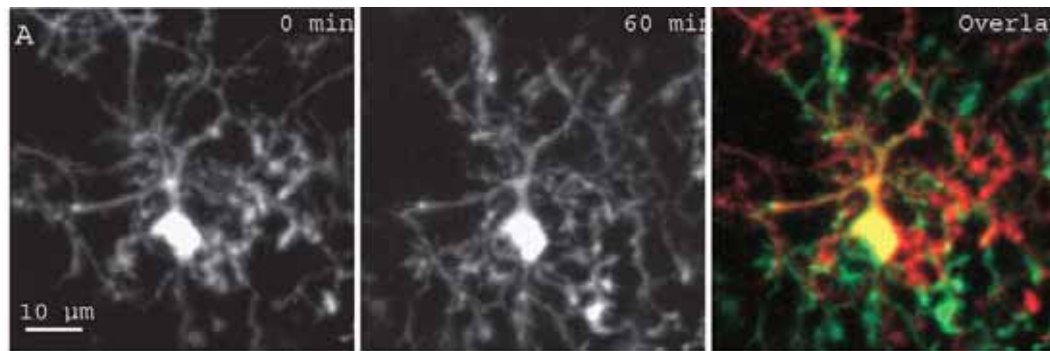


Figura 5. Las células microgliales son altamente dinámicas en estado de reposo in vivo. En la figura se ven las ramificaciones de una célula microglial al principio (izquierda) y tras 1 hora (derecha) y la superposición que muestra la formación y desaparición de las mismas (Nimmerjahn et al, 2005).

1.1.3. CÉLULAS NG2+

En el cerebro en desarrollo se pueden ver unas células caracterizadas por la expresión de proteoglicano NG2 y el receptor PDF α R (Levine et al, 1987). Estas células son las denominadas NG2+ u OPCs (oligodendrocyte progenitor cells) debido a que son las que finalmente darán lugar a los oligodendrocitos adultos (Dawson et al, 2000). Sin embargo, se ha visto que en el cerebro adulto no todas las células NG2+ generan oligodendrocitos, y por ello algunos autores diferencian dos poblaciones diferentes de células NG2+. La primera sería la que generan los oligodendrocitos mientras que la segunda está constituida por las células NG2+ no mielinizadoras en el cerebro adulto. Esta última población de NG2+, de hecho, empieza a considerarse hoy día como una tercera clase de macroglía, junto con la astrogliía y la oligodendroglía, debido a que presentan características diferenciadoras. Como los astrocitos, las células NG2+ presentan una forma estrellada, pero no expresan GFAP ni transportadores de glutamato y tampoco forman uniones gap. También se diferencian de los oligodendrocitos maduros debido a que no expresan MBP ni forman vainas de mielina (revisado por Butt, 2005).

Las células NG2+ se encuentran ampliamente distribuidas tanto en la sustancia gris como en la blanca, donde se encuentran muchas veces están asociadas a los nódulos de Ranvier (Martin et al, 2001). Además, estas células expresan receptores de neurotransmisores, tales como AMPA, NMDA, P2Y1 y P2X7. Todo esto da lugar a que, como ocurre con los astrocitos y con la microglía, a estas células les afecta la función neuronal. Más aún, se ha visto que las células

NG2+ no sólo responden a los neurotransmisores liberados en las sinapsis, sino que además reciben *inputs* presinápticos directos de las neuronas estableciendo lo que se ha denominado sinapsis neurona-glia (Wigley et al, 2007).

1.1.4. OTRAS CÉLULAS INMUNITARIAS DEL SNC

Debido principalmente a la falta de un verdadero sistema linfático y a la presencia de la BHE, el SNC ha sido considerado durante mucho tiempo como un órgano sin sistema inmunitario. Sin embargo, hoy se sabe que existen diferentes poblaciones que ejercen funciones inmunitarias y que podrían ser importantes en gran número de procesos inflamatorios. Dichas poblaciones engloban no sólo los astrocitos y la microglía a las que ya nos hemos referido, sino también otras, como los pericitos, los macrófagos perivascuales o las células dendríticas.

La falta de marcadores específicos hace que dichas poblaciones todavía no se puedan identificar de una forma clara e inequívoca, por lo que en la bibliografía podemos encontrar diferentes acepciones para todas ellas. Así, podemos encontrar que los macrófagos perivascuales para unos son pericitos perivascuales y para otros microglía perivascular, o que los pericitos no son otra cosa que microglía, o que las células dendríticas son microglía.

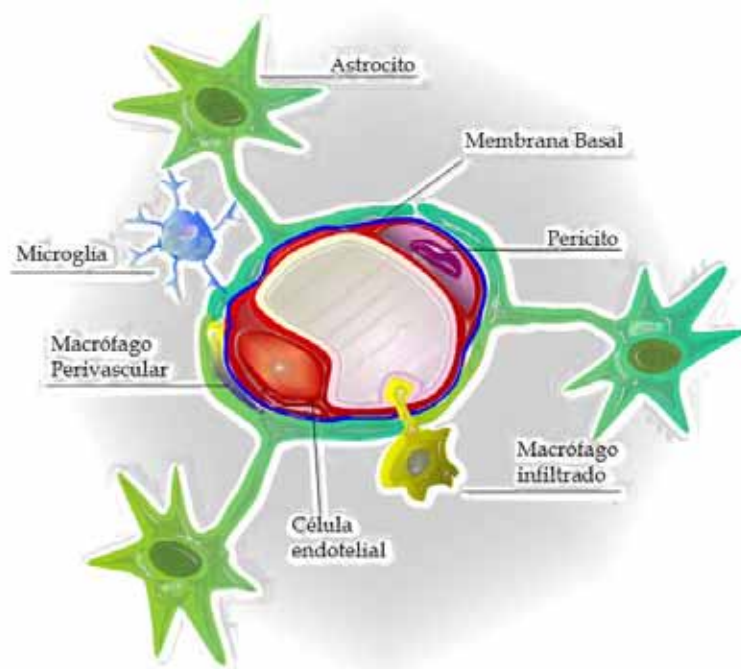


Figura 6. Células inmunitarias presentes en el cerebro

PERICITOS

Los pericitos se encuentran confinados a la lámina basal, donde migran en los últimos estadios de vascularización durante el desarrollo embrionario (Guillemin et al, 2004; Thomas, 1999). Estas células, de origen mesodérmico, presentan un cuerpo celular oval y pequeño con ramificaciones que se extienden rodeando la pared vascular. Su identificación se consigue principalmente por su localización y morfología, debido a que no se ha encontrado un único marcador que los identifique. Sin embargo, se ha visto que contienen todos los marcadores de macrófagos investigados hasta el momento (Thomas, 1999).

A estas células se les han atribuido diversas funciones entre las que se encuentran las funciones propias de los macrófagos (revisado por Thomas, 1999). Así, los pericitos son capaces de activarse de forma que cuando se produce daño en el tejido, en estados patológicos o tras la administración de citoquinas pueden fagocitar y presentar antígenos, así como producir diversas citoquinas como IL-1 β o IL-6 (revisado en Balabanov et al, 1999).

Además, diversos trabajos sugieren que los pericitos son capaces de introducirse en el parénquima y transformarse en células microgliales (revisado en Thomas, 1999; Balabanov et al, 1999).

MACRÓFAGOS PERIVASCULARES

Los macrófagos perivascuales, también llamados células perivascuales o microglía perivascular, están presentes en el espacio de Virchow-Robin o el espacio perivascular, por fuera de la membrana basal. Estas células derivan de la médula ósea y presentan una tasa de renovación mayor que la microglía o los pericitos, de tal manera que son reemplazados continuamente por los monocitos del torrente sanguíneo (Hickey et al, 1988; Bechmann et al, 2001).

Como los pericitos, los macrófagos perivascuales constituyen la primera barrera defensiva en el SNC, con importantes funciones inmunes. En primer lugar, son ellos, junto con los pericitos, los encargados del drenaje de los fluidos de SNC que, de hecho, se realiza en el espacio perivascular ((Zhang et al, 1992). Además, estas células actúan como sensores ante el daño y la muerte neuronal y son capaces de fagocitar antígenos del SNC y presentarlos en el espacio

perivascular gracias a que expresan de forma constitutiva niveles elevados de MHC II y de moléculas coestimuladoras (revisado por Williams et al, 2001).

CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas son una población heterogénea especializada en la captación, procesamiento y presentación de los antígenos a los linfocitos T. Dichas células proceden de precursores de la médula ósea y permanecen en los tejidos periféricos a modo de centinelas, en un estado inmaduro caracterizado por una alta capacidad captadora de antígeno, pero una expresión baja de MHCII y de diferentes moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40) que, sin embargo, aumenta el camino a los nódulos linfáticos.

La presencia de células dendríticas en el SNC fue descrita por primera vez por Mayszak (Matyszak et al, 1996). Mientras que en condiciones fisiológicas su presencia parece limitada a las meninges y el plexo coroideo, su número aumenta de forma drástica durante procesos infecciosos o de enfermedad autoinmune, y su localización anatómica se extiende al parénquima, debido probablemente al aumento de diferentes citoquinas involucradas en la activación de la célula dendrítica (Matyszak et al, 1996).

El ejemplo más claro de cómo las células dendríticas pueden estar implicadas en procesos inflamatorios del SNC lo encontramos en la esclerosis múltiple, ya que estas células se han relacionado directamente tanto con el inicio como con el transcurso de la enfermedad (revisado por McMahon et al, 2006).

El origen de las células dendríticas del SNC no está claro aún hoy en día, de manera que mientras unos estudios apoyan la hipótesis de que provienen de células precursoras periféricas de la sangre, otros demuestran cómo la microglía en cultivo puede desarrollar características y marcadores propios de las células dendríticas. Además, se ha postulado que la microglía puede desarrollar propiedades de células dendríticas durante la inflamación, de tal manera que adquiere la capacidad presentadora de antígenos. Sin embargo, no hay que olvidarse de que tanto macrófagos, como microglía y células dendríticas presentan precursores mieloides comunes, por lo que muchas veces los marcadores utilizados no permiten discernir de una forma definitiva a un tipo celular del otro (revisado por McMahon et al, 2006).

1.2. ACTIVACIÓN GLIAL

El término “activación glial” se utiliza para denominar la respuesta de los astrocitos y la microglía ante la presencia de una gran cantidad de estímulos tales como patógenos, restos celulares u otros elementos “extraños” tales como precipitados proteicos anómalos en el medio extracelular. Dicha respuesta es heterogénea pero presenta procesos básicos como el cambio morfológico, la proliferación y la fagocitosis, así como la producción de una gran cantidad de mediadores pro- y antiinflamatorios.

En condiciones fisiológicas, la microglía se encuentra en lo que hemos denominado un estado de reposo o quiescencia. Sin embargo, esta descripción no debe llevarnos a confusión, ya que, como hemos explicado, se encuentra continuamente rastreando el medio extracelular en busca de señales que le indiquen el estado general del entorno en el que se encuentra. En dichas condiciones la microglía presenta, a diferencia del resto de macrófagos (incluyendo los macrófagos perivascuales), una baja expresión de CD45 y del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II), de moléculas coestimuladoras, así como una baja capacidad endocítica y fagocítica. Esto es debido a que la microglía se encuentra “inhibida” o “calmada” por una gran cantidad de señales que recibe de las neuronas y también de los astrocitos. Así, la activación glial no sólo se puede desencadenar tras la aparición de señales activadoras, sino también por la desaparición de las señales inhibitorias. Todas estas señales tienen como característica común que indican la existencia de elementos peligrosos para la integridad funcional y estructural del SNC.

Las señales activadoras corresponden a factores que no están normalmente presentes en el medio, como componentes microbianos o componentes intracelulares. Las neuronas también pueden secretar activamente proteínas que producen la activación de la glía, como las quimioquinas CCL21 y CXCL10 o diferentes neurotransmisores, como el glutamato (revisado por Biber et al, 2007). Dentro de este grupo también se encuentran aquellas moléculas que sólo están presentes en condiciones muy específicas, como complejos inmunoglobulina-antígeno o partículas opsonizadas, así como aquellas que están presentes de forma anormal, como los precipitados proteicos. Todas estas señales son

detectadas por una gran variedad de receptores presentes tanto en la microglía como los astrocitos.

Las señales inhibitoras son aquellas cuya disrupción puede desencadenar la activación. Estas señales engloban los contactos intercelulares neurona-glía, como las parejas CD200-CD200R, CX3CL1-CX3CR1, SIRP α -CD47 (revisado por Hanisch et al, 2007) y CD22-CD45 (Mott et al, 2004), y factores solubles liberados al medio por las neuronas que reflejan su estado de actividad, como los neurotransmisores o los neuropéptidos. Dentro de este grupo también podemos incluir otros factores como las citoquinas antiinflamatorias interleuquina-10 (IL-10), TGF- β o IL-1ra y diversos glucocorticoides, que son producidos y liberados constitutivamente por las propias células gliales (John et al, 2003).

Tanto los astrocitos como la microglía sufren cambios morfológicos durante la activación glial, aunque la microglía sufre cambios mucho más drásticos que, sin embargo, ocurren de una forma progresiva, lo que hace que se puedan diferenciar las tres fases ya descritas antes: *microglía quiescente*, *microglía activada*, que presenta las prolongaciones hipertrofiadas, y *la microglía ameboide*. Algunos autores añaden una cuarta fase intermedia, la *microglía hiperramificada*, que se encuentra entre las fases de microglía quiescente y la activada, y cuya presencia se ve incrementada con la edad (Streit et al, 1999). Sin embargo, los cambios que la microglía sufre se ven cada día más como un proceso variable y adaptativo, más que un proceso estereotipado y gradual, de tal forma que la microglía mostraría un fenotipo variable según el entorno en el que se encuentre (van Rossum et al, 2004; Schwartz et al, 2006).

Como hemos dicho, la activación glial se caracteriza, además, por el aumento de una amplia batería de proteínas entre las que se incluyen factores neurotróficos que aumentan la supervivencia de las neuronas, y mediadores pro y antiinflamatorios tales como citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas, NO y ROS. Por su parte, los astrocitos sintetizan GFAP, S100 β , MAO-B, factores tróficos como NGF, CNTF, BDNF, VEGF, ILF1 y LIF quimioquinas como IL-8, y factores como el GM-CSF y M-CSF que promueven la proliferación de las células microgliales y su diferenciación (revisado por Farina et al, 2007). La microglía también sintetiza factores tróficos, como el NGF o el NT-3 (Elkabes et al, 1996), así como un gran número de proteínas de membrana, como el receptor del

complemento 3 (CR3), el MHC II y moléculas coestimuladoras, citoquinas, quimioquinas y enzimas como NOS-II y COX2.

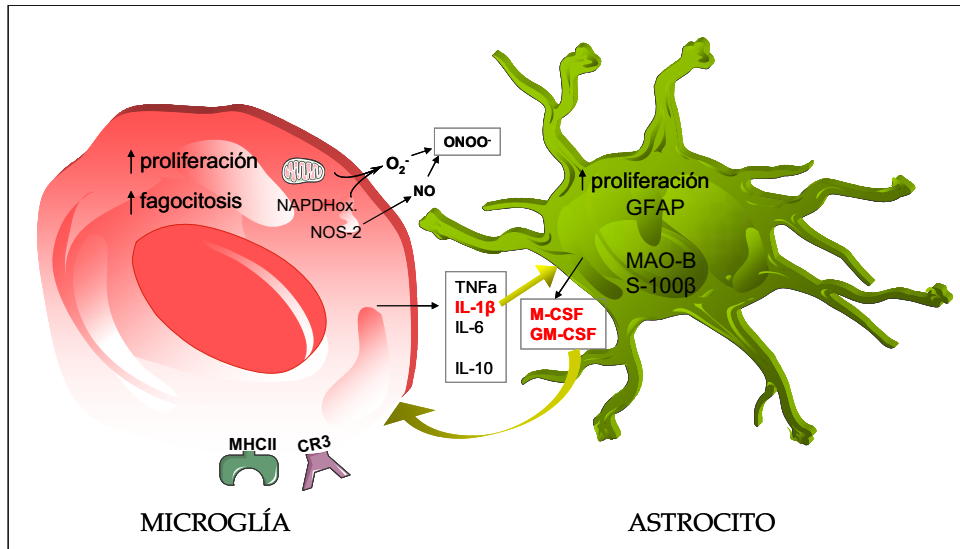


Figura 7. Algunas de las proteínas producidas por los astrocitos y la microglía durante la activación glial

No podemos olvidar que la activación glial es un proceso que se desencadena precisamente cuando tiene lugar la presencia de algún estímulo potencialmente peligroso y que, por lo tanto, tiene como objetivos principales acabar con dicha amenaza y promover la supervivencia neuronal. Además, la activación glial es, por lo general, un proceso que persiste por un período de tiempo muy limitado debido a que está altamente controlado, gracias a la existencia de un gran número de elementos reguladores. Entre estos elementos encontramos las citoquinas antiinflamatorias, secretadas tanto por astrocitos como por microglía, o por los linfocitos Th2 infiltrados en determinadas ocasiones, quimioquinas antiinflamatorias, como la fractalkina o CX3CL1 producida por los astrocitos y por las neuronas, y por supuesto, la desaparición del estímulo que ha desencadenado en primera instancia la activación. Sin embargo, la presencia prolongada o muy exagerada de la activación glial puede dejar de ser beneficiosa para pasar a exacerbar la muerte neuronal. Esto se debe al hecho de que astrocitos y microglía, principalmente ésta última, pueden liberar gran cantidad de compuestos neurotóxicos como el NO, las ROS o el TNF- α , así como otros mediadores que inducen reacciones secundarias por parte de células que se hayan infiltrado.

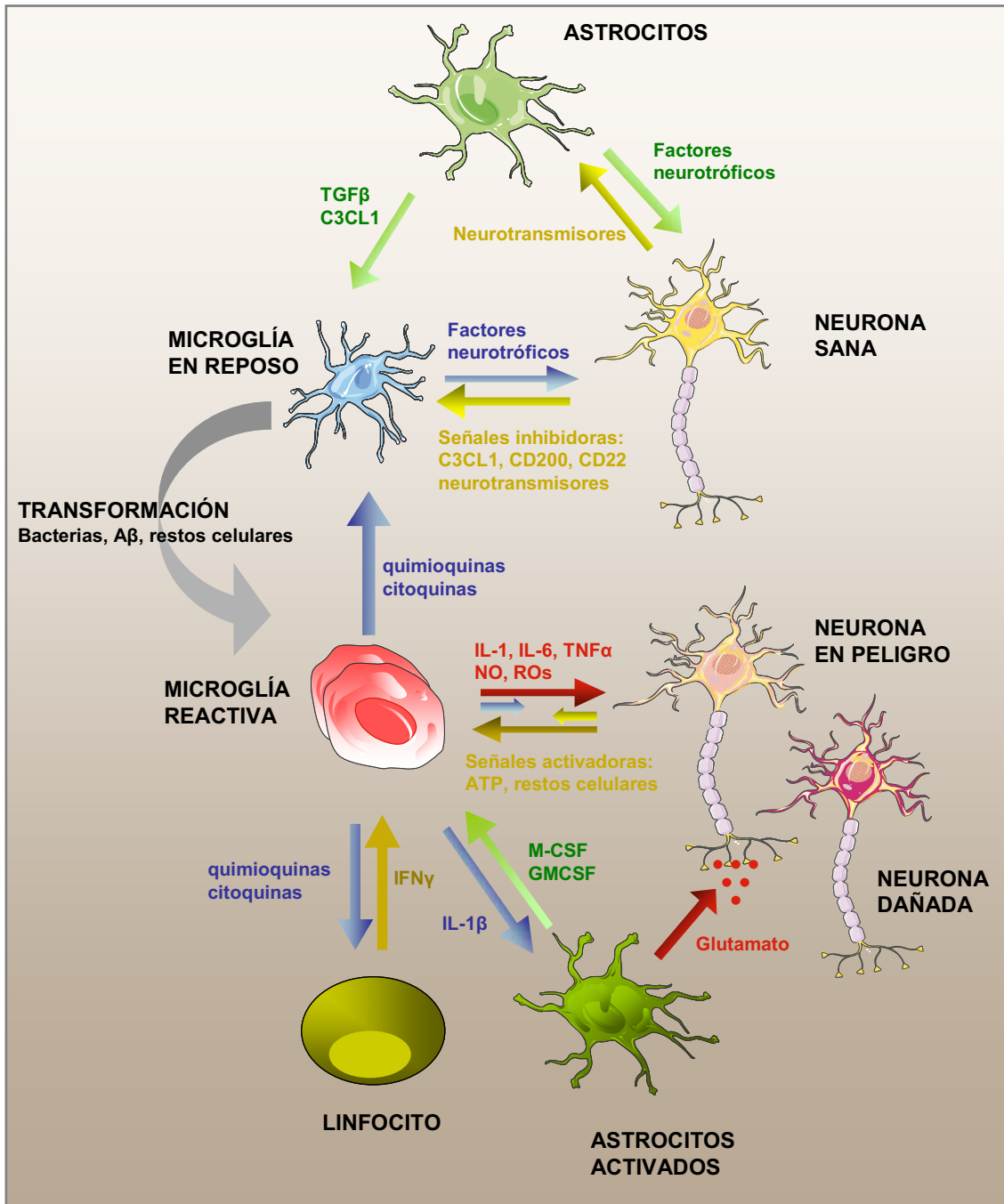


Figura 8. Esquema que ilustra los mediadores que están implicados en la activación glial, y sus posibles consecuencias neurotóxicas

Así, muchas lesiones agudas como la axotomía, trauma físico o infarto cerebral se caracterizan por una rápida microgliosis o *activación glial aguda*, que suele tener una corta duración, de manera que los daños que se producen suelen ser menores, a pesar de que en ocasiones ciertos factores, como las elevadas concentraciones de ciertas citoquinas, el tipo particular de factor activador o la posible disrupción de la BHE, pueden conllevar un agravamiento de las lesiones. Por el contrario, nos encontramos con otras situaciones en las que existe una

marcada y continua activación glial, una *activación glial crónica*. Tal es el caso de enfermedades como el Alzheimer o la esclerosis múltiple, en las que se piensa, y hay cada día más estudios que así lo prueban, que la activación glial produce tal cantidad de productos neurotóxicos que finalmente llega a exacerbar la muerte tanto de neuronas como de oligodendrocitos.

1.2.1. PROLIFERACIÓN

Ante la aparición de estímulos proinflamatorios se produce un rápido incremento en la tasa de proliferación tanto de la microglía como de los astrocitos. Los principales estímulos de la proliferación de la microglía incluyen las citoquinas M-CSF, GM-CSF, producidos principalmente por los astrocitos, y la IL-1 β e IL-6, producidas por la propia microglía. Por otro lado, la proliferación de los astrocitos la promueven tanto la IL-1 β como las quimioquinas CXCL10 y CCL5 (Bajetto et al, 2002; Hanisch, 2002).

1.2.2. FAGOCITOSIS Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO

La fagocitosis es una de las funciones más importantes realizadas por la microglía, ya que este proceso es el que permite eliminar patógenos, proteínas y restos celulares del medio extracelular. Como hemos comentado, la activación glial presenta cierta heterogeneidad en función de la intensidad del estímulo, de los factores desencadenantes, así como de la región en la que se produzca, de forma que, mientras la presencia de un patógeno externo desencadena la fagocitosis acompañada de mediadores proinflamatorios, la presencia de células apoptóticas promueve una mayor activación de la fagocitosis y liberación de citoquinas antiinflamatorias (revisado por Hanisch et al, 2007).

FAGOCITOSIS DE PATÓGENOS Y MOLÉCULAS EXTRAÑAS

La fagocitosis es uno de los primeros eventos que se producen durante la activación de la respuesta inmune, y es necesaria para retirar los patógenos, los restos celulares y las células senescentes que mueren. Así, ante la presencia de un cuerpo extraño en el medio extracelular, lo primero que se produce es el reconocimiento por medio de los "pattern-recognition receptors" (PRRs). Los

PRRs son aquellos receptores que reconocen patrones conservados en los patógenos y que no se encuentran en los eucariotas. Sin embargo, se hipotetiza que estos receptores no sólo tienen un papel importante en enfermedades infecciosas, sino que también se encuentran involucrados en una gran cantidad de enfermedades neurodegenerativas que cursan sin la presencia de ningún patógeno como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o en la isquemia, lo cual indica que su papel no sólo pasa por el reconocimiento de organismos patógenos (revisado por Farina et al, 2007).

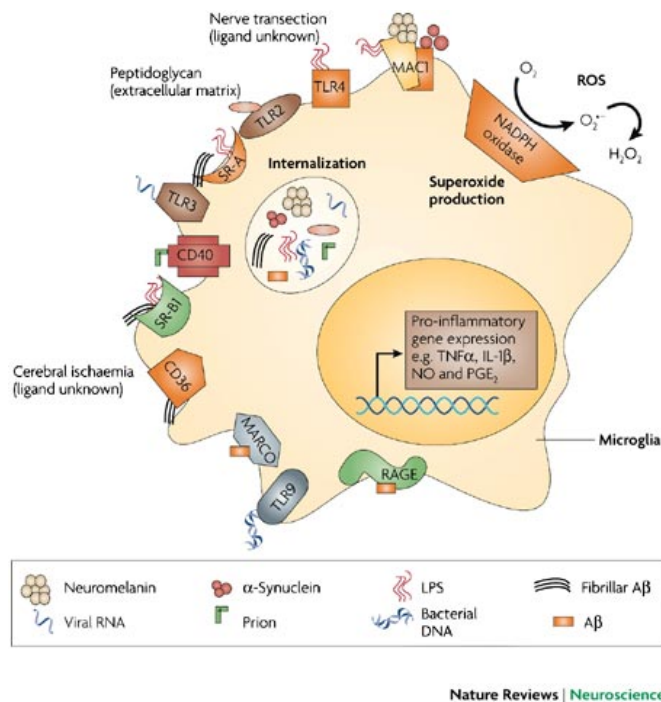


Figura 9. PRRs en la membrana citoplasmática de la microglia (Block *et al.*)

Algunos PRRs son además *receptores fagocíticos*, que activan las vías de transducción necesarias para que se produzca la reorganización del citoesqueleto imprescindible para que tenga lugar la fagocitosis. Estos receptores incluyen grupos de PRRs como los receptores Scavenger, las lectinas, y otras integrinas como las que reconocen la fibronectina y la vitronectina, además de los receptores Fcγ y los receptores del complemento. Otros receptores PRRs no fagocíticos, como el caso de los “toll-like receptors” (TLRs), no inducen la fagocitosis pero presentan un papel de cooperación con los receptores fagocíticos para activar respuestas inflamatorias (revisado por Underhill et al, 2002; Aderem, 2003).

Aunque la microglía quiescente sólo expresa niveles bajos de CR3, y no expresa CD14 ni receptor de manosa (Aloisi et al, 2000), el reconocimiento de los patógenos a través tanto de CR3 como de otros PRRs basales es suficiente para inducir un rápido incremento de estos mismos receptores, lo cual permite que se produzca un aumento de su capacidad fagocítica independiente de anticuerpos, en la que no es necesaria la inducción de la inmunidad adaptativa.

Por otro lado, la microglía también puede realizar la *fagocitosis mediada por anticuerpos*. Ésta tiene lugar mediante los receptores Fc γ , que reconocen los anticuerpos unidos a los patógenos. Para que ésta se produzca, sí es necesaria la inducción de la inmunidad adaptativa, en la cual lo primero que tiene lugar es la activación de los linfocitos T vírgenes en los órganos linfáticos y no en el parénquima del SNC, ya que la microglía del parénquima no es una buena presentadora de antígeno (APC) debido a los bajos niveles de MHC II y de proteínas coestimuladoras que presenta, y a que parece los linfocitos T vírgenes no cruzan la BHE.

Los linfocitos T activados presentan dos fenotipos diferentes, Th1 y Th2, que se determinan ya en los órganos periféricos cuando se activan. Los linfocitos Th1 secretan IL-2, IFN γ y TNF- α , y se relacionan más con respuestas proinflamatorias, mientras que los Th2 secretan IL-4, IL-10 e IL-13, que limitan la inflamación del SNC y pueden limitar los efectos nocivos de los linfocitos Th1.

Una vez activados, los linfocitos T tienen que ser reestimulados mediante la *presentación del antígeno*, la cual la pueden llevar a cabo los macrófagos perivasculares, que se encuentran muy cercanos al torrente sanguíneo y presentan expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras constitutivamente y también la microglía del parénquima, ya que los linfocitos T activados pueden atravesar la BHE (Aloisi et al, 2000).

A pesar de que el papel de la microglía como APC ha sido cuestionada, diferentes trabajos han demostrado que los niveles tanto de MHC II como de las diversas moléculas de adhesión/coestimuladoras como CD11a, CD58, CD80 y CD86 necesarias para la reestimulación aumentan durante la inflamación del SNC. Y, aunque dicha capacidad varía mucho en función del sistema experimental utilizado, se ha visto que la microglía in vitro tiene la capacidad de fagocitar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T. Además, aunque la microglía procedente del cerebro de ratones neonatos es una APC más eficiente,

se ha demostrado que la microglía de cerebro adulto activada *in vivo* induce la función de los linfocitos T efectores, lo cual sería debido en gran medida a que la producción de IFN γ por parte de los linfocitos T preactivados induce la síntesis de MHC II y las moléculas coestimuladoras necesarias para la presentación del antígeno (revisado por Aloisi, 2000; Aloisi et al, 2001).

Aunque también se ha visto variación en cuanto a su posible función como APC, los astrocitos pueden llegar a expresar MHC II sólo ocasionalmente, y su capacidad como APC es, incluso *in vitro*, muy pobre. Se ha visto, sin embargo, que en ocasiones puede presentar péptidos antigénicos y algunos lípidos antigénicos a los linfocitos Th2 (revisado por Aloisi, 2000; Aloisi et al, 2001).

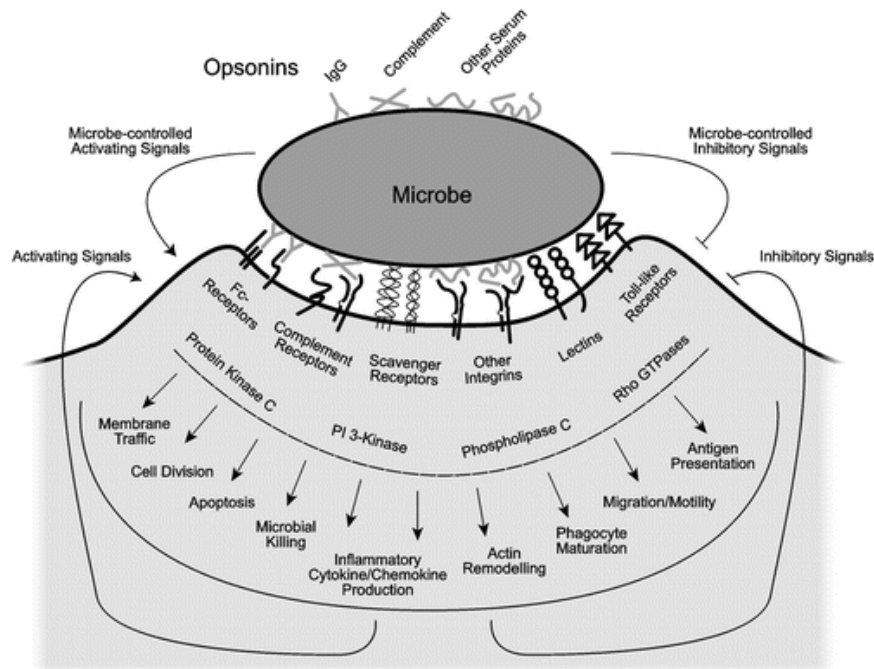


Figura 10. Receptores implicados en la fagocitosis (Underhill et al, 2002).

FAGOCITOSIS DE CÉLULAS NECRÓTICAS

El proceso por el que tiene lugar el reconocimiento y la fagocitosis de las células necróticas es menos conocido que en el caso de las células apoptóticas. La necrosis se define como una muerte celular en la que, en contraposición con la apoptosis, tiene lugar la disrupción de la membrana plasmática y la liberación al medio del contenido citoplasmático (Kitanaka et al, 1999; Denecker et al, 2001; Kalai et al, 2002). Diferentes estudios muestran cómo la necrosis viene acompañada de la activación de las células gliales (Witting et al, 2000), aunque

existen trabajos en los que no ven que las células necróticas tengan un efecto inflamatorio (Brouckaert et al, 2004).

En este sentido, podemos pensar que en las células gliales se produciría un efecto análogo al visto en otros macrófagos, en los que las células necróticas inducen una respuesta inflamatoria mediante la activación de NF- κ B a partir de la acción de los receptores TLR (Li et al, 2001). De hecho, gran número de moléculas liberadas por las células necróticas, como diferentes HSPs, el fibrinógeno o HMGB1, constituyen los llamados “ligandos endógenos” de los receptores TLR, que inducen la producción de mediadores proinflamatorios (revisado por Beg, 2002; Tsan et al, 2004; Papadimitraki et al, 2007), a partir de la unión a dichos receptores (especialmente de TLR2 y TLR4).

FAGOCITOSIS DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

La fagocitosis de las células apoptóticas comienza con el reconocimiento de las mismas gracias a la presentación de señales específicas en su membrana citoplasmática, las cuales se unen directa o indirectamente a receptores presentes en la membrana plasmática de la microglía. Dichas señales incluyen carbohidratos o residuos oxidados, sitios de unión para diferentes moléculas extracelulares como por ejemplo el complemento y moléculas intracelulares que se externalizan durante el proceso apoptótico (revisado por Wu et al, 2006; Adayev et al, 1998).

Uno de los cambios mejor caracterizados durante la apoptosis es la externalización de la fosfatidilserina, un fosfolípido que se encuentra normalmente en la cara citoplasmática de las células, pero que ya en las primeras fases de la apoptosis pasa a la cara extracelular (Li et al, 2003). La fosfatidilserina es reconocida directa o indirectamente por diferentes receptores presentes en la membrana citoplasmática de la microglía, como el receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$ integrin), el receptor tirosina quinasa MER, el receptor β 2-glicoproteína-1 y el receptor de fosfatidilserina (PSR) (revisado por Witting et al, 2000).

La fagocitosis de células apoptóticas se caracteriza por la inhibición de la respuesta inflamatoria debido a la producción activa de citoquinas antiinflamatorias como el TGF- β y la IL-10 y la disminución de las citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-12 (revisado por Savill et al, 2000; Wu et al, 2006). Estos efectos están mediados por diferentes receptores, como TREM2, un

receptor descrito recientemente presente en la membrana citoplasmática de la microglía, cuya activación comporta un aumento de la capacidad fagocítica por parte de la microglía, así como una disminución en la producción de diferentes mediadores proinflamatorios, como TNF- α , IL-1 β o NOS-II (Takahashi et al, 2005).

1.2.3. MEDIADORES INFLAMATORIOS

EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El complemento es un sistema de defensa formado por proteínas solubles y asociadas a membrana, diseñadas para llevar a cabo cuatro funciones principales: reconocimiento de las células diana, opsonización, estimulación proinflamatoria y muerte celular directa mediante lisis. En el SNC, estas proteínas son sintetizadas tanto por las células gliales como por las neuronas. El complemento presenta dos vías principales: la vía clásica y la alternativa.

La vía clásica comienza con la unión del componente C1q a la diana, bien a través del complejo antígeno-anticuerpo o bien por la interacción de C1q con moléculas no inmunes, como pentraxinas o activadores del complemento, como ADN, ARN, proteína C-reactiva, LPS e incluso por la proteína β -amiloide fibrilar (Rogers et al, 1992). Por ello, el complemento es un sistema que puede formar parte tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. La interacción de C1q activa una cascada de proteasas (C1r, C1s, C4, C2 y C3) que amplifica la respuesta e inicia el proceso de opsonización. La vía alternativa comienza con la unión e hidrólisis espontánea de C3, que es el elemento en que las dos vías se unen, ya que los activadores del complemento, como en el caso de C1q, también pueden mediar la unión de C3b, que se genera por hidrólisis espontánea continuamente en bajas cantidades en el suero. C3b y C4b, productos de la hidrólisis de C3 y C4, se unen cerca de C1q en el tejido diana y se convierten en ligandos para los receptores del complemento, presentes principalmente en las células microgliales, especialmente el CR3 que, como ya se ha explicado, la microglía presenta de forma constitutiva y se ve rápidamente incrementado durante la activación, lo cual permite una rápida respuesta ante la aparición de cualquier patógeno.

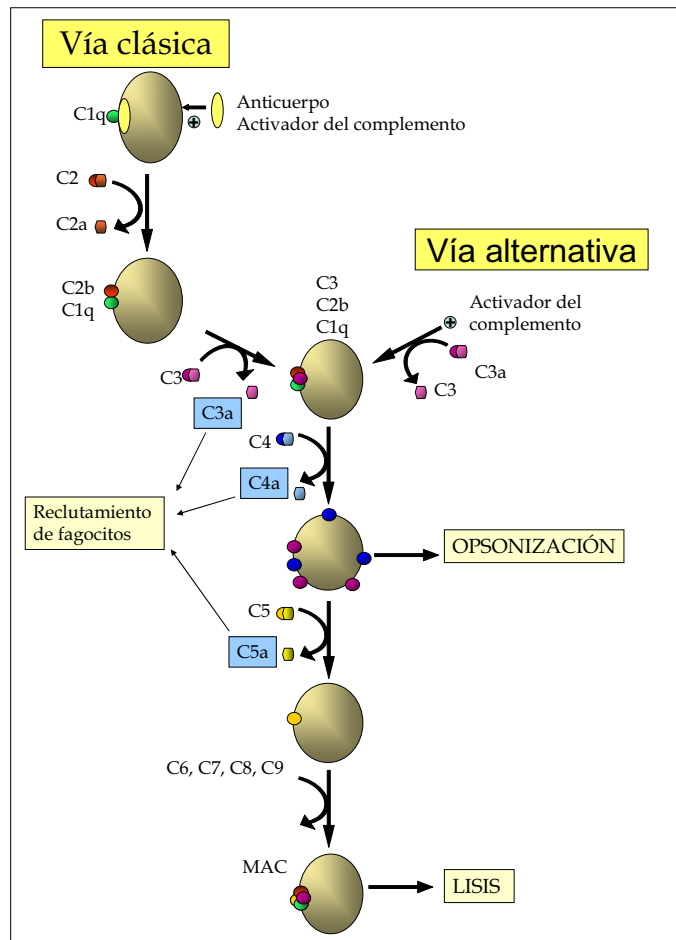


Figura 11. Esquema de la vía clásica y la vía alternativa del sistema del complemento

Cuando el complemento está totalmente activado, el resto de componentes se ensamblan formando el MAC o complejo de lisis, que forma un poro y produce finalmente la lisis de la célula. Además, el complemento se encarga de amplificar la inflamación, ya que productos derivados de la hidrólisis de las diferentes proteínas, como C3a, C4a y C5a, también conocidas como anafilotoxinas, están implicadas en la quimiotaxis y activación de la microglía (revisado por Nataf et al, 1999).

Aunque existe una gran cantidad de mecanismos que pueden detonar la activación del complemento, también encontramos toda una serie de mecanismos protectores, que defienden a las células propias del sistema del complemento, entre los que se encuentran el inhibidor de C1, la proteína de unión a C4, “decay acceleratin factor” o las proteínas CD46 y CD59 (McGeer et al, 2001).

Sin embargo, en ciertas situaciones como la enfermedad de Alzheimer, en la que el péptido β -amiloide es uno de los activadores no inmunes del complemento, se ha visto un aumento de las proteínas que forman el

complemento, y que las neuronas dañadas presentan el sistema MAC insertado en sus membranas, de modo que se piensa que dicha activación podría exacerbar el daño neuronal.

CITOQUINAS

Las citoquinas son un grupo heterogéneo de pequeñas moléculas que actúan de una forma autocrina, paracrina y endocrina mediando gran número de funciones del sistema inmunitario, que es donde se han descrito la mayoría de ellas. Estas proteínas actúan a través de la unión a receptores de membrana, regulando procesos como el crecimiento, la supervivencia celular o la diferenciación entre otros. Las citoquinas engloban un gran número de subgrupos que incluyen interleuquinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias (CSF) y quimioquinas.

Como ocurre con otros mediadores inflamatorios, existen gran cantidad de estímulos que activan la producción de las citoquinas, de manera que durante la activación glial tanto la microglía como los astrocitos producen gran número de citoquinas. En el SNC, las citoquinas, beneficiosas en cuanto a que median muchas de las funciones de los astrocitos y la microglía, se han relacionado con los efectos neurotóxicos de la activación glial, producidos especialmente cuando persisten altos niveles de estas moléculas durante períodos prolongados de tiempo.

Las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias como tales no existen, debido a que muchas de ellas pueden presentar ambos tipos de funciones dependiendo del receptor al que se unan, el tipo celular en el que se encuentre dicho receptor y las señales adicionales que lleguen a las células. Sin embargo aquí diferenciaremos estos dos grupos formados clásicamente para distinguir aquellas a las que se les atribuyen más acciones proinflamatorias de las que presentan un perfil más antiinflamatorio.

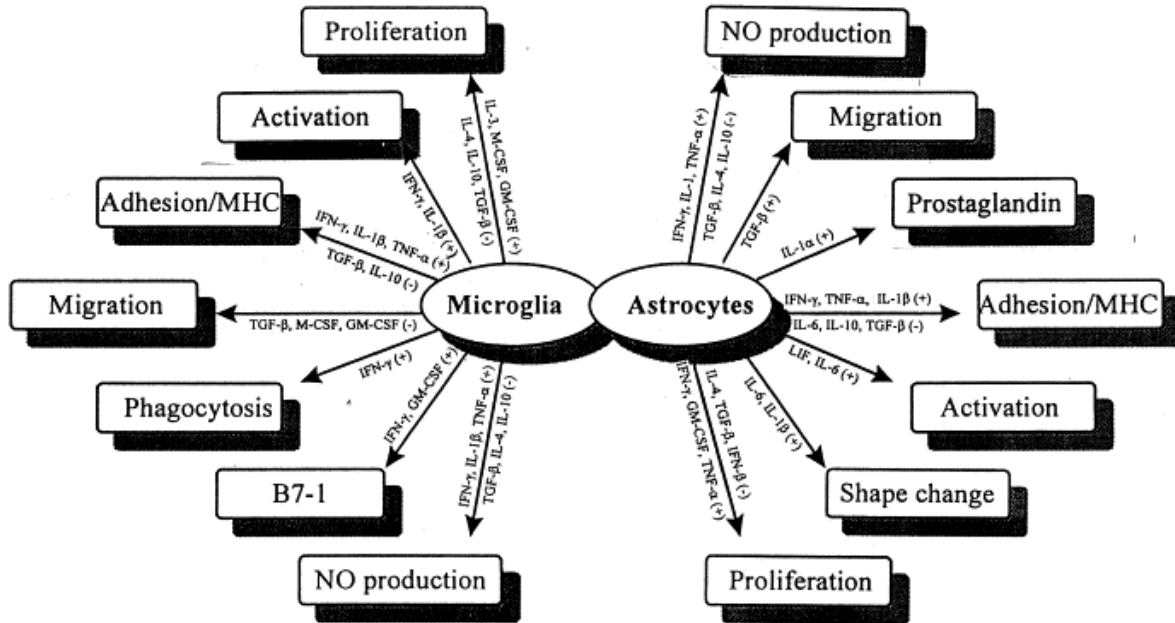


Figura 12. Efectos de las citoquinas en astrocitos y microglía: (-) significa una disminución, (+) un incremento (Xiao et al, 1998).

Citoquinas proinflamatorias

TNF-α

El TNF-α, producido principalmente por la microglía, macrófagos y células T, presenta un papel central en la activación glial. Esta citoquina actúa en forma de trímero mediante la unión a dos receptores, TNFR1 y TNFR2, lo cual inicia vías de transducción de señales que incluyen la activación de la cascada de MAPK y la translocación del factor NF-κB al núcleo, lo que dará lugar a la activación de la transcripción de un gran número de genes.

El TNF-α promueve la fagocitosis por parte de la microglía, induce el reclutamiento de los neutrófilos y monocitos mediante la activación de la producción de diferentes quimioquinas como el MCP-1, y activa la producción de diferentes metaloproteinasas (revisado por Gosselin et al, 2007).

IL-1

Esta familia consta de 3 componentes. Los dos primeros, IL-1α e IL-1β, con tan solo un 30% de homología, tienen diferentes mecanismos de expresión, síntesis y secreción y actúan como agonistas, mientras que el tercero, IL-1ra, es un

inhibidor endógeno de los primeros, ya que se une a los mismos receptores pero no induce ninguna señal intracelular.

La IL-1 β , cuya fuente mayoritaria en el SNC es la microglía (Brenneman et al, 1992; Rothwell et al, 1993), a diferencia de la IL-1 α es secretada y aumenta de una forma rápida en el SNC en condiciones patológicas. Esta citoquina presenta un gran número de acciones producidas gracias a la unión a su receptor que, como en el caso del TNF- α , conlleva la transcripción de gran número de genes a través de la activación de la cascada de MAPK y de la translocación de NF- κ B.

Así, la IL-1 activa los procesos necesarios para una rápida cicatrización del daño producido, como el "*neuronal sprouting*", la neovascularización, o la producción de factores neurotróficos como el NGF o el CNTF, lo cual le confiere un efecto neuroprotector. Sin embargo, también se ha visto que promueve la síntesis de metaloproteinasas y de citoquinas como la IL-6 y quimioquinas, y la producción de radicales libres, de tal manera que existen muchos trabajos en los que se ha visto que su inhibición mediante diferentes mecanismos conlleva una reducción de la neurodegeneración (Gosselin et al, 2007).

IFN γ

El IFN γ es el único componente del subtipo II de la familia de los interferones. Aunque su presencia se relaciona con la de sus principales productoras, las células T y las células NK (natural killer), se ha visto que en el SNC también existe una producción endógena.

El IFN γ tiene un papel central en la regulación de la actividad inmune, ya que su acción sobre la microglía causa la expresión de una ingente cantidad de genes involucrados en el proceso inflamatorio entre los que encontramos receptores de Fc y del complemento, moléculas de adhesión, la producción y secreción de citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-6), de complemento y de NO. Además, el IFN γ induce la síntesis de muchas moléculas de superficie, como el MHC II, ICAM-I y moléculas coestimuladoras, lo cual confiere a la microglía la capacidad presentadora de antígeno (Hanisch, 2002).

IL-6

En el SNC la microglía es la principal fuente de esta citoquina que, como la IL-1 y el TNF- α , actúa en el inicio de la respuesta inflamatoria. La expresión de IL-6 es inducida por parte de la IL-1, y, como ésta, presenta funciones pro- y antiinflamatorias, como el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B (Hanisch, 2002).

Otras citoquinas proinflamatorias

Además de las ya explicadas, existen otras citoquinas proinflamatorias expresadas en el SNC durante diversos procesos proinflamatorios, como la IL-12, que induce la producción de TNF- α o de NO por parte de la microglía (Jana et al, 2003b; Ahmed et al, 2003) y que, de igual manera que la IL-18, estimula las células NK y los linfocitos Th1.

Citoquinas antiinflamatorias

Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en las citoquinas proinflamatorias, las antiinflamatorias ejercen un papel modulador muy importante en la activación glial, ya que son éstas las que permiten en muchas ocasiones disminuir la producción del resto de mediadores proinflamatorios. Así, citoquinas como la IL-10 o el TGF- β , que producen las mismas células gliales, hacen que se produzca la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, radicales de nitrógeno y oxígeno y la expresión de moléculas asociadas a la presentación de antígeno (revisado por Aloisi, 2001; Heneka et al, 2007). Por su parte, IL-1ra bloquea los efectos de IL-1 α e IL-1 β , mientras que IL-4 podría inhibir la activación microglial mediante la inducción de la expresión de CD200 en neuronas (Lyons et al, 2007).

Estas citoquinas podrían tener implicaciones importantes en el tratamiento de enfermedades en las que la activación glial exacerbada se erige como causa de la neurodegeneración, ya que se ha visto que el tratamiento con éstas podría disminuir los efectos neurotóxicos que se dan en algunas enfermedades como, por ejemplo en el dolor neuropático (Ledeboer et al, 2007).

QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas (de la palabra inglesa chemokines, forma acortada de *chemoattractant cytokines*) se describieron inicialmente como un grupo de citoquinas involucradas en la regulación de la migración leucocitaria durante las respuestas inflamatorias. Hasta el momento han sido identificadas 50 quimioquinas, clasificadas en cuatro familias, CXC, CC, XC y CX3C, de acuerdo con la secuencia de cisteínas conservadas en el extremo N-terminal (revisado por Charo et al, 2006).

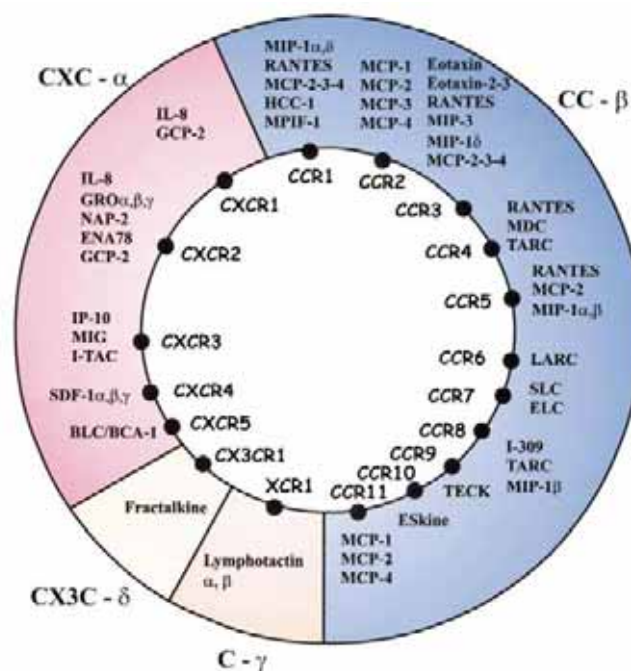


Figura 13. Familias de quimioquinas. Dentro de la circunferencia se indican los componentes de las familias, que están distribuidas en grupos según el receptor al que se unen (en el interior) (Bajetto et al, 2002).

Los efectos de las quimioquinas vienen dados por su unión a receptores de alta y baja afinidad, de los cuales han sido descritos 20 y cuya nomenclatura viene dada por la familia de las quimioquinas a las que se unen. Así, hay 5 receptores CXC (CXCR1 a CXCR5), 11 receptores CC (CCR1 a CCR11) y los receptores CX3CR1, que se unen a los únicos componentes de las familias CX3C y XC (la fractalkina o CX3CL1 y la linfotactina o XCL1). La relación entre las quimioquinas y sus receptores es compleja y promiscua, es decir, múltiples quimioquinas se unen a un mismo receptor y una quimioquina se puede unir a más de un receptor.

Todos estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana (7TMD), los cuales, a través de proteínas G, activan vías de transducción como la vía Akt y la vía de las MAPK, mediante las cuales se modulan procesos como la supervivencia celular, la quimiotaxis o la proliferación celular entre otras (Cartier et al, 2005) (ver figura 15).

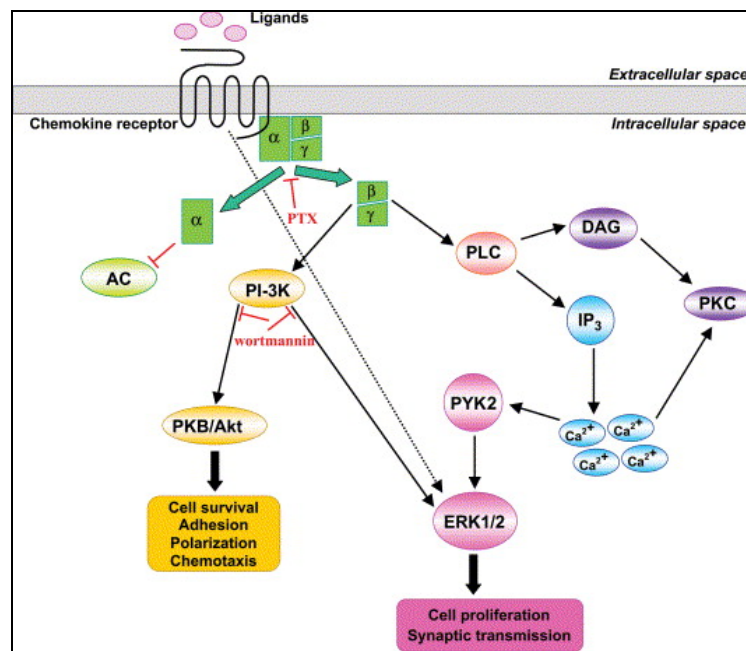


Figura 14. Vías de transducción activadas por la unión de las quimioquinas a sus receptores (Cartier et al, 2005).

Aunque en un primer momento, como se ha comentado, las quimioquinas se describieron como citoquinas inducibles que facilitan el reclutamiento de poblaciones leucocitarias en los sitios de inflamación, se han descrito numerosas funciones, no sólo en condiciones inflamatorias, sino también en condiciones fisiológicas en el SNC, donde se ha descrito la presencia de gran número de quimioquinas y sus receptores (revisado por Cartier et al, 2005). Así, *en condiciones fisiológicas*, se ha descrito su papel en procesos tan importantes como la migración de las células durante el desarrollo del SNC o la proliferación celular y el soporte trófico (revisado por Bajetto et al, 2002; Cartier et al, 2005). Se han descrito incluso acciones fisiológicas propias de los neuromoduladores de las sinapsis (Rostene et al, 2007). Existen, además, un gran número de *patologías*, tales como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer o la demencia asociada al virus del sida en las que se ha visto el posible papel neurotóxico que

las quimioquinas y sus receptores podrían jugar (revisado por Bajetto et al, 2002; Cartier et al, 2005; Ambrosini et al, 2004).

Durante la inflamación del SNC, las células inmunes extravasadas, las células endoteliales, los astrocitos y la microglía son fuentes potenciales de quimioquinas. Los astrocitos activados pueden producir quimioquinas como CXC3L1 (fractalkina), que ejerce un efecto inhibitorio sobre la microglía, y otras quimioquinas como CCL2/MCP-1, CCL20, CXCL10, CXCL12, CXCL1, CXCL2 y CCL5/RANTES, que inducen el reclutamiento de macrófagos, microglía, células dendríticas y linfocitos B y T hacia las zonas de inflamación (Farina et al, 2007). Por su parte, la microglía produce una gran variedad de quimioquinas, muchas de las cuales contribuyen al reclutamiento de linfocitos T, macrófagos y células dendríticas en el parénquima cerebral, como las quimioquinas CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, de la familia CXC, y otras de la familia CC (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES) (Ambrosini et al, 2004; Aloisi, 2001).

Además de producirlas, tanto los astrocitos como la microglía son regulados de forma paracrina y autocrina por estos compuestos. Así, mediante la unión a múltiples receptores presentes en la membrana de las células gliales, las quimioquinas regulan procesos como la migración, la proliferación y la producción de citoquinas y de las mismas quimioquinas (ver figura 14).

Sin embargo, como pasa con las citoquinas, la producción de las quimioquinas está bajo un estricto control. Así, moléculas antiinflamatorias que incluyen neuropéptidos, citoquinas (IL-4, IL-10, TGF- β) y PGE₂, hacen que se produzca una disminución de la producción de las mismas por parte de la microglía (revisado por Ambrosini et al, 2004).

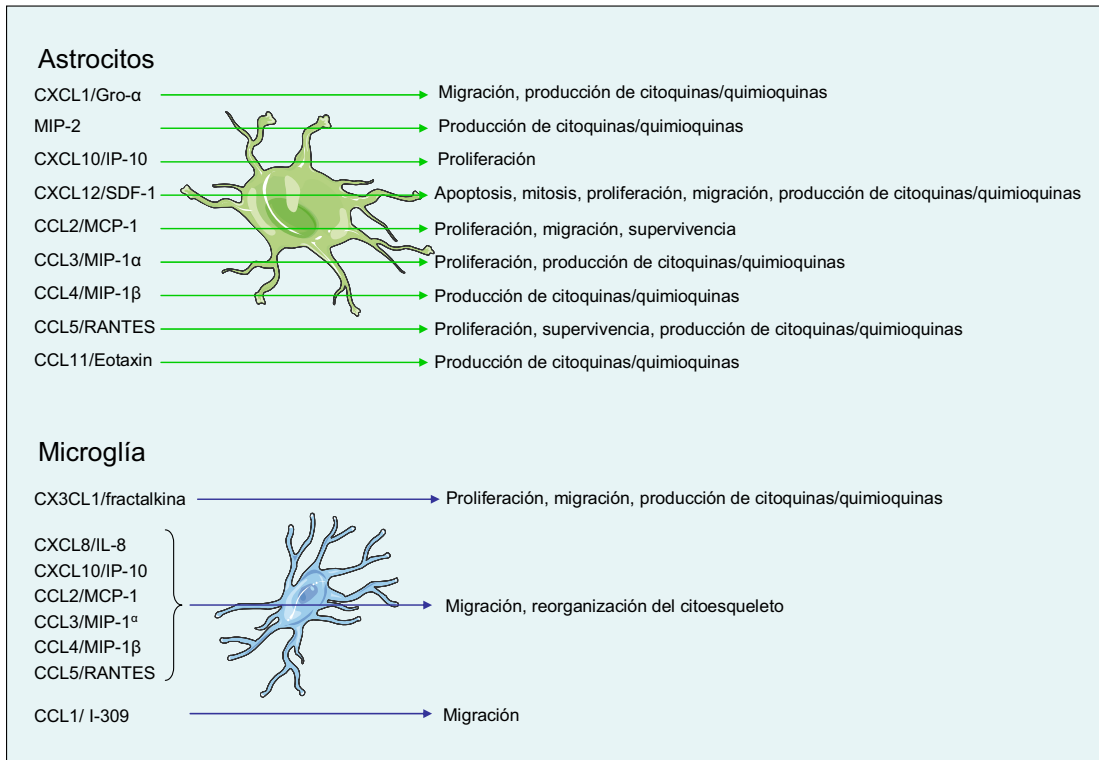


Figura 15. Funciones de las quimioquinas en astrocitos y microglía (Figura modificada de Ambrosini, 2004).

OTROS MEDIADORES INFLAMATORIOS

COX-2

La ciclooxigenasa es una enzima que cataliza pasos claves en la síntesis a partir del ácido araquidónico de un amplio espectro de prostanoïdes, una familia de metabolitos del ácido araquidónico que comprende prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Existen dos isoformas de la ciclooxigenasa, la COX-1, con una expresión constitutiva y la COX-2, que se había considerado clásicamente inducible, aunque se ha visto que en el SNC se expresa también en condiciones fisiológicas contribuyendo a procesos como la actividad sináptica (Minghetti et al, 2007).

Diversos estímulos proinflamatorios inducen la expresión de COX-2, tanto en astrocitos como en microglía. De hecho, la misma prostaglandina E2 (PGE2), producto mayoritario de la COX-2, induce la síntesis de más COX-2 en la microglía mediante la unión a los receptores.

Actualmente, el posible papel neuroprotector o neurotóxico que la COX-2 ejerce, despierta una gran controversia. Así, parece que las cantidades y

proporciones de los metabolitos que produce pueden determinar los efectos finales de la actividad enzimática de la COX, ya que algunos de ellos pueden ser neuroprotectores, mientras que otros son neurotóxicos. Además, las funciones de estos metabolitos pueden ser antiinflamatorias o proinflamatorias. Por ejemplo, si bien se han descrito en muchas ocasiones las acciones antiinflamatorias de la PGE₂, existen otros estudios en los que se muestra el papel neurotóxico de la misma. En este sentido encontramos diferentes estudios en los que se demuestra que la inhibición de este enzima conlleva efectos antiinflamatorios (revisado por Heneka et al, 2007), como ocurre en el caso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los cuales inhiben la actividad de la COX.

NOS-II

Existen tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa, la NOS-I (nNOS), la NOS-II (iNOS) y NOS-III (eNOS), que es la enzima encargada de producir NO a partir de la L-argininina. La síntesis de NOS-II se induce por una gran cantidad de estímulos proinflamatorios a través de diferentes vías de señalización (revisado por Saha, 2006) (ver figura 16).

En condiciones fisiológicas, el NO está presente en bajas concentraciones y juega un papel en la neurotransmisión y la vasodilatación. Sin embargo, cuando se induce la NOS-II, ésta produce grandes cantidades de este gas. El NO, cuando está muy concentrado, se convierte en un componente citotóxico capaz de matar a los patógenos invasores. Además, al reaccionar con radicales libres de oxígeno se forma el peroxinitrito, más tóxico aún que el propio NO.

Se ha visto que el NO, bien directamente o mediante la formación del peroxinitrito, puede ser un producto muy citotóxico incluso para las células propias, contribuyendo a la muerte de los oligodendrocitos y de las neuronas. Así, su presencia se ha asociado a gran cantidad de patologías del SNC, como la isquemia, el SIDA o varias enfermedades neurodegenerativas (revisado por Heneka et al, 2007; Saha et al, 2006b; Brown et al, 2003).

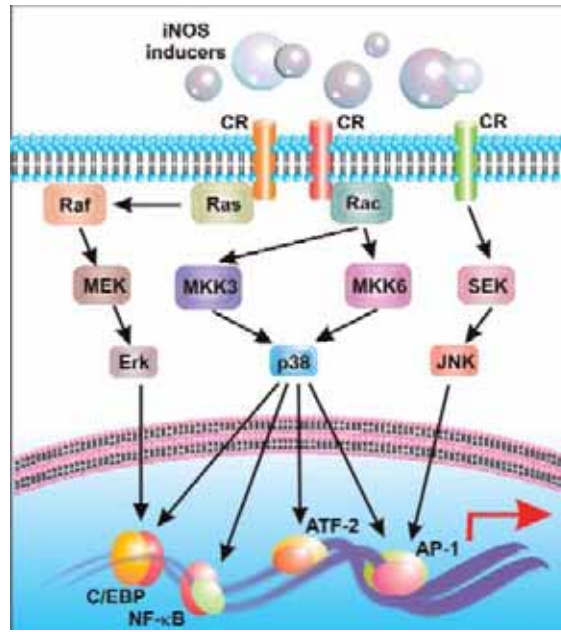


Figura 16. Visión general de las vías que activan la expresión de NOS-II (Saha et al, 2006a).

NADPH oxidasa

La NADPH es la principal enzima responsable de la producción de ROS, tanto extracelulares como intracelulares. La activación glial conlleva la translocación de la NADPH oxidasa a la membrana y la consiguiente formación de radicales libres de oxígeno extracelulares. Como ocurría con el NO, los ROS presentan funciones a bajas concentraciones tales como regulación de factores de transcripción como NF- κ B o AP-1 (Block et al, 2007), pero pueden ser altamente citotóxicos cuando sus concentraciones son muy elevadas, debido a que, ya sea mediante la formación de peroxinitrito junto con el NO o por sí solos, son capaces de dañar las células de forma irreversible mediante la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas (para revisión ver Heneka et al, 2007).

P21

P21^{Cip1} pertenece a la familia Cip/Kip de los CdKIs, la cual incluye otros miembros como p27 y p57. La función más conocida de esta proteína es la de modular negativamente la progresión del ciclo celular mediante la inhibición de la actividad de los complejos ciclina/cdk2. Sin embargo, se ha visto que P21^{Cip1} también puede actuar en ocasiones como un regulador positivo del ciclo celular

porque esta proteína estabiliza la unión de cdk4/cdk6 y las ciclinas D (revisado por Gartel et al, 2005).

Aunque el principal regulador transcripcional de p21^{Cip1} es p53, existen otros factores de transcripción que activan la transcripción de P21^{Cip1}, entre los que encontramos Sp1/Sp3, STATs, Ap2 y C/EBP α y C/EBP β (revisado por Gartel et al, 1999).

El papel de p21^{Cip1} en la activación glial es muy poco conocido y no fue hasta hace poco tiempo, cuando su implicación en este proceso fue demostrado por nuestro laboratorio en un estudio en el que se vio cómo diferentes parámetros de la activación glial se veían alterados en su ausencia. Así, se vio que tras la activación glial in vitro mediante el tratamiento con LPS, las células gliales de ratones deficientes en p21^{Cip1} presentaban una disminución en la producción de NO y en la translocación de NF- κ B, mientras que la producción de TNF- α se veía incrementada (Tusell et al, 2005).

1.2.4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN LA ACTIVACIÓN GLIAL

En la activación glial la aparición de señales extracelulares desencadena la aparición de una gran cantidad de cambios a nivel proteico, muchos de los cuales tienen lugar gracias a la regulación transcripcional. Los factores de transcripción tienen una importancia clave en este proceso, ya que son los encargados de traducir dichas señales extracelulares y de regular la transcripción.

Existen un número relativamente pequeño de familias de factores de transcripción que parecen determinantes en la regulación de todos estos cambios que tienen lugar en los procesos proinflamatorios, entre las que se encuentran CREB/ATF, Jun-Fos, STAT, NF-AT, NF- κ B, y C/EBP (Akira, 1997). Nosotros aquí nos centraremos en dos de estas familias: NF- κ B y C/EBPs.

NF-KB

El NF- κ B es uno de los factores de transcripción más estudiados y mejor caracterizados, debido a que regula la transcripción de muchos genes claves en procesos inmunes e inflamatorios como citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, proteínas de membrana o neuropéptidos (Baeuerle et al, 1996).

NF- κ B pertenece a los factores inmediatos o “early-immediate transcription factors” ya que, tal como ocurre con otros factores como por ejemplo los de la familia CREB, este dímero transfiere la señal extracelular directamente al núcleo, permitiendo una rápida respuesta transcripcional. Esto se debe a que su regulación tiene lugar principalmente a nivel posttraduccional, de manera que, ante la presencia de señales estimuladoras, la forma inactiva de NF- κ B, presente en el citoplasma de las células, se active y se transloque rápidamente al núcleo, donde se unirá a las secuencias κ B presentes en los promotores de muchos genes (O'Neill et al, 1997).

La forma activa de NF- κ B está compuesta por dos subunidades pertenecientes a la familia Rel, la cual incluye cinco miembros (c-Rel, p50, p52, RelA/p65 y RelB). Estas proteínas presentan una región N-terminal altamente conservada y una región C-terminal mucho más divergente, que determina que la especificidad de unión sea diferente. Así, la formación de diferentes combinaciones dimericas constituye una modulación de su actividad transcripcional (Liou et al, 1993). Sin embargo, el dímero más frecuente en las células es el compuesto por p50 y p65 (RelA) (Akira, 1997).

En condiciones basales NF- κ B se encuentra en el citoplasma en forma latente, formando un complejo con una proteína inhibidora perteneciente a la familia I κ B. Las proteínas de la familia I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B γ) impiden la translocación de NF- κ B debido a que al unirse tapan el sitio de localización nuclear del dímero. Además, el I κ B α es capaz de entrar en el núcleo y disociar los complejos ADN/NF- κ B preformados. La activación de NF- κ B se produce gracias a la fosforilación de I κ B, que permite que I κ B se separe de NF- κ B y sea rápidamente ubiquitinizada y degradada. NF- κ B puede entonces translocar al núcleo y unirse al ADN.

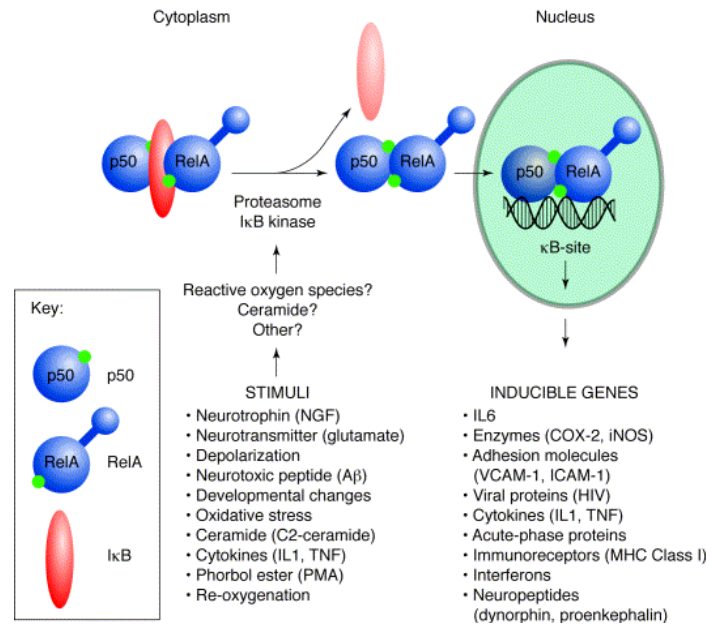


Figura 17. Activación de NF- κ B (O'Neill et al, 1997)

Existen gran cantidad de estímulos que producen la activación de NF- κ B como neurotrofinas, neurotransmisores, citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α , o la radiación ultravioleta. Además, los radicales de oxígeno pueden jugar un importante papel en la activación de NF- κ B, ya que bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno son capaces de producir una rápida activación (Akira et al, 1997).

Sin embargo, el hecho de que NF- κ B presente una mayor importancia en neuroprotección frente a la neurodegeneración es materia de debate, debido sobretudo al hecho de que este factor presenta diferentes funciones en neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y microglía. Así, en neuronas promueve la proliferación, el desarrollo y participa en aspectos de la función neuronal, aunque también media la apoptosis inducida por β -amiloide. Por otro lado, su papel en la activación de muchos genes proinflamatorios en las células gliales le confiere un papel potencialmente neurotóxico, de tal manera que existen evidencias de que mientras que NF- κ B es necesario para la supervivencia neuronal, una cantidad muy elevada de NF- κ B activado puede conllevar efectos neurotóxicos en enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson (revisado por Pizzi et al, 2006).

CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEINS (C/EBPS)

Las proteínas C/EBP pertenecen a la familia de factores de transcripción bZIP, en la que también se encuentran otros factores de transcripción muy importantes como c-jun, c-fos (AP-1) o CREB.

El primer componente de esta familia fue descubierto por el laboratorio de Steve McKnight, y lo denominaron C/EBP (de "CCAAT/Enhancer Binding Protein") debido a que vieron que se unía a la secuencia CCAAT presente en los promotores de muchos genes y también al núcleo de la región homóloga de muchos *enhancers* de virus. A partir de éste, 5 componentes más fueron descubiertos por diferentes laboratorios. Todos ellos presentan más de un nombre, debido a que la mayoría fueron descubiertos de forma simultánea por diferentes grupos. Sin embargo, hoy en día la nomenclatura más utilizada es la propuesta por Cao (Cao, 1991) según la cual a la raíz "C/EBP" se le añadió una letra griega en referencia al orden cronológico del descubrimiento de las mismas, de tal manera que la familia de C/EBPs la forman C/EBP α , β , δ , γ , ϵ y ζ .

Todos los componentes de esta familia tienen una estructura constante, formada por dos dominios principales: el dominio bZIP y el dominio de activación. En el extremo C-terminal encontramos el **dominio bZIP**, con una homología superior al 90% entre los diferentes C/EBPs. Este dominio está compuesto por una región de unión al ADN, cuya secuencia de aminoácidos determinará la especificidad de unión a los promotores de los genes, y una región de dimerización denominada "cremallera de leucina", que consiste en una secuencia repetitiva de heptámeros con 4 ó 5 leucinas que adquieren una configuración α -helicoidal y que se pueden intercalar con las leucinas de otra "cremallera de leucina" para formar un dímero mediante el establecimiento de interacciones electrostáticas entre los aminoácidos de la región de dimerización. Los miembros de la familia C/EBP pueden formar dímeros entre ellos o con los de otras familias como la familia NF- κ B y las Fos/Jun (revisado por Ramji et al, 2002).

El extremo N-terminal de las proteínas C/EBPs es mucho más divergente que el resto de la proteína, excepto por tres pequeñas subregiones que forman el **dominio de activación**, por el cual estos factores de transcripción interactúan con proteínas del aparato de transcripción. Este dominio está presente en todos

los componentes de la familia C/EBP excepto en C/EBP γ , por lo que se le considera como un dominante negativo, ya que es capaz de formar dímeros, pero no de llevar a cabo la activación de la transcripción.

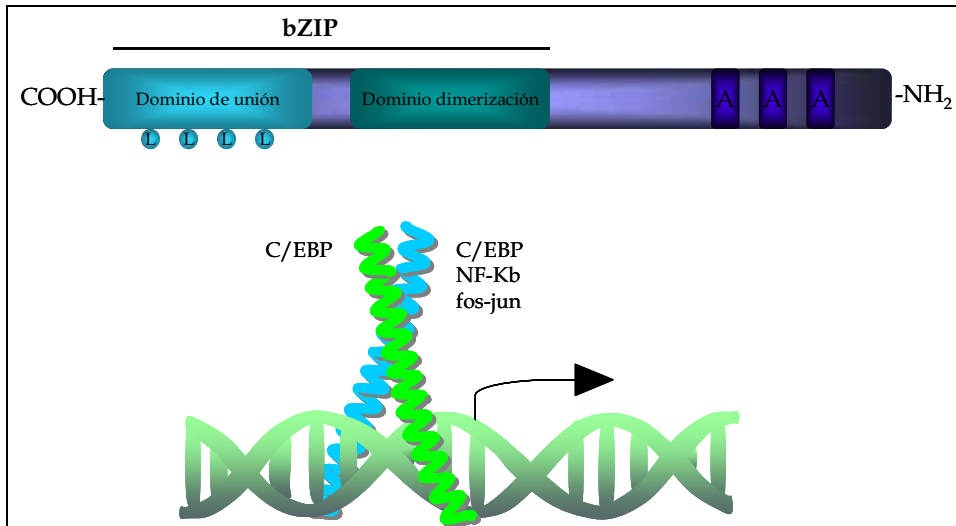


Figura 18. Estructura de la familia de los C/EBPs

De hecho, la dimerización se ha erigido como un mecanismo regulador muy importante, ya que tanto la actividad transactivadora como la especificidad de unión al ADN pueden verse altamente modificados por las proteínas que dimerizan con los C/EBPs (revisado por Ramji et al, 2002; Schrem et al, 2004; Lekstrom-Himes et al, 1998).

En este trabajo nosotros nos hemos centrado en C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ , ya que estos tres componentes están muy relacionados entre sí y son los que se han relacionado de una forma más clara con procesos inflamatorios tales como la respuesta de fase aguda (Akira et al, 1997).

Regulación de C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ

Estos tres factores de transcripción pueden ser regulados a muchos niveles, aunque tanto en el caso de C/EBP α como de C/EBP β y C/EBP δ , la transcripción parece ser el principal mecanismo de regulación. Así, a nivel transcripcional, la regulación tanto de C/EBP α como de C/EBP β y C/EBP δ , tiene lugar gracias a la unión a su promotor de diferentes factores de transcripción. En el promotor del gen murino de C/EBP α encontramos sitios de unión a PU. 1,

nuclear factor-1 (NF-1), NF-Y, upstream stimulating factor (USF), Basic transcription element-binding protein (BTEB), NF- κ B y también a C/EBP, gracias al cual él mismo puede autorregularse. Aunque en el promotor del gen humano no existe este sitio de unión a C/EBP, se ha visto que la autorregulación se sigue produciendo de forma indirecta mediante la regulación de unión del USF por el propio C/EBP α (Ramji et al, 2002; Lekstrom-Himes et al, 1998).

Por su parte, **C/EBP β** presenta en su promotor diferentes sitios de unión entre los que encontramos 3 de unión a UF1, UF2 y UF3 y dos de unión a Sp1. Como en el caso de C/EBP α , C/EBP β puede llevar a cabo una autorregulación ya que se ha visto que C/EBP β se une a UF1 y UF2 (Chang et al, 1995). Además, la unión de CREB al promotor de C/EBP β parece ser un factor importante tanto para la expresión basal como para la inducción de C/EBP β .

A diferencia de $-\alpha$ y de $-\beta$, **C/EBP δ** se encuentra raramente presente en condiciones basales, y su expresión aumenta en determinadas situaciones, como la adipogénesis o situaciones inflamatorias. De hecho, diferentes estudios encontraron que la transcripción de C/EBP δ se encuentra inhibida de forma constitutiva por LIP y C/EBP ζ , que se unen a C/EBP δ impidiendo la formación de homodímeros δ - δ y por consiguiente su propia activación (Ramji et al, 1993). El promotor de C/EBP δ contiene un sitio de unión de "signal-transducer and activator of transcription 3" (STAT-3) así como dos sitios de unión al mismo C/EBP δ , de tal forma que se cree que la activación inicial de la expresión de C/EBP δ se lleva a cabo por la unión de STAT3, mientras que el mantenimiento tendría lugar gracias a la autorregulación (Schrem et al, 2004). Recientemente, se ha visto que Sp1, c-jun y c-Rel también podrían jugar un papel importante en la activación de C/EBP δ (Huang et al, 2007).

A nivel traduccional, tanto C/EBP α como C/EBP β , aunque no C/EBP δ , presentan un mecanismo de regulación gracias a un proceso llamado "escaneo ribosomal" (leaky ribosome scanning). Este proceso permite que a partir de un único ARNm se produzca más de una isoforma, debido a la existencia de más de un codón de inicio de la traducción (Descombes et al, 1991). Dichas isoformas presentan una capacidad de transactivación diferente debido a que muchas de ellas no contienen el dominio de activación completo. Además, se ha visto que la proporción de las diferentes isoformas puede variar en diferentes situaciones, lo

cual conlleva cambios importantes de cara a su funcionalidad (revisado por Lekstrom-Himes et al, 1998).

El único ARNm producido a partir del gen de **C/EBP α** puede dar lugar a tres isoformas diferentes. Mientras que la primera de ellas, de 42 KDa, presenta plena capacidad de transactivación, las otras dos isoformas, de 30 KDa y 20 KDa, producidas a partir del tercer y quinto codón de iniciación respectivamente, presentan una capacidad de transactivación disminuida debido a que no contienen todo el dominio de activación (revisado por Lekstrom-Himes et al, 1998c; Schrem et al, 2004; Ramji et al, 2002).

En el caso de **C/EBP β** , también encontramos que a partir de su único ARNm se producen tres isoformas diferentes, Full (38 KDa), LAP (32KDa) y LIP (20 KDa). En este caso, tanto Full como LAP contienen el dominio de transactivación intacto, mientras que en el caso de LIP este dominio falta. LIP actúa, de hecho, como un dominante negativo, porque dimeriza como lo hacen LAP o Full, e impide la transactivación. De hecho, lo que determina la función final de este factor de transcripción es la relación LAP/LIP, de tal manera que dicha proporción es más importante que la cantidad absoluta de LAP, y la activación de la transcripción génica se produce cuando dicha relación se ve incrementada (revisado por Descombes et al, 1991).

A nivel postraducciona, se ha visto que, a pesar de que se han descrito también acetilaciones y sumolizaciones, la fosforilación constituye el principal mecanismo de regulación, aunque también tiene lugar una modulación muy fina mediante las interacciones proteína-proteína.

Si bien la fosforilación no aparece como mecanismo principal en la funcionalidad de **C/EBP α** , existen trabajos que muestran la regulación mediante la fosforilación de alguno de sus residuos de serina, provocando la disminución de su actividad de unión al ADN o su degradación (revisado por Lekstrom-Himes et al, 1998c).

En el caso de **C/EBP β** , existen muchos trabajos que defienden la fosforilación como un mecanismo básico en la regulación de esta proteína. Así, se ha visto que la fosforilación de diferentes serinas y treoninas por diferentes quinasas como la PKC, la PKA o la RSK90 puede regular diversos procesos como el transporte de C/EBP β del citoplasma al núcleo o viceversa, así como su actividad transactivadora (revisado Schrem et al, 2004; Ramji et al, 2002). Un

estudio del laboratorio del Dr. Smale en macrófagos mostró cómo, a pesar de que efectivamente existen múltiples sitios de fosforilación, ésta se produce de manera constitutiva de forma que el C/EBP β presente en la célula se encuentra totalmente activo y la fosforilación no parece determinar la activación de C/EBP β tras la llegada de un estímulo (Bradley et al, 2003).

En cuanto a C/EBP δ , aunque existen menos estudios al respecto, se ha visto que la fosforilación mediada por p38 podría afectar a su capacidad transactivadora (Svotelis et al, 2005).

Como hemos dicho anteriormente, la dimerización puede jugar un papel importante como mecanismo regulador debido a que determina tanto la actividad transactivadora de los C/EBPs como los genes que serán regulados por dichos dímeros. Así, se ha visto que los heterodímeros formados por las proteínas C/EBPs y los componentes de la familia CREB/ATF presentan una especificidad de unión diferente a la de los homodímeros de estas familias, de tal manera que activan la transcripción de genes diferentes porque no se unen a sitios C/EBPs. De la misma manera, se vio que los C/EBPs forman heterodímeros con los componentes de la familia NF-kB, y cuando esto ocurre se produce una potenciación de la unión a las secuencias C/EBPs frente a las secuencias kB (revisado por Schrem et al, 2004).

Este proceso regulador lo encontramos también en la propia dimerización entre componentes de la misma familia de C/EBPs. Así, se ha visto que durante la fase aguda, los dímeros formados por C/EBP α -C/EBP β son sustituidos por dímeros β - β o β - δ lo cual conlleva cambios en la expresión génica (revisado por Poli, 1998).

El estudio de estos factores de transcripción ha ido desvelando el papel clave que tienen en procesos como la proliferación y diferenciación celular, el metabolismo y la respuesta inflamatoria, especialmente en el tejido el adiposo, el hígado y en las células hematopoyéticas (Ramji et al, 2002), tejidos en los que se ha visto una mayor expresión (ver figura 19).

<u>C/EBPα</u>	<u>C/EBPβ</u>	<u>C/EBPδ</u>
Pulmón	Pulmón	Pulmón
Intestino	Intestino	Intestino
Hígado	Hígado	Hígado (fase aguda)
Tejido adiposo	Tejido adiposo	Tejido adiposo
Linfocitos y monocitos	Macrófagos y granulocitos	Macrófagos
Glándula adrenal	Bazo	
Placenta	Riñón	

Figura 19. Tejidos en los que se expresan C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ

Funciones

Diferenciación celular

Una de las funciones más estudiadas y conocidas de los C/EBPs es el papel clave que desarrollan durante la diferenciación celular en varios tipos celulares como adipocitos, hepatocitos o células mielomonocíticas entre otras. De hecho, la importancia de los C/EBPs en este proceso ha podido ser constatada gracias al estudio con ratones deficientes en estas proteínas, los cuales presentan un gran número de alteraciones fenotípicas tanto en el tejido adiposo como en el hepático.

Su importancia en la adipogénesis ha sido confirmada por numerosos estudios en lo que se ha visto un patrón de expresión diferencial entre C/EBP α , y C/EBP β y C/EBP δ , de tal manera que mientras que C/EBP β y C/EBP δ presentan una expresión elevada durante las primeras fases de diferenciación, ésta disminuye para dar paso a un aumento en los niveles de C/EBP α . Así, se ha visto que la expresión tanto de C/EBP β como C/EBP δ es necesaria para el inicio del programa de diferenciación en respuesta a un estímulo hormonal, por el cual los preadipocitos entran en el ciclo celular de forma sincrónica. Estos factores de transcripción inducen primero la expresión de PPAR γ , que permite que el proceso de diferenciación continúe y, más tarde, induce la expresión del propio C/EBP α , el cual presenta unos niveles máximos de expresión en las fases iniciales de diferenciación cuando, junto con PPAR γ , se encarga de activar la aparición de marcadores específicos como la GLUT4, la proteína de unión a ácidos grasos 422 (aP2) o la stearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1), promoviendo y manteniendo el

estado diferenciado (revisado por Ramji et al, 2002; Cao et al, 1991a; Akira et al, 1997).

Este patrón de expresión se repite en la diferenciación de los hepatocitos (Lekstrom-Himes et al, 1998) aunque varía en las células mieloides. En este caso, C/EBP α se asocia con los estados inmaduros, de tal manera que su expresión es elevada en los progenitores mieloides y disminuye durante las últimas fases de la diferenciación granulocítica. Contrariamente, los niveles de C/EBP β son muy reducidos en los mieloblastos y aumentan durante la diferenciación terminal de los macrófagos (revisado por Ramji et al, 2002).

Proliferación

C/EBP α se ha asociado a un papel inhibidor de la proliferación celular, de tal manera que diferentes trabajos muestran cómo la sobreexpresión de esta proteína produce una disminución de la proliferación celular mientras que se han encontrado mutaciones en el gen de C/EBP α en diferentes leucemias (Pabst et al, 2001).

Por el contrario, C/EBP β parece jugar un importante papel en promover la proliferación celular, de tal manera que se ha visto la presencia de niveles elevados de C/EBP β en diversos tumores (Sterneck et al, 2006; Zhou et al, 2001), así como una reducción significativa de la tumorigénesis de la piel en los ratones deficientes en C/EBP β presentan (Zhu et al, 2002).

Control del metabolismo

La importancia tanto de C/EBP α como de C/EBP β como reguladores del metabolismo se hace patente por el hecho de que estos factores de transcripción regulan la expresión de enzimas que son fundamentales en procesos como la gluconeogénesis y también en la detoxificación del amoníaco y la bilirrubina (revisado por Schrem et al, 2004).

Los ratones deficientes en C/EBP α presentan deficiencia de glicógeno, así como elevadas concentraciones de amonio en sangre, mientras que muchos de los ratones deficientes en C/EBP β mueren pronto tras el nacimiento debido a una hipoglucemia y a la incapacidad de movilizar sus reservas de glucógeno, y los que sobreviven, presentan un fenotipo con una acusada hipoglucemia, cantidades

reducidas de lípidos en sangre y una producción de glucosa y lípidos en respuesta a estimulación hormonal muy reducida (Ramji et al, 2002).

Inflamación

El papel de C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ durante diversos procesos proinflamatorios ha sido ampliamente constatado. Así, diferentes estímulos proinflamatorios como el lipopolisacárido (LPS) o diversas citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , la IL-6 o el TNF- α (revisado por Akira, 1997) son capaces de producir drásticos cambios en sus niveles de expresión en diversos tipos celulares como hepatocitos o macrófagos.

Un proceso en el que se ha caracterizado bien el papel de estos factores de transcripción es la respuesta de fase aguda, proceso inflamatorio que tiene lugar tras una infección o un daño tisular y que conlleva un gran número de cambios de expresión de las llamadas proteínas de fase aguda (APP), que se sintetizan principalmente en el hígado y que incluyen proteínas como el fibrinógeno, la proteína del complemento C3 o la proteína de suero A. Muchas de estas proteínas están reguladas mediante la unión a sus promotores tanto de C/EBP α como de C/EBP β y C/EBP δ (revisado por Schrem et al, 2004).

De forma similar a lo que ocurre durante la fase aguda, estos C/EBPs regulan la transcripción de genes muy importantes en la activación de los macrófagos, como aquellos que codifican citoquinas proinflamatorias como la IL-6, la IL-1 β , el TNF- α o la IL-12, quimioquinas como la IL-8 o la MCP-1, o proteínas muy importantes para la función de los macrófagos durante la respuesta inmune como la NOS-II, la lisozima, el G-CSF o la mieloperoxidasa (revisado por Poli, 1998; Bradley et al, 2003).

De forma similar a lo que sucede en la adipogénesis, durante la inflamación el patrón de expresión de C/EBP α es opuesto a los de C/EBP β y C/EBP δ , de forma que mientras que C/EBP α disminuye, los niveles de C/EBP β y C/EBP δ aumentan, con lo que los dímeros formados por C/EBP α son desplazados por aquellos compuestos por C/EBP β y C/EBP δ (Akira et al, 1990). Estos dímeros, una vez formados, pueden unirse a los sitios de unión C/EBP presentes en los promotores de los genes que regulan para activar su transcripción. En el caso de la respuesta de fase aguda, la disminución de C/EBP α

se atribuye al aumento de la isoforma LIP de C/EBP β , la cual produce un aumento de la degradación de C/EBP α , así como una inhibición de la transcripción del mismo (Schrem et al, 2004) (Ver figura 20).

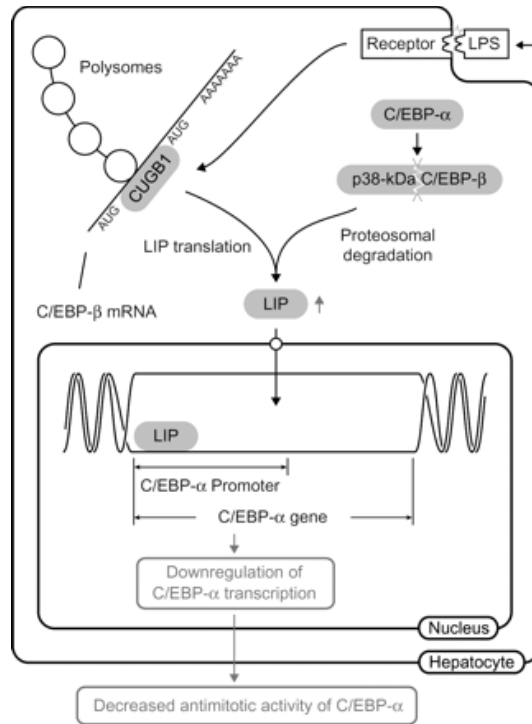


Figura 20. Regulación de C/EBP α por LIP (Schrem et al, 2004).

C/EBP β fue descrito por primera vez como un factor de transcripción inducido por IL-6 o IL-1 en células de hepatoma y de glioblastoma respectivamente (Nerlov et al, 1994; Nerlov et al, 1995). Estímulos proinflamatorios como IL-1, IL-6 y TNF- α producen un aumento tanto de los niveles de C/EBP β , como de su actividad de unión al ADN mediante diferentes mecanismos como su fosforilación y la fosforilación de otras proteínas como STAT3, la cual se une al promotor de C/EBP β activando su transcripción (Ver figura 21). Además, la importancia de C/EBP β en los procesos inflamatorios se ha hecho patente con el estudio de ratones deficientes de esta proteína, en los que se vio cómo se produce una disminución de mediadores proinflamatorios como la IL-12 o el NO frente a los ratones silvestres (Rahman et al, 2007).

La expresión de C/EBP δ en condiciones basales, como ya hemos comentado, es muy baja o inexistente. Sin embargo, como ocurre en el caso de C/EBP β , esta proteína se induce por diferentes estímulos proinflamatorios que incluyen IL-6, IL-1, TNF- α , epidermal growth factor, LPS o peptidoglicano (PGN).

Se ha visto que la aparición de dichos estímulos proinflamatorios promueve la activación de diferentes vías de señalización en células como los hepatocitos o los macrófagos, que finalmente inducen la unión de diversos factores de transcripción como Sp1, c-Rel, c-jun y STAT3 (revisado por Huang et al, 2007) al promotor de C/EBPδ.

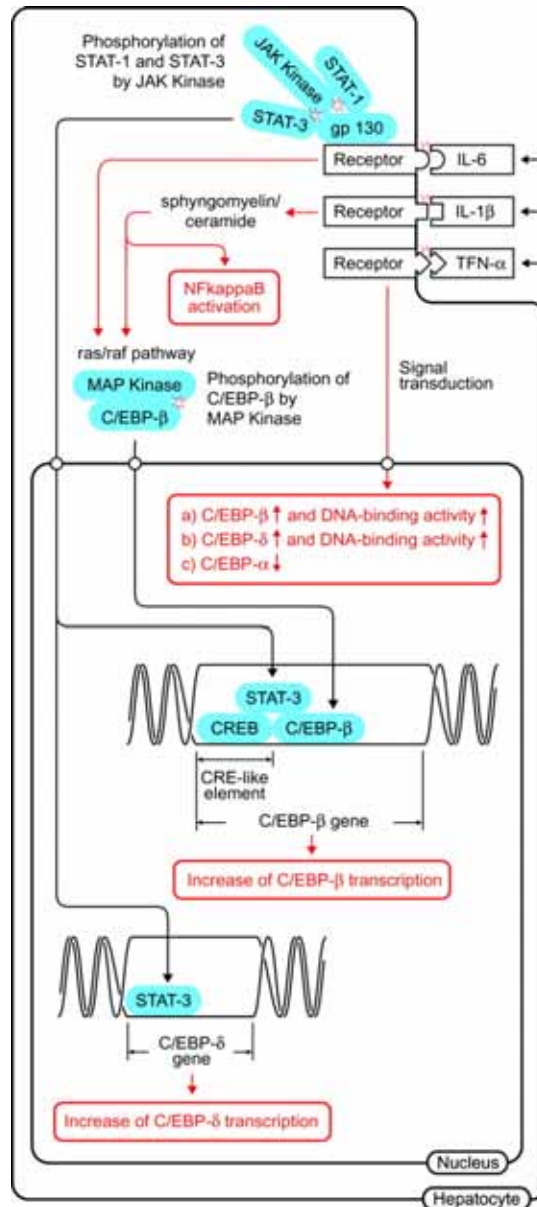


Figura 21. Regulación de C/EBPβ y C/EBPδ durante la respuesta de fase aguda (Schrem et al, 2004).

C/EBPα, C/EBPβ y C/EBPδ en el SNC

Aunque en los primeros estudios que se hicieron sobre la expresión de los C/EBPs en el SNC se vio que su expresión era muy escasa o nula (Xanthopoulos et al, 1991), han ido surgiendo trabajos que demuestran la presencia de estos tres

factores de transcripción en las células del SNC. Esto, junto con el hecho de que en otras células como los hepatocitos o los macrófagos tanto C/EBP α como C/EBP β y C/EBP δ regulan la transcripción de genes proinflamatorios, con un importante papel en la activación glial, sugiere que podrían ser piezas claves en este proceso.

C/EBP α

Hasta el momento, muy poco se sabe del papel de C/EBP α en el SNC, y parece que la expresión de C/EBP α se encuentra confinada a situaciones patológicas. Así, in vivo existen tres trabajos que documentan el aumento de C/EBP α en el SNC en diferentes situaciones en las que se produce una activación glial: tras el tratamiento con LPS (Saito et al, 1999) y también en cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Blalock et al, 2005) y en condiciones de hipoxia (Walton et al, 1998), aunque sólo éste último analiza en qué tipo celular se produce dicho aumento, que es la microglía activada.

In vitro, algunos autores muestran la expresión de C/EBP α en astrocitos (Cristiano et al, 2005), mientras que otros no lo ven (Yano et al, 1996). Sin embargo, sólo existe un trabajo in vitro que estudie la expresión de C/EBP α en microglía, en cual se indica que éste disminuye tras el tratamiento con péptido β -amiloide (Walker et al., 2006).

C/EBP β

En condiciones fisiológicas, diversos trabajos han demostrado el papel que C/EBP β puede jugar tanto en la creación de neuronas como en su funcionalidad. Así, se ha visto que C/EBP β induce la neurogénesis en detrimento de la gliogénesis de neuronas corticales (Menard et al, 2002; Sterneck et al, 1998; Paquin et al, 2005; Cortes-Canteli et al, 2002). C/EBP β se expresa en neuronas hipocámpales, donde juega un papel en los procesos de memoria a largo plazo (Yukawa et al, 1998b; Taubenfeld et al, 2001b; Taubenfeld et al, 2001a), y en el núcleo supraquiasmático, donde se le ha implicado en la regulación del ciclo circadiano (Zak et al, 2006).

En la activación glial el papel de C/EBP β puede ser clave, dado el hecho de que, como hemos dicho, C/EBP β es un activador de genes muy importantes en

diferentes procesos proinflamatorios que se encuentran alterados durante la activación glial, tales como TNF- α , IL-1 β , NOS-II o COX-2.

Así, varios trabajos realizados *in vitro* con la línea microglial BV2 muestran cómo C/EBP β se incrementa tras el tratamiento con estímulos como el LPS o el TNF- α , y participa en la inducción de la producción de mediadores proinflamatorios, como la NOS-II y la IL-12, (Dasgupta et al, 2005; Dasgupta et al, 2003; Jana et al, 2003; Jana et al, 2002; Jana et al, 2001). En los astrocitos activados también se ha visto que existe un incremento de C/EBP β , así como su posible papel en la regulación de proteínas como la C3 y la contrapsina, (Cardinaux et al, 2000), el citocromo P450 (Kelicen et al, 2004), el MCP-1 (Abraham et al, 2005) y la NOS-II (Jana et al, 2005).

Una prueba de cómo esta proteína puede estar involucrada en procesos neurotóxicos nos la ofrece el estudio con los ratones deficientes en C/EBP β , en los cuales se ha visto que producen una disminución de la reacción inflamatoria que se produce tras un proceso isquémico, de tal forma que en estos ratones tiene lugar una disminución de la muerte neuronal y del volumen de infarto frente a los ratones salvajes (Kapadia et al, 2006). Además, en un estudio en el que se analizaba la expresión de diferentes genes en cerebros de pacientes con Alzheimer, se vio cómo C/EBP β se encontraba entre aquellos que incrementaban más (Colangelo et al, 2002).

C/EBP δ

El papel de C/EBP δ en el SNC es el menos conocido, aunque existen algunos trabajos que lo asocian a la memoria a largo plazo como en el caso de C/EBP β (Taubenfeld et al, 2001b; Yukawa et al, 1998).

Además, se ha visto que, como ocurría en los macrófagos y hepatocitos en condiciones inflamatorias, su expresión se incrementa en astrocitos activados *in vitro* (Cardinaux et al, 2000) y también *in vivo* en cerebros de pacientes de Alzheimer (Li et al, 2004).

1.3. ACTIVACIÓN GLIAL EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

La inflamación en el SNC se erige cada vez más como uno de los componentes más importantes en muchas enfermedades neurodegenerativas debido al hecho de que durante este proceso se generan un amplio abanico de moléculas potencialmente neurotóxicas, muchas de las cuales ya se han explicado. El daño crónico que se produce en estas situaciones, junto con el envejecimiento normal, hace que los mecanismos defensivos de las neuronas se vean superados de tal manera que se produce una aceleración de la degeneración y de la muerte neuronal. A raíz de la observación de que en muchos casos la neurodegeneración viene causada en gran parte por la toxicidad o la aparición de proteínas mutantes no sólo en las neuronas, sino también en las células no neuronales, principalmente en la glía, surgió el concepto de enfermedades neurodegenerativas no dependientes de la célula propia (*non-cell-autonomous neurodegenerative disease*). Existen tres formas diferentes de implicación de la glía en dichas enfermedades (revisado por Lobsiger et al, 2007):

- La toxicidad dentro de las neuronas debido a la presencia de proteínas mutantes u otros estímulos, puede estimular una respuesta neurotóxica por parte de la glía, la cual no se ve afectada por dicha toxicidad.

- La presencia de una proteína mutada u otro estímulo tóxico puede afectar a la respuesta glial normal, amplificando el daño a la neurona.

- La presencia de una proteína mutada u otro estímulo tóxico puede afectar a la respuesta glial, de tal manera que la convierte en causa primera de daño a la neurona.

Las dos últimas posibilidades diferencian aquellas enfermedades en las se cree que existe un origen primario neuronal, como podría ocurrir en el caso de enfermedades como el Huntington, el Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica, y aquellas que se cree que presentan un origen glial seguido de una neurodegeneración secundaria, como podría ser el caso de la esclerosis múltiple.

1.3.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las principales causas de demencia entre la gente mayor, con una prevalencia que aumenta con la edad (hasta un 25-35% en la gente mayor de 85 años). Esta enfermedad, descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1906, se caracteriza por una pérdida gradual de la función cognitiva. El cerebro de los enfermos de EA presenta una atrofia macroscópica, sobretodo de las regiones implicadas en el aprendizaje y la memoria, incluyendo la corteza temporal, parietal y frontal, el hipocampo y la amígdala con una marcada muerte neuronal, principalmente de las neuronas acetilcolinérgicas.

En el parénquima cerebral de pacientes con EA se encuentran dos lesiones características: las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares. Mientras que las primeras están formadas principalmente por el péptido β -amiloide, generado a partir de la proteólisis de la proteína precursora del amiloide (APP) por parte de la β -secretasa y la γ -secretasa, los ovillos neurofibrilares son el resultado de la deposición intracelular de Tau hiperfosforilada, una proteína normalmente asociada a los microtúbulos de las neuronas.

La EA fue una de las primeras enfermedades asociadas a una posible neurotoxicidad de la activación glial (Yankner, 1989; Rogers et al, 1992; Rogers et al, 1990), con el péptido β -amiloide como uno de los principales estímulos proinflamatorios. En efecto, se ha demostrado que el péptido β -amiloide no sólo es tóxico de forma directa sobre las neuronas sino que su presencia potencia la muerte neuronal a través de la activación glial (Yankner, 1989; Yankner et al, 1989). Dicha activación es un evento que se da de forma temprana durante la EA, que tiene lugar antes de que se produzca la neurodegeneración. Incluso antes de la aparición de los síntomas ya se ve cómo astrocitos y microglía se agrupan entorno a las placas amiloides, con un aumento en la expresión de marcadores asociados a la activación glial, como el MHC II (Eikelenboom et al, 1982).

Se ha demostrado cómo el péptido β -amiloide puede desencadenar la activación glial de forma directa, mediante la unión a diferentes receptores de membrana, como el receptor scavenger RAGE (Yan et al, 1997) o el CD14 (Fassbender et al, 2004). Además, también puede activar las células gliales indirectamente, a través de la inducción de la vía clásica del complemento o del

aumento de restos neuronales producidos como consecuencia de los efectos tóxicos del mismo péptido (revisado por Akiyama et al, 2000; Wyss-Coray, 2006).

La activación glial producida de una u otra forma durante la EA tiene como objetivo eliminar el péptido β -amiloide. Sin embargo, múltiples estudios tanto con cerebros de pacientes de EA, como con modelos murinos de esta enfermedad, in vivo o in vitro, revelan cómo la continua presencia tanto del péptido como de mediadores y restos neuronales hacen que la activación se torne crónica, de tal manera que la glía activada produce de forma continua mediadores proinflamatorios entre los que se encuentran diferentes compuestos neurotóxicos, como el NO, el TNF- α o las ROS (revisado por Akiyama et al, 2000), que no hacen sino exacerbar la muerte neuronal, convirtiendo la activación glial como un proceso neurotóxico per sé.

Dicha hipótesis está respaldada por diferentes estudios epidemiológicos realizados sobre el papel beneficioso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que muestran que entre los mecanismos potenciales de acción, el de la inhibición de la respuesta inflamatoria se erige como uno de los más importantes para la disminución de la neurodegeneración (revisado por Wyss-Coray, 2006; Heneka et al, 2007e).

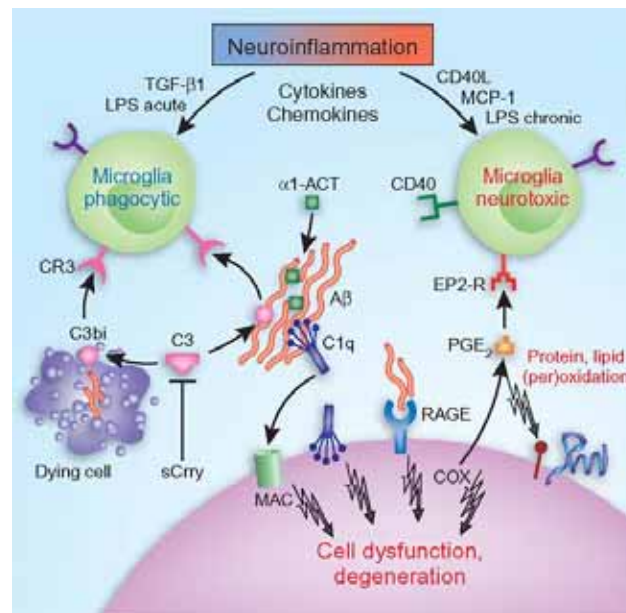


Figura 22. Activación microglial durante la EA (Wyss-Coray, 2006).

1.3.2. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP), descrita por primera vez por James Parkinson en 1917, afecta aproximadamente al 1% de la población de 55 años. Como ocurre en el caso de la EA, su prevalencia aumenta con la edad, de tal manera que se ha convertido en la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente tras la enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad se caracteriza por síntomas de disfunción motora como rigidez, temblores, movimientos lentos y pérdida del equilibrio entre otros (revisado por Dauer et al, 2003) debido a la pérdida del tracto nigrostriatal dopaminérgico ascendente, por la muerte mayoritaria de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra.

La enfermedad de Parkinson (EP), descrita por primera vez por James Parkinson en 1917, afecta al 1% de la población con 55 años, que es la edad media de inicio. Esta enfermedad es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente tras el Alzheimer, con una prevalencia queSu prevalencia, como ocurre en el caso de la EA, aumenta con la edad y constituye. Esta enfermedad se caracteriza por síntomas de disfunción motora como rigidez, temblores, movimientos lentos y pérdida del equilibrio entre otros, debido a la pérdida del tracto nigrostriatal dopaminérgico ascendente, por la muerte mayoritaria de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (revisado por Dauer et al, 2003).

A pesar de que el origen de esta enfermedad es aún desconocido, se ha demostrado que existen diferentes factores que podrían estar implicadas en la EP, como el estrés oxidativo, la acumulación de proteínas alteradas (α -sinucleína) o la excitotoxicidad, entre otros (revisado por Dauer et al, 2003). Además, existen muchos indicios que apuntan a que la activación glial puede jugar un papel importante en muchas de estas situaciones. Los cuerpos de Levy son unas intrusiones proteicas formadas por la proteína intracelular α -sinucleína, que se encuentran en los cuerpos neuronales. Dichas intrusiones son tóxicas para las neuronas no sólo de forma directa, sino también indirecta, ya que las neuronas dañadas liberan esta proteína, la cual produce a su vez la activación glial y la producción de radicales libres de oxígeno, principalmente por parte de la microglía. Además de la α -sinucleína, las neuronas dañadas también liberan otros factores como la metaloproteinasa de matriz-3 (MMP3) y la neuromelanina, que también inducen la activación glial (revisado por Block et al, 2007).

La importancia de la activación glial en la EP se ha demostrado mediante una gran cantidad de indicios, tales como el incremento de mediadores inflamatorios como el TNF- α , la IL-1 β , la IL-2, la IL-4, la IL-6 o el TGF- α y TGF- β en el parénquima o en el líquido cefalorraquídeo de enfermos de Parkinson. Además, se ha descrito la presencia de activación glial en todos los modelos animales de la EP que se utilizan, tales como la inyección cerebral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), la inyección de MPTP o la infusión de inhibidores del complejo I de la cadena respiratoria como la rotenona (revisado por Hirsch et al, 2005). Más aún, se ha visto que el tratamiento continuo con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) reduce el riesgo de padecer la enfermedad (Wahner et al, 2007).

De hecho, la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra se puede deber al hecho de que éstas son más vulnerables porque presentan una baja capacidad reductora (no tienen glutatión) y también por la elevada presencia de microglía en esta región comparada con otras, lo cual conllevaría unas concentraciones mayores de mediadores neurotóxicos y ROS en esta región frente a otras.

1.3.3. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) aparece en los primeros estadios adultos y en sus síntomas se incluyen parálisis, falta de coordinación, defectos visuales y defectos sensitivos. Esta enfermedad con frecuencia aparece como un episodio o ataque que dura días o semanas y que remite un tiempo que puede ser de meses a años. A nivel histopatológico la principal característica que encontramos en los pacientes de EM consiste en la pérdida de la mielina y la infiltración masiva de linfocitos T en las áreas de lesión del parénquima cerebral.

Aunque las causas son desconocidas, el estudio de pacientes de EM ha permitido inferir que tanto factores genéticos como ambientales contribuyen a la aparición de esta enfermedad (revisado por Agrawal et al, 2007b). Por otra parte, la utilización del modelo murino de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) ha permitido explorar la patología, que posee muchas similitudes con la humana, y los diferentes mecanismos que tienen lugar durante la misma.

La microglía puede jugar un papel clave tanto en el inicio como en las demás fases de la enfermedad. La infiltración de células T preactivadas al parénquima cerebral precede el inicio de la enfermedad clínica. Una vez en el parénquima, se produce la reestimulación de los linfocitos T, que tiene lugar gracias a la presentación del antígeno por parte de los macrófagos perivasculares y de la microglía del parénquima. Es necesario que la microglía se active para que se produzca el aumento de la capacidad presentadora de la microglía, lo cual tiene lugar gracias a la presencia de algún estímulo proinflamatorio, ya sea una señal “extraña” asociada al patógeno o una señal de “peligro” asociada al daño tisular. Así, diferentes trabajos han demostrado cómo las infecciones víricas y bacterianas son elementos que pueden inducir la EAE (Fearon, 1997; Goverman et al, 1993). De hecho, tanto el “ataque” inicial como la exacerbación de la EM se han relacionado con infecciones víricas y bacterianas (Talbot et al, 2001; Wolfson et al, 2002).

Los mismos linfocitos T secretan IFN γ , que promueve la expresión de moléculas coestimuladoras, necesarias para la presentación del antígeno, por parte de la microglía (Aloisi et al, 2000).

La presentación del antígeno produce una activación tanto de los linfocitos T como de la microglía, de tal manera que ambos tipos celulares producen una serie de mediadores proinflamatorios que median gran parte del daño que se produce durante la enfermedad como las citoquinas TNF- α , IL-1 o IL-12, diversas quimioquinas o la metaloproteinasa-9 (revisado por Agrawal et al, 2007b; Raivich et al, 2004). Además, se ha demostrado la importancia de la producción de NO, ya que los oligodendrocitos, aunque resistentes al NO, son, sin embargo, muy vulnerables al peroxinitrito (Mitrovic et al, 1996)).

Entre los agentes diseñados para el tratamiento de la EM que están dirigidos a la modulación de la respuesta inmune, encontramos agentes que inhiben diferentes aspectos de la activación microglial, como el IFN- β que regula los niveles de MMP, o la minociclina, que inhibe la activación glial (revisado por Agrawal et al, 2007b).

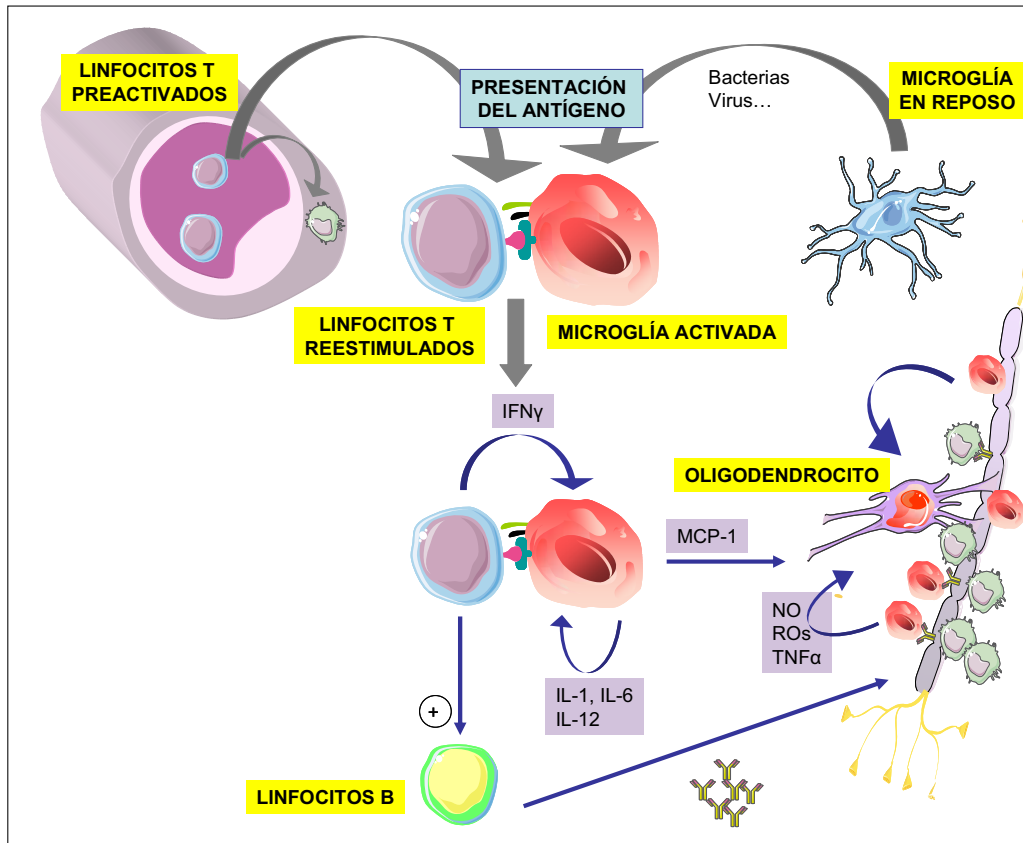


Figura 23. Esquema que representa el proceso propuesto durante la EM. Los linfocitos T preactivados entran en el parénquima cerebral, donde las células microgliales les presentan el antígeno. Una vez reestimulados, los linfocitos T pueden estimular la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, que contribuyen a la activación de la microglía. Por su parte, la microglía activada produce diferentes mediadores proinflamatorios que activan otras células microgliales y que pueden ser tóxicos para los oligodendrocitos.

1.3.4. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es la enfermedad más importante que afecta a las neuronas motoras. Esta enfermedad, descrita por primera vez por Jean Martin Charcot en 1869, se caracteriza por la degeneración progresiva de las motoneuronas, lo cual conlleva una parálisis progresiva de los músculos voluntarios, que acaba resultando letal para los enfermos.

Mientras un 10% de los casos presentan un origen genético (ELA familiar), la gran mayoría de los enfermos presentan ELA esporádica. Las causas de ésta última aún son desconocidas, y se barajan diferentes factores tales como infecciones latentes víricas y no víricas, toxinas y reacciones autoinmunes (Rowland et al, 1992; Cleveland et al, 2001).

Aunque existen mutaciones descritas de otros genes (revisado por Pasinelli et al, 2006; Boillee et al, 2006), el gen que aparece mutado con una mayor frecuencia es el gen de la superóxido dismutasa (SOD), que codifica una proteína citosólica encargada de convertir el superóxido en peróxido de hidrógeno. Existe un gran número de mutaciones descritas de este gen, y se ha visto que no existen diferencias clínicas entre los casos esporádicos y los que presentan mutaciones en SOD. Por ello, los modelos más utilizados para el estudio de esta enfermedad son aquellos basados en diferentes mutaciones de este gen.

Muchas evidencias han mostrado cómo las mutaciones de SOD conllevan, no la pérdida de su función detoxificadora, sino la ganancia de propiedades tóxicas (Bruijn et al, 1998). Dicha toxicidad afecta a gran número de funciones en la neurona como el metabolismo del ARN y ADN, la mitocondria o el transporte axonal (ver figura 24) (Boillee et al, 2006). Además, tanto en el parénquima de enfermos de ELA como en los modelos murinos existen agregados citoplasmáticos de SOD, cuya toxicidad aún no está claramente establecida (Bruijn et al, 1998). Se ha visto también que la forma de SOD extracelular mutante, secretada por las neuronas, constituye un potente activador microglial (Urushitani, 2006).

La ELA constituye uno de los ejemplos más claros de enfermedad no dependiente de la célula propia, a pesar de que hasta hace poco se había considerado una enfermedad que implicaba únicamente a las células neuronales. Los resultados de diferentes estudios con ratones quiméricos en los que se sobreexpresaba SOD mutada en las neuronas, la microglía o los astrocitos, indicaron la importancia de las células gliales en la enfermedad, ya que neuronas motoras con SOD1 mutada sobreviven más cuando las células gliales que les rodean son genéticamente normales, mientras que aquellas neuronas motoras genéticamente normales son dañadas por células gliales con la enzima SOD1 mutada (Clement et al, 2003). Así, estudios con ratones transgénicos sugieren que mientras que la expresión de SOD en la neurona es crítica para el inicio de la enfermedad, la progresión de la enfermedad viene determinada por la presencia de SOD mutada en la microglía y en la astrogía (revisado por Lobsiger et al, 2007; Pasinelli et al, 2006).

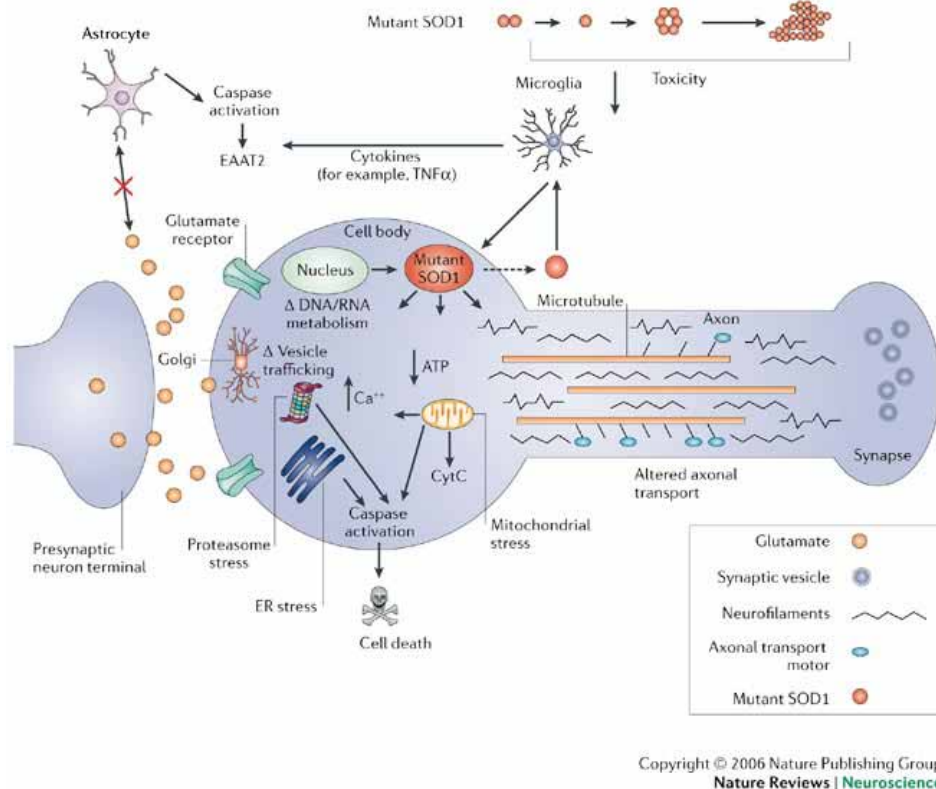


Figura 24. Funciones celulares afectadas por la proteína SOD mutante.

La activación glial y el aumento de factores proinflamatorios, son manifestaciones clínicas muy tempranas de la ELA, incluso anteriores a la aparición de neurodegeneración, tanto en el cerebro y en la médula espinal de pacientes como de diferentes modelos murinos de ELA (revisado por Boillee et al, 2006; Pasinelli et al, 2006).

Se barajan diferentes candidatos para la inducción de la toxicidad de las neuronas motoras, entre los que se encuentran diversos productos microgliales como el NO, el TNF- α o las ROS. Entre todos ellos parece que la producción de ROS por la NADPH oxidasa es el mayor candidato debido a que la depleción de su subunidad catalítica aumenta la supervivencia neuronal en ratones mutantes de SOD (Bruijn et al, 2004).

Además, los astrocitos activados disminuyen la recaptación de glutamato, lo cual es muy importante porque se ha visto que las motoneuronas son especialmente vulnerables a la muerte por excitotoxicidad, de tal forma que una activación continuada de los astrocitos comporta un aumento extracelular de la concentración de glutamato en el medio (revisado por Lobsiger et al, 2007).

2 OBJETIVOS

Como se ha comentado, la activación glial es un proceso, cuyo papel en diversas enfermedades degenerativas ha sido postulado en reiteradas ocasiones. Con el fin de conocer el posible papel de la familia de factores de transcripción C/EBP en la activación glial y su parte más neurotóxica, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el patrón de expresión de C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ en los astrocitos y la microglía en condiciones basales y durante la activación glial.
2. Estudiar el papel de C/EBP β en la regulación de mediadores proinflamatorios cuya expresión se incrementa durante la activación glial en diferentes enfermedades neurodegenerativas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 PRODUCTOS

PRODUCTO	CASA	Nº Ref.
Absolutely RNA RT-PCR'iprep	STRATAGENE	400800
Ácido fosfórico	Scharlan	1098
Acrilamida	BIO-RAD	161-0158
Agar	SIGMA	A1296
Agarosa	SIGMA	A9539
Ampicilina	SIGMA	k4000
Ara C	SIGMA	C-1768
Azul de Bromofenol	SIGMA	B-8026
Bisbenzimidida	SIGMA	B-1150
Bolas de agarosa unidas a estreptavidina	INVITROGEN	SA100-4
Bromuro de Etidio	SIGMA	E1510-10ML
Citrato sódico	SIGMA	S4641
Cloroformo:Isoamil 24:1	FLUKA	25666
Complete ^R	ROCHE	11 836 145
DMEM	GIBCO	31885-023
DMEM:F12	GIBCO	31330-038
DNasa	SIGMA	D-5025 (150000 units)
Donor Calf Serum (DCS)	GIBCO	16030-074
DTT (DITHIOTHREITOL)	SIGMA	D-9163
ECL Plus	AMERSHAM	RPN2132
EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid)	SIGMA	E-4884
EGTA	SIGMA	E-4378
Estándar de ADN	BIOLABS	N3200S
Estándar de proteína Rainbow	AMERSHAM	RPN800
Extracto de levadura	SIGMA	Y1625
Fungizona ^R	GIBCO	15290-018
Geneticina	GIBCO	10131-027
Glucosa	SIGMA	G-6152
Hepes	SIGMA	H-7006
Hoechst	SIGMA	
IFN γ	SIGMA	I-4777
Igepal CA-630 (nonidet)	SIGMA	I-3021
IL-1 β	SIGMA	I-5271
IL-6	SIGMA	I-9646
Inhibidor de RNasa	INVITROGEN	10777-019
Isopropanol	MERCK	109.634
KCl	SIGMA	P4504

Laminina	INVITROGEN	23017
Lipofectamina 2000	INVITROGEN	11668-027
LPS	SIGMA	L2654-1MG
M-CSF	SIGMA	M-9170
Membrana PVDF	Immobilon-P	IPVH00010
NaCl	SIGMA	S-9625
NaF	SIGMA	S-6521
N-naptylenediamina dihidroclorido	SIGMA	N-5889
Oligofectamina	INVITROGEN	12252-011
OptiMEM I	GIBCO	31985-047
Papel Whatman	Whatman International	3030335
PEG (polietilen glicol)	FLUKA	88276
Penicilina-Estreptomicina	GIBCO	15-140-148
Peptidoglicano	Fluka	77140
Peptona	SIGMA	P0556
Perfect Prep Gel Clean Up	EPPENDORF	0032 007.740
Perfect Prep Plasmid	EPPENDORF	0032 005.500
Placas ópticas para PCR a tiempo real	BIO-RAD	223-4441
PMSF	SIGMA	P-7626
poly (I:C)	SIGMA	P-0913
Proteína A- agarosa	SIGMA	P3476-1ML
PSA (Amonium Persulfate)	BIO-RAD	161-0700
Random primers	INVITROGEN	48190-011
RNasa	SIGMA	R5503
RNase away	INVITROGEN	10328-011
RNase Free DNase I, 5000U	STRATAGENE	50600032
RPMI	GIBCO	21875-034
SB203580	SIGMA	S-8307
SDS	BIO-RAD	161-0302
Sensiscript RT enzyme (50)	QIAGEN	205211
SP600125	Biomol International	EI-305
Sulfanilamida	SIGMA	S-9251
Suero bovino fetal (FBS)	GIBCO	10270-106
SYBR Green ^R (10ml)	BIO-RAD	170-8882
Tapas para placas de PCR a tiempo real	BIO-RAD	MSB1001
TEMED	BIO-RAD	161-0801
Thimerosal	SIGMA	T-8784
Tripsina	GIBCO	252000-072
Tris	BIO-RAD	161-0719
Tubulina	SIGMA	T4026
Tween 20	SIGMA	P-7949
U0126	SIGMA	U-120
Yoduro de propidio	SIGMA	P1304
Zeocina	INVITROGEN	R250-01

3.1.2 ANTICUERPOS

	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	ANIMAL OBTENCIÓN	WESTERN BLOT	Inmunocitoquímicas / Inmunofluorescencia
ANTICUERPOS PRIMARIOS					
Actina	SIGMA	A5060	conejo	1/2000	
C/EBP α	Sta. Cruz	sc-61	conejo	1/500	1/500
C/EBP β	Sta. Cruz	sc-150	conejo	1/500	1/1000
C/EBP δ	Sta. Cruz	C-22	conejo	1/500	1/2000
GFAP	SIGMA	G3893	ratón		1/1000
CD11b	Serotec	MCA711G clon 5C6	rata		1/500
Lamin B	Sta. Cruz	sc-6217	cabra	1/5000	
p21 ^{Cip1}	Pharmigen	556431	ratón	1/2000	
p36	Oriol Bachs		conejo	1/5000	
p65 (NF- κ B)	Sta. Cruz	sc-372G	cabra	1/500	1/500
Tubulina	SIGMA	T4026	ratón	1/100000	
iNOS	BD	610333	conejo	1/300	
ANTICUERPOS SECUNDARIOS					
anti-goat-HRP	SIGMA	A9452	ratón	1/2000	
anti-mouse biotinilado	VECTOR	BA-200	caballo	1/500	
anti-rabbit-HRP	Amersham	NA 934	mono	1/5000	
anti-rabbit biotinilado	Pierce	31820			1/1000
anti-mouse-HRP	Santa Cruz	sc-2055	cabra	1/5000	
Alexa 546-goat anti-rabbit	Molecular probes	11010	cabra		1/1000
Alexa 488-goat anti-mouse	Molecular probes	A11017	cabra		1/1000
Alexa 488-goat anti-rat	Molecular probes	A110006	cabra		1/1000

Alexa 350-goat anti-mouse	Molecular probes	A11068	cabra		
OTROS					
Alexa 488-labelled streptavidin	Molecular probes	S11223	cabra		1/500
Lectina del tomate	SIGMA	L0651			1/200
Extravidin-HRP	SIGMA	E2886		1/1000	1/500

3.1.3 PRIMERS

PRIMERS PCR	Función	Secuencia 5'-3'	Concentración de uso
A2A Forward (NeoF)	Genotipado	aga caa tcg gct gct ctg at	400nM
A2A Forward(A2AWTF)	Genotipado	agc cag ggg tta cat ctg tg	400nM
A2A Reverse (A2AWTF)	Genotipado	tac aga cag cct cga cat gtg	400nM
A2A Reverse (NeoR)	Genotipado	caa gct ctt cag caa tat cac g	400nM
ACTINF	PCR a tiempo real	caa cga gcg gtt ccg atg	300nM
ACTINR	PCR a tiempo real	gcc aca gga ttc cat acc ca	300nM
BGH reverse	Secuenciación pTER	tag aag gca cag tcg agg	?
C/EBP 4as	Genotipado	ggc agc tgc ttg aac aag ttc	400nM
C/EBP.1s	Genotipado	aag acg gtg gac aag ctg ag	800nM
CEBPαF1	PCR a tiempo real	gcg caa gag ccg aga taa ag	300nM
CEBPαF2	PCR a tiempo real	tgg aca aga aca gca acg agt ac	300nM
CEBPαR1	PCR a tiempo real	cgg tca ttg tca ctg gtc aac t	300nM
CEBPαR2	PCR a tiempo real	tgcgca ggc ggt cat t	300nM
CEBPβF	PCR a tiempo real	aag ctg agc gac gag tac aag a	300nM
CEBPβR	PCR a tiempo real	gtc agc tcc agc acc ttg tg	300nM
CEBPD-F	PCR a tiempo real	ctc cac gac tcc tgc cat gt	300nM
CEBPD-R	PCR a tiempo real	gaa gag gtc ggc gaa gag ttc	300nM
COX2F	PCR a tiempo real	gcc acc aac aat ggc aac a	300nM
COX2R	PCR a tiempo real	cgt acc gga tga gct gtg aat t	300nM
IL1BF	PCR a tiempo real	tgg tgt gtg acg ttc cca tta	300nM
IL1BR	PCR a tiempo real	cag cac gag gct ttt ttg ttg	300nM
IL6F	PCR a tiempo real	cca gag ata caa aga aat gat gg	300nM
IL6R	PCR a tiempo real	act cca gaa gac cag agg aaa t	300nM

iNOSF	PCR a tiempo real	ggc agc ctg tga gac ctt tg	300nM
iNOSR	PCR a tiempo real	gca ttg gaa gtg aag cgt ttc	300nM
MCSFrF	PCR a tiempo real	tcc acc ggg acg tag ca	300nM
MCSFrR	PCR a tiempo real	cca gtc caa agt ccc caa tct	300nM
Neo.2as	Genotipado	cat cag agc agc cga ttg tc	400nM
TLR4F1	PCR a tiempo real	tta ttc aga gcc gtt ggt gt	300nM
TLR4F2	PCR a tiempo real	cct ctg cct tca cta cag aga ctt t	300nM
TLR4R1	PCR a tiempo real	ctg cta aga agg cga tac aat	300nM
TLR4R2	PCR a tiempo real	tgt gga agc ctt cct gga tg	300nM
TNFaF	PCR a tiempo real	tga tcc gcg acg tgg aa	300nM
TNFaR	PCR a tiempo real	ttc cag aac tcc agg cgg t	300nM

3.1.4 ARN DE INTERFERENCIA: OLIGONUCLEÓTIDOS DE ARN DE CADENA CORTA

Nombre	Cadena Sense	Cadena antisense	Nº Ref.	Casa comercial
CEBPb A1	r(gua auc acc uua aag aug utt)d(TT)	r(aca ucu uua agg uga uua ctc)d(TT)		AMBION
CEBPb A2	r(ugc aau ccg gau caa acg utt)d(TT)	r(acg uuu gau ccg gau ugc atc)d(TT)		AMBION
CEBPb A3	r(gaa ccu uuu ccg uuu cga gtt)d(TT)	r(cuc gaa acg gaa aag guu ctc)d(TT)		AMBION
CEBPb D1	r(gag cga cga gua caa gau guu)d(TT)	r(cau cuu gua cuc guc gcu cuu)d(TT)		DHARMACON
CEBPb D2	r(ccu uua gac cca ugg aag uuu)d(TT)	r(acu ucc aug ggu cua aag guu)d(TT)		DHARMACON
CEBPb D3	r(gca ccc ugc gga acu ugu uuu)d(TT)	r(aac aag uuc cgc agg gug cuu)d(TT)		DHARMACON
CEBPb D4	r(acc ugg aga cgc agc aca auu)d(TT)	r(uug ugc ugc guc ucc agg uuu)d(TT)		DHARMACON
control (non-silencing)	r(uuc ucc gaa cgu guc acg u)d(TT)	r(acg uga cac guu cgg aga a)d(TT)	80-11310	XERAGON
control (non-silencing), Fluorescein	r(uuc ucc gaa cgu guc acg u)d(TT)	r(acg uga cac guu cgg aga a)d(TT)	80-11320	XERAGON
MAS	r(acc aug gaa gug gcc	r(cuu gua cuc guc gcu		ROCHE

	ac)d(TT)	cag c)d(TT)		
NFkB1-399	r(cag aug gcc cau acc uuc a)d(TT)	r(uga agg uau ggg cca ucu g)d(TT)		XERAGON
NFkB1-520	r(auc cua ccc aca ggu caa a)d(TT)	r(uuu gac cug ugg gua gga u)d(TT)		XERAGON
p21	r(cgg ugg aac uuu gac uuc g)dTdT	r(cga agu caa agu ucc acc g)dTdT	1024837	QIAGEN

3.1.5 ARN DE INTERFERENCIA: OLIGONUCLEÓTIDOS DE ADN PARA PLÁSMIDO PTER

C/EBPb 2	
sense	5' gatcccgtaggccaacttctactacgttcaagagacgtagtagaagttggccacttttggaaa 3'
antisense	5' agcttttcaaaaagtgccaacttctactacgtctcttgaacgtagtagaagttggccacgg 3'
C/EBPb 17	
sense	5' gatcccgtagcgacgagtagacaagttcaagagacttgactcgtcgcctcagcttttggaaa 3'
antisense	5' agcttttcaaaaagtgtagcgacgagtagacaagttccttgaacttgactcgtcgcctcagcgg 3'
C/EBPb 22	
sense	5' gatcccgccaagatgcgcaacctgttcaagagacaggttgcgcatcttggccttttggaaa 3'
antisense	5' agcttttcaaaaaggccaagatgcgcaacctgtctcttgaacaggttgcgcatcttggccgg 3'
C/EBPb 26	
sense	5' gatccccgagcggctgcagaagaagttcaagagacttctctgcagccgctcgttttggaaa 3'
antisense	5' agcttttcaaaaacgagcggctgcagaagaagttccttgaacttctctgcagccgctcggg 3'
C/EBPb 29	
sense	5' gatcccctgttcaagcagctgcccttcaagagagggcagctgcttgaacaagtttggaaa 3'
antisense	5' agcttttcaaaaactgttcaagcagctgccctcttgaaggcagctgcttgaacaaggg 3'

3.2 CULTIVOS CELULARES

3.2.1 CULTIVOS PRIMARIOS

3.2.1.1 CULTIVO PRIMARIO DE GLÍA MIXTA

Se utilizan crías de 1-2 días de ratón C57/BL6

Materiales

Reactivos

- Penicilina-Estreptomicina.
- Fungizona (=500x).
- Suero bovino fetal (=FBS).
- Tripsina.
- DMEM:F12 con glutamina y HEPES.
- DNasa (4mg/ml): se disuelve el stock en 10 ml de PBS estéril.

Fungible y pequeño material

- Herramientas de disección: pinzas con diente de ratón, pinzas curvadas finas para extraer la piel y cráneo), espátula, tijeras pequeñas (para cortar piel y cráneo) y tijeras grandes (para cortar la cabeza).
- Recipiente con Etanol 70% con papel celulosa.
- Placas de petri pequeñas (p30).
- Placas de cultivo necesarias.
- Bolsa basura.
- Botellas estériles:
 - o 1 de 250 ml para preparación de medio.
 - o 1 de 250 ml para preparar las células.
 - o 1 de 100 ml para tripsinización.
- Tubo de 50 ml con PBS estéril.
- Hielo.
- Filtro de malla de 105 μ m.

Preparativos previos:

- Calentar a 37° C el FBS, el DMEM:F12 y la tripsina.
- Poner a descongelar en la nevera la Penicilina-Estreptomicina, la fungizona y la DNasa.

Procedimiento**En la campana extractora del laboratorio (obtención del cerebro de los ratones):**

- Cortar la cabeza de las crías y diseccionar el cerebro eliminando el cerebelo y el cerebro medio.
- Poner la corteza en PBS frío y extraer las meninges con la ayuda de una lupa.
- Poner el tejido en una placa de Petri con PBS. Poner la placa sobre hielo.

En la campana de cultivos (campana de seguridad nivel 2)

- Cortar con las tijeritas el tejido en trozos pequeños y pasarlos a un tubo de 50 ml. Se pipetea un par de veces con la pipeta de 10ml.
- Centrifugar 3' a 1000 rpm (=200g)
- Eliminar el sobrenadante con pipeta y resuspender el sedimento mediante agitación manual en 12ml de tripsina-EDTA (Calculado para 7-8 crías: ajustarla según el número).
- Pasarlo a la botella estéril de 100 ml.
- Incubar 25' a 37° C con agitación (100 rpm). Durante este tiempo preparamos
 - o DFF10 (DMEM:F12 con 10% FCS, 1:1000 Penicilina/Estreptomicina y 1:500 Fungizona). Preparar aproximadamente 15 ml por cría.
 - o Solución STOP tripsina: 12ml DFF10 + 0,5 ml DNasa.
- Añadir los 12,5 ml de solución stop de tripsina (el mismo volumen que se ha añadido de tripsina).
- Mezclar por inversión, unas 10-12 veces hasta que se deshaga la masa viscosa y después pipetear 40-60 veces con pipeta de 10 ml hasta obtener una suspensión unicelular.
- Centrifugar 7' a 1000 rpm (200g).
- Sacar el sobrenadante lentamente con pipeta.
- Filtrar con filtros de malla de 105µm→ Mojar antes el filtro por una cara con medio y después girarlo.
- Contar las células con la cámara de Neubauer.

- Sembrar a 300000 céls/ml:
 - o Placas de 48 pocillos: 300 µl/pozo.
 - o Placas de 24 pocillos: 500 µl/pozo.
 - o Placas de 6 pocillos: 2,5 ml/ pozo .
- Cambiar el medio de cultivo a los 5 días del sembrado y después una vez a la semana.
- Realizar los experimentos 3 ó 4 semanas tras la siembra.

3.2.1.2 CULTIVO PRIMARIO DE GLÍA MIXTA A PARTIR DE UNA CRÍA

Materiales

Reactivos

- Tripsina.
- DFF10= DMEM:F12 + 10% de FBS.
- PBS estéril.

Fungible y pequeño material

- Herramientas de disección: pinzas con diente de ratón, pinzas curvadas finas para extraer la piel y cráneo), espátula, tijeras pequeñas (para cortar piel y cráneo) y tijeras grandes (para cortar la cabeza).
- Recipiente con Etanol 70% con papel celulosa.
- Placas de petri pequeñas (1 por cría).
- Placas de cultivo necesarias.
- Bolsa basura.
- Botella estéril de 250 ml para preparación de medio.
- Tubos eppendorf estériles.
- Tubo con PBS.
- Hielo.
- Botella T25 (1 por cada cría).

Preparativos previos:

- Calentar a 37° C el FBS, el DMEM:F12 y la tripsina.
- Poner a descongelar en la nevera la Penicilina/Estreptomicina, la fungizona y la DNasa.

- Poner la centrífuga a 4° C.

Procedimiento

- Cortar la cabeza y diseccionar la corteza, eliminando el cerebelo y el cerebro medio. Poner la corteza en PBS frío.

- Quitar las meninges y poner la corteza en un tubo eppendorf con 1 ml de PBS frío.

- Disgregar la corteza pipeteando 3 veces (no más) con pipeta de 1 ml.

- Centrifugar 3' a 1000 rpm (=200g).

- Eliminar el sobrenadante con pipeta y resuspender el sedimento en 1 ml de tripsina-EDTA por agitación manual (no con la pipeta, porque se genera una masa viscosa).

- Poner a agitar 10' a 37° C en agitador a 100 rpm (tubo eppendorf horizontal).

Durante estos 10' preparar:

- DFF10: DMEM:F12 + 10% FBS + 1:1000 Penicilina/Estreptomicina + 1:500 Fungizona.

- Solución STOP tripsina: 12ml DFF10 + 0,5 ml DNasa

- Pasar el tejido disgregado a tubos de 15 ml y añadir 1 ml de DFF10-DNasa a cada tubo.

- Mezclar por inversión (10-12 veces) hasta ver que se deshace la masa viscosa y, si es necesario, pipetear con pipeta de 1ml (5-10 veces) hasta obtener una suspensión unicelular.

- Centrifugar 7' 1000 rpm (=200g).

- Sacar el sobrenadante poco a poco.

- Añadir 6 ml de DFF10 al sedimento y homogeneizarlo con pipeta serológica de 5 ml.

- Sembrar los 6 ml en una T25.

Cultivos secundarios:

Cuando los cultivos primarios están maduros (aproximadamente a los 10-12 días tras la siembra) se tripsinizan y subcultivan:

- Lavar con DFF₀.

- Añadir 4 ml de tripsina-EDTA e incubar durante 5-8' a 37° C.

- Añadir 4 ml de DFF10.

- Recuperar el medio con las células y pasar a un tubo.

- Centrifugar 5' a 1000 rpm (200g).
- Resuspender el sedimento en 1 ml de DFF10.
- Contar en el hemocitómetro y preparar una suspensión de células a una concentración final de 166.000 células/ml
- Sembrar.

Estos cultivos secundarios alcanzan la confluencia a los 10-12 días aproximadamente, momento en el que se realizan los experimentos.

3.2.1.3 CULTIVO PRIMARIO ENRIQUECIDO DE MICROGLÍA

Los cultivos primarios de microglía se preparan a partir de cultivos mixtos (ver protocolo 3.2.1.1.). Se realiza el método descrito por nuestro laboratorio (Saura et al, 2003). Una vez los cultivos mixtos confluyan, esperar una semana para proceder a purificar la microglía mediante el método de tripsinización suave.

Materiales

- FBS.
- Tripsina diluida en DMEM:F12 en una proporción de 1:3.
- DMEM:F12 con glutamina y HEPES

Preparativos previos:

- Calentar a 37° C el DMEM:F12 + 10% FBS y la tripsina.
- Preparar la tripsina diluida.
- Poner a descongelar en la nevera la Penicilina/Estreptomomicina, la fungizona y la DNasa.

Procedimiento

- Recuperar el medio de cultivo (medio condicionado) de las células y ponerlo en un tubo estéril aparte.
- Lavar pocillos con DFF0 (=DMEM:F12 sin suero).
- Incubar las células a 37° C con la tripsina diluida durante 30', hasta que la capa de astrocitos se levante.
- Cuando la capa de astrocitos está totalmente levantada, añadir DMEM:F12+10% FBS para parar la actividad de la tripsina.

- Aspirar el medio (descartar la monocapa astroglial).
- Añadir el medio condicionado del paso 1.

Estos cultivos se utilizan al día siguiente del aislamiento de la microglía.

	Placa de 24 pocillos	Placa de 6 pocillos
Lavado en DFF0	500 μ l	1ml
Tripsina-EDTA + DFF0 (1+3)	500 μ l	2ml
Stop (DFF10)	500 μ l	1ml
Medio condicionado a añadir	400 μ l	2ml

3.2.1.4 CULTIVO PRIMARIO ENRIQUECIDO DE ASTROCITOS:

Las células se preparan igual que se hace en el caso de los cultivos mixtos primarios (ver protocolo 3.2.1.1.), pero se siembran en pozos que han sido recubiertos con laminina.

Materiales

- Laminina (stock de 1 μ g/ μ l).
- Ara C (stock de 4 mM).

Procedimiento

- Antes de realizar el cultivo se recubren los pocillos de las placas con laminina (20 μ M, diluir en PBS) durante 1 hora a Temperatura ambiente.

	Volumen laminina
Placas 48 pocillos	150 μ l
Placas 24 pocillos	200 μ l
Placas 6 pocillos	600 μ l

- Quitar la laminina 10' antes de sembrar las células.
- Cuando los astrocitos llegan a confluencia (tras 6-7 divisiones) se añade Ara-C (10 μ M).
- Mantener las células con Ara-C durante 4-5 días.
- Quitar el Ara-C (cambiando el medio) y realizar el experimento al día siguiente.

Con este método se consigue un cultivo de astrocitos con menos del 2% de células microgliales. Los astrocitos llegan a confluencia más rápidamente cuando hay laminina en los pocillos, y el Ara C inhibe el crecimiento posterior de la microglía.

3.2.1.5 CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN (MEFS)

Materiales

Reactivos

- Tripsina: se diluye con PBS hasta tener tripsina 2x (=tripsina 0,1%, la stock es 0,25%).
- DMEM10: DMEM con 10% de FCS/FBS.
- PBS estéril.

Fungible y pequeño material

- Alcohol 70°.
- 4 pinzas:
 - o pinzas para sacar embriones, separarlos y abrir la bolsa amniótica.
 - o pinzas para manejo del embrión.
- 2 tijeras:
 - o 1 para cortar la piel del abdomen.
 - o 1 para cortar la parte interna (opcional).
- Hojas de bisturí (1 para cada embrión).
- Placas de cultivo p-60 (2-3 placas/embrión) y p-100.
- Botellas de cultivo T25.
- Pipetas Pasteur de vidrio y de plástico estériles.
- Placas petri de 60 mm (=p60).

Preparativos previos

- Calentar a 37° C el FBS, el DMEM, el PBS y la tripsina.
- Poner a descongelar en la nevera la Penicilina-Estreptomicina.

Procedimiento

Los fibroblastos se obtienen a partir de embriones de 13,5 días de gestación, que corresponde al día 13 postcoito.

En la campana extractora del laboratorio (obtención de los embriones):

- Sacrificio de la hembra por desnucación.
- Limpiar el abdomen con alcohol 70° y hacer un corte superficial en forma de V.
- Se hace un corte más profundo para acceder a la cavidad abdominal del animal.
- Los embriones están bajo el intestino en los lados. Se ven unas hileras con bolitas, y estirando van saliendo todos los embriones de ese lado.
- Se ponen los embriones en PBS estéril a temperatura ambiente.

En la campana de cultivos:

- Poner los embriones con PBS nuevo (para que no se sequen) en una placa p-100.
- Separar los embriones y cada uno se pone en una placa p60.
- Sacar los embriones de los sacos amnióticos, cortar la cabeza con bisturí (1 bisturí/embrión) y quitar el hígado y los riñones (se puede poner en otra p60 tras sacarlos del saco amniótico).

- Poner la cabeza de cada cría en una nueva placa p60 con 1 ml de tripsina 2x en PBS (es importante numerar las placas para saber en qué orden se hacen, para el paso siguiente hacerlo en ese mismo orden).

- Disgregar bien con bisturí.
- Poner las placas inclinadas en el incubador a 37° C durante 45' (al colocar la primera placa, ponemos el temporizador a 45').

- A mitad de incubación (22') se sacan del incubador y se pipetea con un pipeta Pasteur estéril 15 o más veces para acabar de disgregarlos y homogeneizar el cultivo (se vuelve a meter al incubador).

- Poner 8-10 ml de medio/botella T75 o placa p100 (1 botella por cada placa p60).
- Tras la incubación, neutralizar la tripsina: se ponen 1-2ml de DMEM con suero/placa de medio. Se termina de homogeneizar si es necesario (si se ven muchos grumos).

- Pasar todo el volumen de cada placa a la botella en la que se había puesto el medio (se homogeneiza con un par de pipeteos).

- A **las 24 horas**, cambiar el medio de cultivo para eliminar las células no adheridas y restos de tejido. Como los fibroblastos son las primeras células en

adherirse, si se hace el proceso a primera hora de la mañana, se puede cambiar el medio a última hora de la tarde.

- A los dos días de la obtención, cuando las células estén confluyentes, se pasan a botellas T 150, con un volumen final de medio de 20 ml.

- Una vez las células han llegado a confluir, se pueden congelar, considerándose P0 (pase 0).

3.2.2 CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES

3.2.2.1 CULTIVO DE CÉLULAS NIH 3T3 (FIBROBLASTOS MURINOS)

Las células NIH 3T3 se tienen que sembrar cada 2-3 días, evitando que lleguen al 80 % de confluencia porque cuando son confluyentes se diferencian.

Material

Reactivos

- Tripsina: se diluye con PBS hasta tener tripsina 1x (=tripsina 0,05%, la stock es 0,25%).
- Glucosa: para hacer stock disolver 17,5 g/50 ml de DMEM y filtrarlo.
- DMEM + glucosa: el DMEM tiene 1000 mg/L. Para preparar DMEM 4500 mg/L se añaden 5 ml de la glucosa stock a la botella de 500 ml de DMEM.
- Penicilina-Estreptomicina (1000 x).
- Suero de ternera de donante (=DCS, para el NIH 3T3 no es aconsejable el FBS).
- PBS estéril.

Fungible y pequeño material

- Pipetas Pasteur de vidrio y de cultivos de plástico
- Botellas T75

Preparativos previos

- Calentar a 37° C el DCS, el DMEM, el PBS y la tripsina.
- Poner a descongelar en la nevera la Penicilina-Estreptomicina.

Procedimiento

- Aspirar el medio con pipeta Pasteur de vidrio.
- Lavar con PBS precalentado (que cubra, más o menos 10 ml) y tras 2' más o menos, se aspira.
- Tripsinizar con 1 ml de tripsina 1x (0,05 %). Se deja 1- 2' en el incubador (37° C).
- Añadir 9 ml de DMEM + DCS 10% para neutralizar la tripsina (volumen DMEM + DCS 10%: tripsina es 1:1).
- Sembrar las células: Poner 1-1,5 ml de NIH 3T3 tripsinizadas + 9-8,5 ml de DMEM + DCS en cada T75.

3.2.2.2 CULTIVO DE CÉLULAS BV2 (MICROGLÍA MURINA)

Las células BV2 fueron generadas por el laboratorio de Bistoni (Blasi et al, 1990b). Estas células crecen muy rápidamente, y necesitan un pase cada 2 ó 3 días. Cuando el medio se agota, se despegan del fondo y quedan flotando.

Material

Reactivos

- RPMI10: RPMI + 10% FBS + P/S (1:1000) + Fungizona (1:500).
- Penicilina-Estreptomicina (1000x).
- Fungizona (500x).
- FBS.

Fungible y pequeño material

- Pipetas Pasteur de vidrio.
- Botellas T25 o T75.

Procedimiento

- Aspirar el medio con pipeta Pasteur de vidrio.
- Se realiza un lavado con medio precalentado (que cubra, más o menos 10 ml).
- Añadir RPMI + 10% FBS.
- Pipetear con pipeteador eléctrico unas 10 veces para despegar las células del fondo. Las BV2 se despegan fácilmente, por lo que no es necesaria la tripsinización.
- Pasar volumen necesario para diluir 10 veces.

	T25	T75
Lavado (ml)	3	10
Resuspender (ml)	5	15
Volumen a pasar	0,5	1,5
Volumen final	5	15

3.3 TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

3.3.1 WESTERN BLOT

3.3.1.1 ELECTROFORESIS

Material

Reactivos

I. Soluciones para hacer el gel

- Solución 1 (0,75M Tris-HCl pH=8,8 y 0.2% SDS). Temperatura ambiente.
 - 18,2 g Tris (PM 121,1) en 200 ml agua destilada.
 - Ajustar pH a 8,8.
 - Añadir 0,4 g SDS.
- Solución 2 (30% acrilamida, 0.8% bis-acrilamida) a 4° C.
- Solución 3 (0.25M Tris-HCl pH 6.8, 0.2% SDS). Temperatura ambiente.
 - 6,1 g Tris en 200 ml agua destilada.
 - Ajustar pH a 6,8.
 - Añadir 0,4 g SDS.
- PSA 13%: 1,3 g/10 ml de agua destilada.
- Temed.
- Isopropanol.

II. Soluciones para la preparación de las muestras

- DTT 100 mM (-20° C).
- Tampón de carga 4x (-20° C).
 - 1,6 ml de tampón fosfato 0,5 M pH=7,0 (preparado mezclando NaH_2PO_4 0,5M y Na_2HPO_4 0,5 M).
 - 8ml glicerol.
 - 2 g SDS.
 - 13,3 mg de azul de bromofenol.
 - Enrasar a 20ml con agua.
- Tampón electrolito x10 (Temperatura ambiente). Para 1 L:

- 144,1 g glicina.
- 30,3 g tris.
- 10 g SDS.

Fungible y pequeño material

- Kit para hacer geles miniprotean (Bio-rad).
- Tubos de 50 ml.
- Tubo eppendorf (no hace falta autoclavarlos).
- Hielo.

Preparativos previos

- Encender *termoblock* y poner a 100° C.
- Poner a descongelar el DTT y el tampón de carga.
- Poner a descongelar las muestras en hielo.

Procedimiento

Preparar las muestras

- Mezclar 180 μ l de tampón de carga + 20 μ l de DTT (10%).
- Preparar las muestras:

Muestra	Muestra (μ l)	Tx4	H2O	Volumen Final
M1	A	X	0	A+X=V
M2	B	X	A-B	V
M3	C	X	A-B	V

...

- A, B y C son los volúmenes necesarios para cargar los μ g que se necesiten.
 - $A \geq B$ y C, y por eso se añade agua a las muestras M2 y M3, para tener el mismo volumen para cargar en el gel (es importante porque podrían correr diferente si los volúmenes son muy diferentes).
 - X es el volumen de Tx4 a añadir teniendo en cuenta que al diluirlo en el volumen final tiene que quedar a concentración 1x.
- Agujerear las tapas de los tubos eppendorf con una aguja.
 - 3' a 100° C en *termoblock*.
 - Centrifugar (pulso corto) para bajar las muestras.

Hacer el gel de electroforesis

- Capacidad de los pocillos del gel:

Peines	1mm	1,5mm
10 pozos	44 μ l	66 μ l
15 pozos	26 μ l	40 μ l

- Montar los cristales en el kit con la separación adecuada (1.0mm o 1.5mm).

- Comprobar que esté bien sellado poniendo agua en medio de los cristales y dejándolo un rato. Al comprobar que no pierde agua, vaciar por decantación y escurrir con un papel.

- Preparar el gel separador (resolving):

- Poner un tubo de 50 ml en hielo y añadir las soluciones según el porcentaje de acrilamida que se necesite:

	6%	7%	8%	10%	12%	15%
Solución 1 (ml)	5	5	5	5	5	5
Solución 2 (ml)	2	2,4	2,8	3,4	4	5
Agua (ml)	3	2.6	2.2	1.6	1	0

- Justo antes de ponerlo, añadir:
 - 14 μ l de TEMED.
 - 50 μ l de PSA 13%.
 - Mezclar con vórtex y decantar el tubo entre los dos cristales con cuidado, hasta que el líquido llegue a la marca verde (a 2 cm de la parte superior de los cristales).
 - Añadir 500 μ l de isopropanol.
 - Dejar polimerizar (15' aproximadamente).
- Preparar el gel concentrador (gel stacking):
- Sacar el isopropanol por decantación y escurrir con papel.
 - Poner un tubo de 15 ml en hielo y añadir:
 - 0,55 ml solución 2
 - 2,0 ml solución 3
 - 1,5 ml agua
 - Justo antes de ponerlo, añadir:
 - 20 μ l TEMED
 - 40 μ l PSA 13%
 - Mezclar con vórtex.

- Echar sobre el gel separador hasta alcanzar el borde superior de los cristales e inmediatamente poner el peine (Se saldrá parte del líquido. Cuidado no tocar la acrilamida líquida).

Este paso se tiene que hacer rápido para que los pozos estén limpios (para que el gel no polimerice antes de poner el peine).

- Dejar polimerizar (10-15').

Electroforesis

- Montar el gel en el electrodo y ponerlo dentro de la cubeta. Es importante ajustarlo bien para que la cámara interior quede sellada y no pierda líquido.

- Añadir tampón electrolito 1x primero en la cámara interior y luego por fuera, pero sólo hasta la mitad, para poder ver bien a la hora de cargar las muestras.

- Sacar el peine del gel y limpiar los pocillos pipeteando tampón electrolito con una pipeta de 1000µl. Este paso es importante para que quepa bien la muestra en los pocillos.

- Cargar las muestras cogiendo unos µl menos de los que se han preparado (se evapora siempre un poco).

- Cargar el estándar: 5 µl en geles de 12 y 15 %, y 10 µl en el resto (porque se ve peor cuando el gel tiene menos acrilamida).

- Acabar de llenar la cámara exterior de la cubeta.

- Correr el gel unos 80' a 120V (ir comprobándolo según lo rápido que se vea el frente de las muestras).

3.3.1.2 TRANSFERENCIA

Material

Reactivos

- Metanol
- Tampón de transferencia, 4° C (Glicina 0,192M; Tris 0,025M; SDS 2%; Metanol 20%). Para 4 L (enrasar con agua):
 - 57,68 g de Glicina.
 - 12,08 g de tris.
 - 0,8 g de SDS.
 - 800 ml de metanol.

Fungible y pequeño material

- Kit transferencia Bio-rad.
- Papel Whatman.
- Membrana PVDF.
- Imán y agitador.

Preparativos previos

- Mojar la membrana de PVDF 1' en metanol y pasarla a una cubeta con tampón de transferencia (1 por gel).
- Poner en tampón de transferencia el papel Whatman (2 por gel), esponjas (2 por gel).

Procedimiento

- Sacar el gel del kit de electroforesis, separando los cristales con cuidado.
- Poner el gel en tampón de transferencia junto con el papel Whatman, las esponjas y la membrana y dejar todo 10' a remojo.
- Montar el casete:
 - o Parte negra de plástico.
 - o Esponja 1.
 - o Papel Whatman 1.
 - o Gel.
 - o Membrana.
 - o Papel Whatman 2.
 - o Esponja 2.
 - o Parte transparente de plástico.
- Cerrar el casete y colocar en el electrodo.
- Poner el bloque de hielo y el imán.
- Llenar la cubeta con tampón de transferencia y ponerla en una bandeja con hielo y la bandeja sobre un agitador, de manera que durante toda la transferencia el tampón de transferencia se mantenga frío.
- 120' a 60v.
- Sacar la membrana del casete (comprobar que se ve bien el estándar).
- Ponerla 10'' en metanol y dejar secar sobre papel de filtro a temperatura ambiente. (15').
- Si no se hace el inmunoblot ese día, guardar a 4° C envuelta en papel de filtro.

3.3.1.3 INMUNOBLOT

Material

Reactivos

- TBS 10x (200mM Tris HCl pH=7.5; 1.5M NaCl) mirar para 5L. 4° C:
 - o 48.44 g Tris.
 - o Ajustar pH a 7,4-7,6.
 - o 175,32 g NaCl.
- TBS 1x: 500 ml de TBS 10x y enrasar a 5L con agua.
- TBS-T para 5L (enrasar con agua):
 - o 500 ml de TBS 10x
 - o 2,5 ml de Tween.
- TBS-T + leche 5% (dura 3 días): 2 g de leche en polvo en 40 ml de TBS-T.
- ECL plus (para revelar).

Procedimiento

- Añadir el anticuerpo primario a 4 ml de TBS-T + leche a la dilución necesaria en un tubo de 50 ml.
- Meter la membrana seca en el tubo con la cara de las proteínas hacia el interior.
- Incubar a 4° C rotando toda la noche o 1h a Temperatura ambiente.
- Preparar el anticuerpo secundario (como el primario) justo antes de que se acabe la incubación de la membrana en el primario.
- Lavar la membrana 2 x 10'' en TBS-T y meterla enseguida en el tubo con el anticuerpo secundario.
- 1h rotando a Temperatura ambiente.
- Lavar en TBS-T 1h o 1h 30' en una cubeta, en un agitador horizontal.

Revelar la membrana:

- Lavar la membrana 10' en TBS 1x.
- Sacar la membrana y ponerla en una cubeta.
- Incubar la membrana 5' con las soluciones de ECL (2 ml de solución A + 50 µl de solución B). Asegurarse de que las soluciones cubren la membrana (pipetear o agitar la cubeta).

- Poner la membrana envuelta entre dos trozos de transparencia y sacar el exceso de líquidos de ECL.
- Revelar en el sistema de imagen digital VersaDoc (Bio-rad) o revelar en film.
- Tras revelar:
 - o Lavar la membrana 10' en TBS 1x.
 - o 1' en metanol.
 - o Secarla 15' sobre un papel de filtro.
 - o Guardarla a 4° C o empezar otro inmunoblot.

3.3.1.4 STRIPPING DE LA MEMBRANA

El *stripping* se hace para volver a reprobar la membrana.

Material

Reactivos

- Tampón de *stripping* (100 mM β -mercaptoetanol, 62,5M SDS, pH= 6,7)
 - o Solución stock (para 1 L):
 - 62,5 ml de Tris 1M.
 - Ajustar pH a 6,7.
 - 2 g de SDS.
- TBS 1x (ver 3.1.1.).
- TBS-T (ver 3.1.1.).

Fungible y pequeño material

- Recipiente que cierre herméticamente y aguante 50° C.

Preparativos previos

- Añadir β -mercaptoetanol: 700 μ l/100 ml de tampón de *stripping* (100 ml de tampón / membrana).

Procedimiento

- Poner la membrana seca de PVDF 1' en metanol.
- Lavar 10' en TBS (agitando).
- Poner en un recipiente hermético 100 ml de tampón de *stripping* con β -mercaptoetanol e incubar en él la membrana durante 30' a 50° C con agitación.

- Lavar la membrana con grandes volúmenes de TBS-T (2 x 10').
- Lavar 5' en TBS.
- Lavar en Metanol 1'.
- Dejar secar 15'.

A partir de aquí ya se puede volver a hacer un inmunoblot normal (ver protocolo 3.1.3.3.).

Apreciaciones

Cantidad de pocillos utilizados:

- Para el Western Blot de proteínas nucleares se extrajeron proteínas de:
 - o Cultivos primarios: 2-3 pozos de una placa de 6 pocillos del cultivo mixto, 3-4 pozos del astroglial y 6 del microglial.
 - o BV2: 2 pozos de una placa de 6 pocillos.
- Para el Western de proteínas totales se extrajeron proteínas de:
 - o Cultivos primarios: 2 pozos de una placa de 24 pocillos del cultivo mixto, 3 pozos del astroglial y 4 del microglial.
 - o BV2: 2 pozos de una placa de 24 pocillos.

Cantidad de proteínas cargadas en el gel:

- Western Blot de C/EBPs, p65 y p21: se cargaron 15-20µg de proteínas nucleares.
- Western Blot de iNOS, COX-2: se cargaron 60-70µg de proteínas totales.

3.3.2 INMUNOCITOQUÍMICA

3.3.2.1 FIJACIÓN DE CÉLULAS

Material

Reactivos

- PBS 0,01 M.
- Paraformaldehído (PFA) 4%.
- Thimerosal.

Preparativos previos

- Preparar PBS-Thimerosal (dilución 1:1000 en PBS 0,01 M).

Procedimiento

- Aspirar el medio de cultivo.
- Lavar con PBS a Temperatura ambiente.

En la campana de extracción:

- Añadir PFA 4%.
- Incubar 20-30' a temperatura ambiente.
- Decantar el PFA 4%.
- 3 x 5' lavados con PBS en agitador horizontal.
- Poner PBS-Thimerosal y guardar a 4° C.

	Placa 48 pocillos	Placa 24 pocillos
Lavado PBS (µl)	300	500
PFA 4% (µl)	300	500
PBS-Thimerosal (µl)	300	500

3.3.2.2 INMUNOCITOQUÍMICA DE C/EBPS Y P65.**Material****Reactivos**

- PBS 0,01M.
- Metanol.
- H₂O₂ 30%.
- PBS-BSA 1% (-20° C).
- Normal Goat Serum (NGS).
- Diaminobenzidina DAB (100 mg/ml).

Preparativos previos

- Descongelar el PBS-BSA 1%.
- Preparar Metanol-H₂O₂ al 10% (1ml de H₂O₂ + 9 ml de metanol).
- Preparar PBS-Thimerosal (dilución 1:1000)

Procedimiento**DÍA 1:**

- 3 x 5' lavados PBS.
- 10' en H₂O₂ (30%) -Metanol.
- 3 x 5' lavados PBS.
- Durante los lavados se prepara la solución de bloqueo: PBS-BSA 1%-NGS 5%. El volumen a preparar dependerá del número de pocillos (ver tabla).
- Bloquear: 20' a temperatura ambiente con PBS-BSA 1%-NGS 10%.
- Incubar toda la noche con el anticuerpo primario a 4° C, en un agitador.
 - Volumen 150µl.
 - Disolvente PBS-BSA 1%-NGS 5%.
 - Dilución: ver tabla de anticuerpos.

	Pocillos placa 48
Lavados PBS	300µl
H2O2 -Metanol	300µl
Bloqueo	300µl
Anticuerpo primario	150µl

DÍA 2:

- 3 x 5' lavados PBS.
- Incubar 1h con el anticuerpo secundario a Temperatura ambiente., en un agitador.
 - Disolvente PBS-BSA 1%-NGS 1%.
 - Dilución: ver tabla de anticuerpos.
- 3 x 5' lavados PBS.
- Incubar 1h con la Extravidina-HRP secundario a Temperatura ambiente., en un agitador.
 - Disolvente PBS-BSA 1%.
 - Dilución: ver tabla de anticuerpos.
- 3 x 5' lavados PBS.
- DAB:
 - Preparar el DAB 1 mg/ml: 100µl DAB + 10µl H₂O₂ + 10 ml PBS.
 - Dejar 8'.

	Pocillos placa 48
Lavados PBS	300µl
Anticuerpo secundario	200µl
DAB	200µl
Bloqueo	300µl

- 3 x 5' lavados PBS.
- Dejar en PBS-Thimerosal.

3.3.2.3 INMUNOCITOQUÍMICA DE P21

Se tiene que hacer nada más fijar las células. Además, se tiene que hacer un paso adicional de permeabilización.

Material

Reactivos

- PBS 0,01M.
- Metanol.
- H₂O₂ 30%.
- PBS-BSA 1% (-20° C).
- PBS-Tritón 0,2% (Temperatura ambiente).
- Normal Goat Serum (NGS).
- DAB (100 mg/ml).

Preparativos previos

- Descongelar el PBS-BSA 1%.
- Preparar Metanol-H₂O₂ al 10% (1ml de H₂O₂ + 9 ml de metanol).
- Preparar PBS-Thimerosal (dilución 1:1000).

Procedimiento

Día 1:

- 3 x 5' lavados PBS.
- Permeabilización: 10' con PBS-Tritón 0,2%.
- 3 x 5' lavados PBS.
- 10' en H₂O₂ (30%) -Metanol.
- 3 x 5' lavados PBS.

- Durante los lavados se prepara la solución de bloqueo: PBS-BSA 1%-NGS 5%. El volumen a preparar dependerá del número de pocillos (ver tabla).
- Bloquear: 20' a temperatura ambiente. Con PBS-BSA 1%-NGS 10%.
- Incubar toda la noche con el anticuerpo primario a 4° C, en un agitador.
 - o Disolvente PBS-BSA 1%-NGS 5%.
 - o Dilución: ver tabla de anticuerpos.

	Pocillos placa 48
Lavados PBS	300µl
H2O2 -Metanol	300µl
Bloqueo	300µl
Anticuerpo primario	150µl

Día 2:

- Igual que en el protocolo 3.2.2.2., con la excepción de que el DAB se deja 5'.

3.3.2.4 DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA**Material****Reactivos**

- PBS 0,01M.
- PFA
- PBS-BSA 1% (-20° C).
- NGS.
- Anticuerpos primarios.
- Anticuerpos secundarios.

Preparativos previos

- Fijar las células (ver protocolo 3.3.2.1.).
- Descongelar el PBS-BSA 1%.

Procedimiento***Día 1:***

- 3 x 5' lavados PBS.
- Durante los lavados se prepara la solución de bloqueo: PBS-BSA 1%-NGS 5%. El volumen a preparar dependerá del número de pocillos (ver tabla).

- Bloquear: 20' a temperatura ambiente. Con PBS-BSA 1%-NGS 10%.
- Incubar toda la noche con una mezcla de los dos anticuerpos primarios. En este protocolo se trabajó mezclando un anticuerpo contra un factor de transcripción (C/EBP α , β o δ ; todos de conejo) con un anticuerpo marcador de tipo celular (GFAP, de ratón, o CD11b, de rata). Esta incubación se realiza a 4° C, en un agitador.
- Volumen 150 μ l.
 - o Disolvente PBS-BSA 1%-NGS 5%.
 - o Dilución: ver tabla de anticuerpos.

	Placa de 48 pocillos
Lavados PBS	300 μ l
H2O2 -Metanol	300 μ l
Bloqueo	300 μ l
Anticuerpo primario	150 μ l

Día 2:

- 3 x 5' lavados PBS.
- Incubar 1h con una mezcla de dos anticuerpos secundarios: anti-rabbit marcado con Alexa-546 mezclado con anti-mouse Alexa-488 o anti-rat Alexa-488 dependiendo de la mezcla de anticuerpos primarios usada. Esta incubación se realiza a temperatura ambiente, en un agitador.
- Disolvente PBS-BSA 1%-NGS 1%.
- Dilución: ver tabla de anticuerpos.
- 3 x 5' lavados PBS.

	Placa de 48 pocillos
Lavados PBS	300 μ l
Anticuerpo secundario	200 μ l

- Teñir los núcleos con Hoechst-33258 según el protocolo de 3.3.3.
- Dejar en PBS-Thimerosal.

3.3.2.5 INMUNOHISTOQUÍMICA DE C/EBPB

Para estudiar la expresión de C/EBP β en cortes de tejidos, se hicieron inmunofluorescencias dobles C/EBP β -GFAP y C/EBP β -CD11b.

Reactivos

- PBS 0,01M.
- Metanol.
- PBS-BSA 1% (-20° C).
- NGS.
- Solución Hoechst (100 ng/ml).
- Tritón.

Preparativos previos

- Preparar el tejido: congelar con nieve carbónica y cortar con criostato. Los cortes se guardan montados en portaobjetos a -20° C.
- Descongelar el PBS-BSA 1%.

Procedimiento

Día 1:

- Partimos de los cortes montados en portaobjetos.
- 3 x 5' lavados con PBS (2ml) en agitador.
- Bloqueo de uniones inespecíficas: 2h en PBS-BSA 1%-Tritón 0,2% + NGS 10%.

El suero tiene que ser de la misma especie donadora del anticuerpo secundario.

- Incubación con los anticuerpos primarios: en unos cortes se pusieron los anticuerpos anti C/EBP β junto con anti CD11b y en otros los anticuerpos anti C/EBP β junto con anti GFAP.

- o PBS-BSA 1% + NS 10% + anticuerpos primarios
- o Toda la noche a 4° C.

Día 2:

- 3x5' lavados en PBS-Tritón 0,5 %.
- Incubación con anticuerpos secundarios:

- o PBS-BSA 1% + NGS 10% + anticuerpo secundario.

A partir de este punto se tapan los cortes para evitar que les dé la luz y perder la señal fluorescente.

- 3 x 5' lavados en PBS-Tritón 0,5%.
- Tinción con Hoechst-33258 para marcar los núcleos:
 - o Incubar 5' en solución de Hoechst-33258 a 100 ng/ml.

- Montar cubreobjetos con Mowiol.
- Guardar a 4° C.

Apreciaciones

Para los experimentos de inmunohistoquímica se utilizaron:

- Para bloquear y diluir anticuerpos:
 - o NGS 10% (para los policlonales de conejo y el monoclonal de ratón).
- Anticuerpos primarios (ver referencia en apartado 1.2):
 - o Anti C/EBP β a 1/1000.
 - o Anti GFAP a 1/1000.
 - o Anti CD11b a 1/500.
- Anticuerpos secundarios (ver referencia en apartado 1.2):
 - o Goat anti-rabbit biotinilado alexa 546 a 1/1000.
 - o Goat anti-mouse biotinilado alexa 488 a 1/500.

3.3.3 TINCIÓN DE NÚCLEOS CON HOECHST-33258

3.3.3.1 FIJACIÓN DE CÉLULAS BV2 PARA TINCIÓN CON HOECHST-33258

Material

Reactivos

- PBS 0,01M.
- Metanol a -20° C.
- Thimerosal.

Fungible y pequeño material

- Placa a fijar.

Preparativos previos

- Preparar PBS-Thimerosal (dilución 1:1000).

Procedimiento

- Aspirar el medio de cultivo.

En campana de extracción:

- Añadir metanol (con mucho cuidado para evitar que las células se levanten).
- Incubar 7'.
- Decantar Metanol.
- 1 x 5' lavado con PBS en agitador horizontal.
- Poner PBS-Thimerosal y guardar a 4° C hasta que se tiñan las células.

	Placa 48 pocillos
Lavado PBS (µl)	300
Metanol	300
PBS-Thimerosal (µl)	300

3.3.3.2 TINCIÓN DE NÚCLEOS CON HOECHST-33258 (BV2 Y CULTIVOS PRIMARIOS)

Material

Reactivos

- PBS 0,01 M.
- Solución de Hoechst-33258 intermedia (1µg/ml): diluir la solución madre 1:10 en PBS 0,01M. La solución de Hoechst-33258 madre (1 mg/ml) se prepara diluyendo 1 mg de Bisbenzimidide (SIGMA B-1150) en 1 ml PBS 0,01M. (Tenerlas en la oscuridad para que no se pierda la fluorescencia).

Fungible y pequeño material

- Placa a teñir.

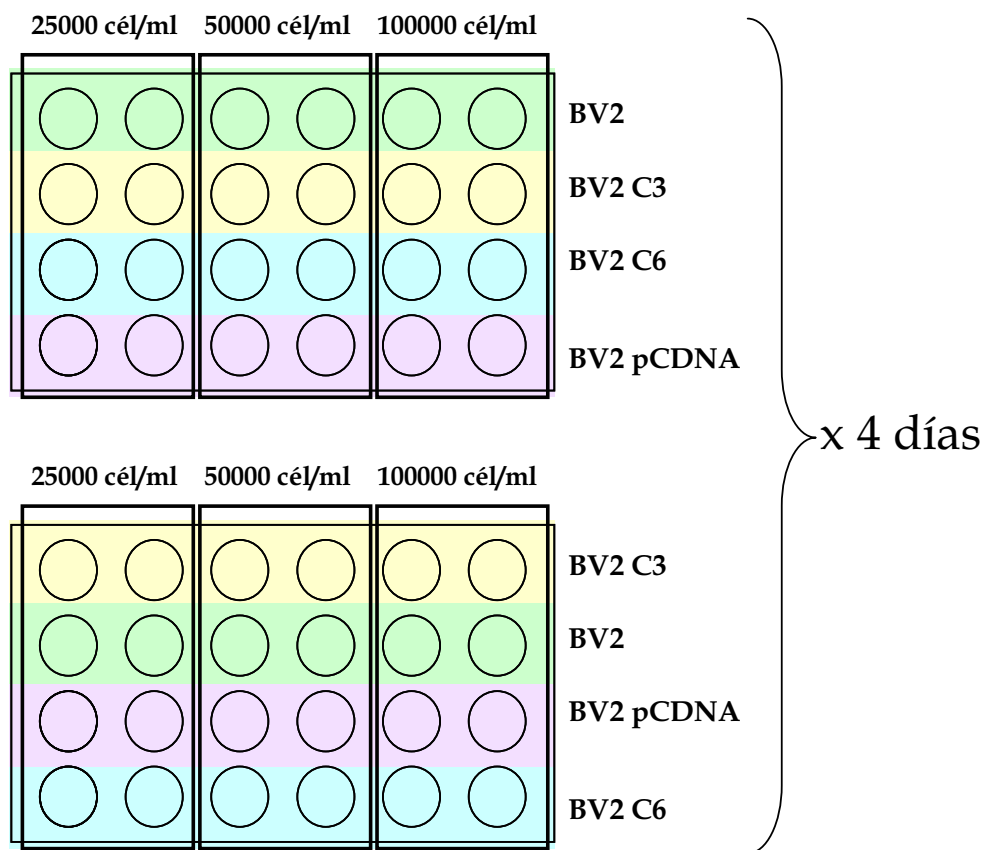
Procedimiento

- Aspirar el PBS-Thimerosal.
- Lavar con PBS 5'.
- Incubar 5' con Hoechst en agitador horizontal. A partir de este paso, tener la placa tapada para evitar que se pierda la fluorescencia del Hoechst-33258.
- 2 x PBS 5'
- Guardar en papel de aluminio la placa para que no pierda la señal fluorescente del Hoechst.

3.3.4.1 RECuento DE CÉLULAS BV2

Para los experimentos de proliferación se sembraron 2 placas por día de estudio de la proliferación (4 días) sembradas de forma diferente para evitar efectos en el crecimiento celular debidos a la posición en la placa.

Las células se fijaron de acuerdo al protocolo 3.3.3.1. y se tiñeron con Hoechst (protocolo 3.3.3.). Para el recuento se hicieron 4 fotos por pocillo y se contaron con el programa Image J.



3.3.5 ELISA

DIA 1. FIJAR EL ANTICUERPO DE CAPTURA A LA PLACA

Materiales

Reactivos

- PBS
- ELISA de TNF- α con Eli-Pair Diaclone kit (Rat TNF- α : 872.010)

Fungible y pequeño material

Placa 96 pocillos Maxisorp (Nunc 439454)(es muy importante que sea esta marca para que el anticuerpo no se fija al plástico).

Anticuerpo de captura.

Procedimiento

- Mezclar anticuerpo de captura con PBS.
- Ponemos 100 μ l de la mezcla en cada pozo.
- Incubar toda la noche a 4° C.

Pozos	Anticuerpo de captura (μ l)	PBS (ml)
100	100	10
80	80	8
60	60	6
40	40	4
...

DIA 2. BLOQUEO DE LA PLACA**Materiales****Reactivos**

- PBS-Tween 0,05% (n° pozos x 2 x 0,25ml)
- PBS-BSA 5% (n° pozos x 0,25ml) (preparado el mismo día).

Fungible y pequeño material

Placa 96 pocillos Maxisorp (Nunc 439454) (es muy importante que este tipo para que el anticuerpo se fije al plástico).

- Anticuerpo de captura.

Procedimiento

- 2 lavados de 10' con PBS-Tween 0,05% (250 μ l/pozo).
- 2-4 horas en PBS-BSA 5%, temperatura ambiente (250 μ l/pozo).
- Vaciamos los pozos y dejamos secar la placa toda la noche a temperatura ambiente, con un papel de filtro que deje que se evapore.

La placa preparada así se puede guardar 2 semanas a 4° C en atmósfera seca.

DIA 3. ELISA

Materiales

Reactivos

- PBS-BSA 1% (para estándar, muestras y anticuerpo de detección: 0,15 ml por pozo)
- PBS-Tween 0.05% (nº pozos x 6 x 0,25 ml).
- PBS-BSA 1%-Tween 0.1% (0,1 ml por pozo).
- Soluciones del kit: anticuerpo de detección, Streptavidina-HRP, TMB.
- Ácido sulfúrico 1M.

Procedimiento

- Preparación estándar: disolver el TNF- α liofilizado en 1,1 ml de solución cultivo-PBS-BSA (la misma solución que resulta de diluir las muestras, por ejemplo, si se diluyen las muestras 1/10 en PBS-BSA 1%, se diluye el estándar en medio de cultivo 1/10 en PBS-BSA 1%) (la concentración de TNF- α = 1000 pg/ml).

Se preparan diluciones sucesivas 1:1 en solución cultivo-PBS-BSA (1000, 500, 250, 125, 62, 31 y 0 pg/ml). Dejar un blanco (vol 250 μ l, haremos dos pozos con 100 μ l por pozo).

- Preparación de las muestras:
 - o Diluir las muestras en BSA-BSA 1%
 - o Dilución de las muestras (la glía mixta tratada con LPS si no se diluye mucho (1/40) se sale del rango del patrón. Con las células BV2, a 25000 céls/ml, LPS 100 ng/ml, hace falta diluir 1/10.
- Incluir un blanco con el medio de cultivo diluido igual a las muestras de PBS-BSA 1%.
- Ponemos los estándares y las muestras en la placa (100 μ l/pozo).
- Mezclamos el anticuerpo de detección y el PBS-BSA 1% (20 μ l anticuerpo de detección por 1 ml PBS-BSA 1%; 50 μ l por pozo).
- Ponemos 50 μ l de anticuerpo de detección diluido por pozo.
- 3 h a temperatura ambiente.
- Lavados con PBS-Tween 0,05 %
- 20' de Streptavidina-HRP (100 μ l/pozo). (2 μ l Streptavidina kit + 13ml PBS-BSA 1%-Tween 0.1%)

- 3 x 5min. Lavados con PBS-Tween 0,05 % (250 µl/pozo).
- Paramos la reacción con ácido sulfúrico 1M (100 µl/pozo) (diluir el ácido sulfúrico 97% 1:10 en agua).
- 15' a temperatura ambiente en solución TMB (kit) en la oscuridad (100µl/pozo) (sube el color azul).
- Leer a 450nm (referencia 620 nm).

3.3.6 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Materiales

Reactivos

I. Soluciones madre

- PBS estéril a 4° C
- KCl 1M (3,73 g/50ml) a 4°C.
- NaCl 4M (11,68 g/50ml) a 4°C.
- EDTA 0,5 M (3,72g (disodio)/20ml): Necesita un medio básico para disolverse por lo que se disuelve primero en un volumen reducido (5-10 ml) añadiendo NaOH (10N). Una vez disuelto se ajusta el pH a 8 con HCl concentrado (5N) y se lleva a un volumen final de 20 ml.
- EGTA 0,1 M (0,95 g/25 ml): Se disuelve como el EDTA, primero en solución básica y después se ajusta el pH a 8.

II. Soluciones de extracción:

Se preparan el día antes del experimento y duran 15 días.

- Tampón IP (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón 1%). Para 10 ml:
 - o Tris: 200 µl de stock 1M.
 - o NaCl: 250 µl de stock 4M.
 - o EDTA: 20 µl de stock 0,5M.
 - o EGTA: 100 µl stock 0,1M.
 - o Tritón: 10 µl.
 - o Ajustar el pH a 7,5

La concentración de NaCl es muy crítica, y depende de lo fuerte que sea la unión del dímero. Por eso, la primera vez que se hace es mejor probar una batería de concentraciones.

- Bolitas de proteína A-agarosa (Sigma #P2476-1ML).
- Tampón de carga (ver protocolo 3.3.1.).

Procedimiento

Día 1

- Preparación de las muestras:
 - o 500 μ l de tampón IP.
 - o 300 μ g de proteína nuclear (aproximadamente 300 μ l) (para extracción ver protocolo 3.6.6.).
 - o Normal rabbit serum: 10 % del volumen final
 - o 20 μ l de solución IP con 25% de proteína A-agarosa.

- Preparación del blanco: se prepara con lo mismos componentes que las muestras, excepto la proteína. En este caso se pone el volumen equivalente de agua al volumen puesto para las proteínas. El blanco sirve para reconocer la banda del anticuerpo en la membrana, y no confundirla con nuestra proteína.

- Incubar las muestras y el blanco a 4° C en agitación durante 30'.

- Centrifugar 5' a 3000 rpm.

- Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y añadir 5 μ g (2,5 μ l) de anticuerpo (anti C/EBP δ de conejo).

- Incubar a 4° C en agitación durante 2 horas.

- Añadir 20 μ l de 25 % proteína A-agarosa e incubar toda la noche a 4° C en agitación.

Día 2

- Lavar 3 veces con tampón IP:
 - o Poner 500 μ l.
 - o Centrifugar 5' a 3000 rpm
- Resuspender en 15 μ l de tampón de carga.

3.4 BIOLOGÍA MOLECULAR

3.4.1 GENOTIPADO DE RATONES

3.4.1.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO (GENOTIPADO)

OBTENCIÓN DE TEJIDO

Material

- Hielo.
- Bisturí.
- Tubos eppendorf autoclavados.
- Etanol.

Procedimiento

- Cortar la cola o el hígado con un bisturí y poner en un tubo eppendorf.
- Poner en hielo o nieve carbónica nada más cortarlo.
- Lavar el bisturí con etanol entre muestras (riesgo de contaminación de ADN).
- Se guarda a 4° C, -20° C ó -80° C dependiendo de si lo vamos a usar en el día, de un día para otro o de una semana para otra.

EXTRACCIÓN

Material

Reactivos

I. Soluciones madre

- Tris 1M.
- EDTA 0,5M: 18,6 g/100 ml. Primero se disuelve en un volumen reducido (20 ml) y se añade NaOH hasta que se disuelva. Una vez disuelto llevar a pH=8 con HCl 5N y enrasar a 100 ml con agua miliQ.
- NaCl 4M: 23,36 g/100 ml.
- SDS 10 %: 5 g/50 ml.

II. Soluciones de extracción

- Acetato Amónico 7,5 M: 28,90 g/50 ml (a temperatura ambiente).
- Etanol absoluto (-20° C).
- Etanol 70% (-20° C).
- Proteinasa K: 200 mg/ml (es la concentración de la solución comercial).
- SDS 10 %: 5 g/50 ml.
- Tampón de digestión (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 25 mM EDTA, SDS 0,5 %, Proteinasa K a 0,1 mg/ml, pH 8). Para preparar 100 ml:
 - o 1 ml de Tris 1M.
 - o 2,5 ml de NaCl 4M.
 - o 5 ml de EDTA del stock 0,5M.
 - o Ajustar a pH 8.

También se puede poner RNasa, para una mayor pureza de la muestra, pero para genotipar a partir de cola no hace falta (en hígado sí, porque hay más ARN y se puede inhibir la reacción de PCR).

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf autoclavados.

Preparativos previos

- Preparar el volumen necesario de tampón de digestión y añadir el SDS 10% y la proteinasa K:
 - o 400 µl de tampón de digestión por cola (20-25 mg).
 - o 1 ml de tampón: 50 µl SDS/1 ml de tampón.
 - o 5 µl Proteinasa K/1 ml de tampón.

Procedimiento

- Añadir 400 µl de tampón de digestión (con el SDS y la Proteinasa K) al tubo eppendorf con la cola.

- Incubar a 50° C 12-18 h (15h es lo óptimo) en *termoblock*. Si pasadas 15 h no vemos que el tejido se está disgregando bien, mezclamos con vórtex y en 1 ó 2 h más se disgregará bien.

- Añadir 1 volumen (igual al inicial, 400µl) de Cloroformo Isoamyl alcohol 24:1 y agitar suavemente.

- Centrifugar 10' a 1700g.

Si no se separan bien las 2 fases (acuosa y orgánica), añadir otro volumen de tampón de digestión sin proteinasa K y repetir la centrifugación. Si aparece una delgada interfase blanca repetir la extracción orgánica (se quita la fase acuosa y se añade = vol de Cloroformo a la acuosa que se ha quitado).

- Pasar FASE ACUOSA (arriba) a un tubo eppendorf nuevo (pipeteando con mucho cuidado).

- Añadir:

- ½ volumen de acetato amónico (stock 7,5 M).
- y un volumen (600 µl o 1,2ml) de Etanol 100% (-20° C).

- Mezclar con vórtex.

- Dejar toda la noche a -20° C (precipita el ADN).

- Centrifugar 2' a 1700 g (generalmente no se ve sedimento).

- Decantar Etanol absoluto por el lado contrario al del sedimento.

- Lavar el sedimento de ADN con 1 volumen de Etanol 70% (tener a -20° C):

- Añadir el etanol.
- Centrifugar 2' a 5000rpm (ó 5' a 1000 rpm si no se precipita bien).

- Decantar el etanol por el lado contrario al que está el sedimento y dejar escurrir en papel de filtro.

- Dejar hasta que se seque por completo (puede tardar incluso 2h).

- Resuspender el sedimento en TE o H₂O autoclavada en 100 µl para una cola.

- Cuantificar mediante gel de agarosa (para ver cantidad y calidad).

3.4.1.2 PCR DE GENOTIPADO DE RATONES DEFICIENTES EN C/EBPB

Material

Reactivos

- Taq polimerasa, con el tampón y el Mg²⁺
- MEZCLA dNTPs 2,5 mM.
- Primers 10 µM.
- Primers forward y reverse 10 µM.
- Agua estéril.

Fungible y pequeño material

- Puntas con filtros estériles.
- Agua autoclavada.
- Pipetas de PCR.

- Gradilla de PCR.
- Bandeja con hielo.
- Tubos eppendorf estériles de 1,5 ml y 0,2 ml.

Preparativos previos

- Dejar a descongelar las muestras de ADN y los componentes de la PCR (Tampón 10x, MgCl₂, *primers*, dNTPs), excepto la Taq.

Procedimiento

- Preparar la mezcla, pipeteando por este orden:
 - Agua.
 - Tampón 10x.
 - MgCl₂.
 - dNTPs.
 - *Primers*.
- Preparar las muestras:
 - Primero se pone el agua necesaria para ajustar el volumen a 10 μ l y después se pone la muestra.
 - Después se pone la cantidad de muestra que creamos necesaria (según imagen del gel de la extracción de ADN). Tener en cuenta que hay que preparar una muestra más: el blanco. En éste pondremos 10 μ l de agua después de poner el ADN en todas las demás (para comprobar que no se contaminan al pasar de una a otra).

	μ l/MUESTRA	CONC. STOCK	CONC. FINAL
10 x Tampón	3	10x	1x
d NTP	2,4	2,5 mM	1,5 mM
MgCl₂	0,75	50 mM	1,25 mM
Fprimer (CEBP. 1s)	2,4	10 μ M	0,8 μ M
Rprimer (CEBP. 4as)	1,2	10 μ M	0,4 μ M
Rprimer (CEBP. Neos)	1,2	10 μ M	0,4 μ M
Taq	0,15	5 U/ μ l	0,025 U/ μ l
Agua (20-resto)	20 - resto (no ADN)		
Muestra ADN	10		
TOTAL	30		

- Una vez preparadas las muestras en los tubos de PCR y la mezcla, añadir la Taq a la mezcla.

- Poner 20 μ l de la mezcla en cada tubo de PCR.

- Llevar al termociclador:

- 4' a 94° C.
- 35 ciclos de:
 - 1' 30'' a 94° C.
 - 1' 30'' a 59° C.
 - 1' 30'' a 72° C.
- 10' a 72° C.

Esperar a que la temperatura de la tapa esté a 100° C y la de la placa a 70° C antes de meter las muestras en el termociclador.

- Una vez terminada la PCR, correr un gel de agarosa:

- Añadir 6 μ l de Tx6 a los 30 μ l de muestra, y cargar 15 μ l en un gel de agarosa al 1,5 % (cargar 6 μ l del estándar).
- Correr el gel 45' a 90v.
 - Alelo mutante: 396bp
 - Alelo salvaje: 211bp

3.4.1.3 PCR DE GENOTIPADO DE RATONES DEFICIENTES EN A2A

El material y el procedimiento son iguales que en caso de C/EBP β , y sólo cambian la concentración de los componentes de la PCR y los ciclos.

	μ L/MUESTRA	CONC. STOCK	CONC. FINAL
10 x Tampón	3	10x	1x
d NTP	2,4	2,5 mM	1,5 mM
MgCl₂	0,75	50 mM	1,5 mM
Fprimer	0,6	10 μ M	0,4 μ M
Rprimer	0,6	10 μ M	0,4 μ M
Taq	0,15	<u>5 U/ μl</u>	<u>0,025 U/ μl</u>
Agua (20-resto)	20 - resto (no ADN)		
Muestra ADN	10 μ l		
TOTAL	30 μ l		

- Ciclos:
 - 2' a 94° C.
 - 40 ciclos de:
 - 1' a 94° C.
 - 20'' a 55° C.
 - 1 a 72° C.
 - 10' a 72° C.

Esperar a que la temperatura de la tapa esté a 100° C y la de la placa a 70° C antes de meter las muestras en el termociclador.

- Una vez terminada la PCR, correr un gel de agarosa:
 - Añadir 6µl de T_x6 a los 30 µl de muestra, y cargar 15µl en un gel de agarosa al 1 % (cargar 6µl del estándar).
 - Correr el gel 30' a 90v.
 - Alelo mutante: 618bp.
 - Alelo salvaje: 163bp.

3.4.2 GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS PTER

Para insertar los oligonucleótidos de ADN cuya transcripción dará lugar a los ARN de interferencia de horquilla, se siguieron una secuencia de pasos que incluían la amplificación de la cantidad de plásmido mediante la transformación de bacterias competentes, la digestión y desfosforilación del mismo, la ligación y finalmente la secuenciación.

3.4.2.1 GENERACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Material

Reactivos

- TSB (10% PEG, 5% DMSO, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄) (para 100ml):
 - LB (disolvente).
 - PEG de peso molecular 3350.
 - MgCl₂: 1 ml.
 - 10 mM MgSO₄: 0,24g (MgSO₄ · 7 H₂O pm:246,5).
 - Ajustar pH a 6,1.
- Guardar a 4° C.

- Agua estéril filtrada.

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf autoclavados.
- Asa de Digransky de siembra.
- Tubos para centrífuga Sorvall.
- Pipeta serológica estéril.

Otros

- Bacterias E. coli DH5 α .

Procedimiento

Día 1:

- Dejar descongelar en hielo un tubo eppendorf de células competentes.
- Sembrar en una placa de LB con el asa de Digransky toda la noche a 37° C.

Día 2:

- Picar una colonia e inocular en 5ml de LB e incubar 16h (toda la noche) a 37° C agitando a 250 rpm.

Día 3:

- Poner 1 ml del cultivo de 5 ml en 250 ml de LB y poner a crecer a 37° C y 250 rpm hasta que la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) se acerque a 0,6.
- Centrifugar los 250 ml a 6000g (Sorvall R-50, rotor GSA) 10'.

Bajo el mechero Bunsen:

- Con cuidado para que no se resuspenda, decantar el LB y dejar escurrir sobre un papel.
- Resuspender el sedimento con 25 ml de TSB a 4° C (1:10 del volumen inicial) con una pipeta serológica de 25 ml.
- Dejar 10' en hielo.
- Alicuotar en tubos preenfriados: poner 500 μ l/tubo eppendorf y poner el tubo eppendorf en baño de etanol/nieve carbónica.
- Guardar a -80° C.

3.4.2.2 TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE BACTERIAS

Material

Reactivos

- Placas LB + ampicilina.
- KCM (0,5M KCl, 0,15M de CaCl₂, 0,25M de MgCl₂) 4° C. Para 20ml:
 - o KCl: 1,86g.
 - o CaCl₂: 7,5ml de stock 1M.
 - o MgCl₂: 5ml de stock 1M.
 - o Filtrar con filtro de 0,22µm.
- Agua estéril filtrada. 4° C.

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf autoclavados.
- Asa de Digransky de siembra.

Procedimiento

- Dejar descongelar en hielo un tubo eppendorf de células competentes.
- En otro tubo eppendorf enfriado previamente poner:
 - o 20 µl de KCM
 - o 1µl de ADN plasmídico (mínimo de 0,1-1ng) o 5-10 µl de ligación
- Añadir 80 µl de agua filtrada.
- Pipetear 100 µl de células competentes en cada tubo eppendorf.
- Mezclar con golpecitos de dedo, y dejar 10' en hielo.
- Dejar a temperatura ambiente durante 5'.
- Sembrar 100 µl de LB en placas de agar + antibiótico (asa de Digransky).
- Una vez extendido, se dejar 10-15' en temperatura ambiente o 37° C hasta que se absorba el medio en el agar.
- Se gira la placa en el incubador y se deja toda la noche a 37° C.

3.4.2.3 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO (MINIPREP)

Material

Reactivos

- Kit eppendorf (eppendorf #0032 005.500).

Fungible y pequeño material

- Columnas y tubos eppendorf del kit.
- Tubos eppendorf autoclavados.
- Material para hacer gel de agarosa.
- Cubeta cuarzo y espectrofotómetro, para cuantificar.

Preparativos previos

- Crecer durante 16 horas bacterias con el plásmido a 37° C y agitando a 250 rpm.

Procedimiento

- Seguir el protocolo indicado por el fabricante.

3.4.2.4 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO (MAXIPREP)

Material

Reactivos (menos el LB, que se autoclava, hacerlos con agua milli Q)

- Placas LB + ampicilina
- LB
- P1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml de RNasa, pH 8), a 4° C.
 - o Tris.
 - o EDTA.
 - o RNasa.
- P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), a temperatura ambiente.
 - o NaOH
 - o SDS
- P3 (3 M KAc, pH 5,5) a 4° C:
- Fenol (SIGMA P4557-100 ml).
- PEG 13% (81268-250G SIGMA): 6,5 g en 50 ml m
- NaCl 5M: 14,61 g en 50 ml
- NaAc 3M, pH 5,5: 12,30 g en 50 ml de H₂O

Fungible y pequeño material

- Erlenmeyer 500 ml
- Tubos para centrífuga Sorvall de 250ml y de 35 ml.
- Mechero Bunsen.
- Filtros de malla 105µm.
- Tubos eppendorf autoclavados.

Preparativos previos

- Transformar bacterias DH5α con el plásmido.

Procedimiento***Día 1***

- Inocular una colonia en 250 ml de LB estéril con ampicilina 50µg/ml (bajo el Bunsen).

Día 2

- Pasar todo el volumen a un bote Sorvall de centrífuga.
- Centrifugar 15' a 8000 rpm (10000g) a 4° C (Centrífuga Sorvall, rotor GSA)
- Descartar el sobrenadante por decantación y escurrir en papel de celulosa (hacerlo enseguida para evitar que se resuspenda).
- Resuspender en 5 ml de P1 con pipeta de 1000 hasta que no queden grumos (no mezclar con vórtex).
- Añadir 5 ml de P2 y mezclar por inversión (10 vueltas).
- Añadir 5 ml de P3 con cuidado, para evitar que se hagan grumos pequeños: mezclar con una pipeta dando vueltas hasta que no se vea amarillo, sino grumos blancos.
- 10000 rpm 40' a 4° C (Sorvall, rotor GSA).
- Decantar el sobrenadante en un tubo muy limpio, en el que quepan unos 35 ml, filtrándolo con malla de 105 µm para evitar que pasen grumos.
- Añadir 0,7 volúmenes de isopropanol: 11 ml (0,7 vol de 15ml).
- 12000 rpm 30' a 4° C
- Secar sedimento. Puede estar 2h secándose boca abajo sobre un papel de celulosa y con papel de celulosa metido en el tubo (sin tocar el sedimento) para escurrir el isopropanol.
- Resuspender en 640 µl de TE agitándolo, pero sin pipetear, sino con mezclar con vórtex suave. Pasarlo a un tubo eppendorf de 2 ml autoclavado

- Centrifugar a máxima velocidad 5' a Temperatura ambiente.
- Añadir 160 µl de NaCl 5M (concentración final = 1M).
- Añadir 800 µl (1 vol) de PEG 8800 13 % (concentración final = 7,5 %).
- Incubar a 4° C más de una hora, en un agitador orbital o sin agitar. En este paso se puede estar toda la noche o todo el fin de semana.

Día 3

- Centrifugar 5' a máxima velocidad.
- Aspirar y resuspender en 800 µl de TE durante unos 20' mezclando con vórtex.

En la campana de extracción (el fenol es muy tóxico):

- Añadir 800 µl de Fenol-tris y mezclar con vórtex hasta verlo con aspecto lechoso.

- Centrifugar 10' a máxima velocidad.
- Rescatar la fase de arriba con pipeta de 200 µl con la punta cortada para evitar que suba la interfase (sobretudo, no arriesgarse a coger nada de la interfase).

- Añadir 800 µl de Cloroformo:Isoamyl 24:1 y mezclar con vórtex.

- Centrifugar 10' a máxima velocidad.

- Rescatar la fase de arriba con pipeta de 200 µl con la punta cortada para evitar que suba la interfase (sobretudo, no arriesgarse a coger nada de la interfase).

- Añadir 0,1 vol 3M NaAc pH=5,5 y mezclar bien (60 µl porque se recuperan alrededor de 600 µl).

- Añadir 2,5 vol de Etanol 100% (a -20° C) hasta llenar tubo eppendorf de 2 ml. En este punto se ve como se forman hilillos que son ADN.

- Incubar 2-3h a 4° C en agitación.
- Centrifugar 5' a máxima velocidad.
- Lavar con Etanol 70% y dejar secar 1-2h.
- Resuspender en TE (200 µl por ejemplo) y mezclar con vórtex.

3.4.2.5 DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO

Material

Reactivos

- Plásmido a digerir.
- Enzimas de restricción Bgl II y Hind III.
- Tampón de digestión.

Fungible y pequeño material

- Tubo eppendorf estériles

Preparativos previos

- Determinar qué tipo de digestión tenemos que hacer: Para introducir los oligonucleótidos para la producción de ARN de interferencia, cortar pTER con los enzimas Hind III y Bgl II.
- Determinar el mejor tampón para producir la digestión simultánea.
- Determinar el volumen de enzima a poner: la relación entre ADN a cortar y enzima de restricción es de 1 unidad de enzima/1µg de ADN.

Procedimiento

- Poner los componentes en un tubo eppendorf:
 - o 6µl pTER (=1µg) + 1µl de Bgl II + 1µl de HindIII + 2µl de Tampón (está a 10x y tiene que quedar a 1x) +10 µl H₂O
- Dejar a 37° C un mínimo de 1-2h para permitir que se digiera.

3.4.2.6 DESFOFORILACIÓN DEL PLÁSMIDO**Material****Reactivos**

- Plásmido digerido.
- Fosfatasa.
- Tampón de desfosforilación.

Fungible y pequeño material

- Tubo eppendorf estériles

Procedimiento

- Poner los componentes en un tubo eppendorf:
 - o 30 µl pTER digerido + 1µl de CIAP + + 5µl de Tampón (está a 10x y tiene que quedar a 1x) +14 µl H₂O
- 10' a 37° C.
- 15' a 85° C (para inactivar la fosfatasa).
- Ponerlo a 4° C.

Tras la desfosforilación se tiene que purificar otra vez el ADN, pero esta vez no hace falta hacer un gel de agarosa, sino que se sigue el mismo protocolo del Clean Up de tubo eppendorf poniendo directamente el Binding Buffer sobre el volumen de la desfosforilación (como si de la banda de agarosa cortada se tratara).

3.4.2.7 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO DEL GEL DE AGAROSA

Material

Reactivos

- Kit Clean Up de eppendorf (#0032 007.740).

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf estériles.
- Hojas de bisturí.

Preparativos previos

- Correr en un gel de agarosa el plásmido una vez digerido.
- Poner a 50° C el *termoblock*.

Procedimiento

- Cortar la banda con una hoja de bisturí, apurando lo máximo para no llevarnos demasiado gel y pasarla a un tubo eppendorf 1,5 ml (Se corta en la luz UV, pero no dejar mucho tiempo, porque el ADN se podría dañar).

- A partir de aquí seguir el protocolo del fabricante.

3.4.2.8 LIGACIÓN

Material

Reactivos

- Ligasa.
- Tampón de la ligasa (está a 5x) (stock a -20° C).
- Oligonucleótidos de ADN a introducir en el plásmido (inserto).

Fungible y pequeño material

- Tubo eppendorf estériles

Preparativos previos

- Correr en un gel de agarosa 5 μ l del plásmido tras la purificación de la desfosforilación para saber la calidad y cantidad del plásmido, lo cual es muy importante para saber la cantidad de plásmido a utilizar.
- Poner en hielo:
 - o Ligasa (stock a -20° C)
 - o Tampón de la ligasa (está a 5x) (stock a -20° C)
 - o Oligonucleótidos de ADN que queremos introducir en el plásmido (a -20° C): C/EBPb2, C/EBPb7, C/EBPb22, C/EBPb26, C/EBPb29.

Procedimiento

- Poner en un tubo eppendorf plásmido e inserto en una proporción molar de 1:4. Esto se averigua calculando los moles que hay más o menos a partir de la cantidad en nanogramos que extrapolemos del gel de agarosa.
 - o 2 μ l de plásmido pTER + 1 μ l del oligonucleótido + 1 μ l ligasa + 2 μ l tampón de la ligasa + 4 μ l H₂O
- Poner también un control negativo:
 - o 2 μ l de plásmido pTER + 1 μ l ligasa + 2 μ l tampón de la ligasa + 5 μ l H₂O (El tampón está a 5x, por eso hay que ajustar el volumen de tal manera que quede a 1x)
- Dejar 1-2h a 37° C (se pone en un termociclador de PCR).

3.4.2.9 PRECIPITACIÓN DE ADN PARA SECUENCIACIÓN**Material****Reactivos**

- Acetato sódico 3M.
- Etanol absoluto.

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf estériles.

Procedimiento

- Añadir:
 - o Acetato sódico hasta que represente 10% del volumen total.
 - o Etanol absoluto (3 volúmenes).
- Dejar precipitar el ADN a 4° C durante 2h.
- Centrifugar 10' a máxima velocidad.
- Eliminar sobrenadante por decantación.
- Lavar con Etanol 70%.
- Centrifugar 5' a máxima velocidad.
- Decantar y secar en un centrifugador de vacío.

3.4.2.10 SECUENCIACIÓN

Los plásmidos con inserto se han secuenciado con el primer BGH reverse en la casa "Sistemas Genómicos".

Transfección de BV2 con plásmidos

3.4.3 TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS

3.4.3.1 LINEARIZACIÓN DEL PLÁSMIDO

Con la linearización previa, cortamos el plásmido en un sitio que no afecta a nuestro inserto, y evitamos la linearización aleatoria dentro de la célula.

Material

Reactivos

- Plásmido a digerir.
- Enzimas de restricción Pvu I.
- Tampón de digestión.

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf estériles.

Preparativos previos

- Asegurarse de que hay un único sitio de corte para el enzima Pvu I.

Procedimiento

- Seguir mismo protocolo que 3.4.2.5.

3.4.3.2 TRANSFECCIÓN**Reactivos**

- Lipofectamina 2000.
- OptiMEM I.
- RPMI10 (RPMI+10% FBS + P/S)
- RPMI0 sin antibiótico.
- Placas de petri de 60 mm (= p60).

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf estériles.

Preparativos previos

- Linearización del plásmido
- Purificación del plásmido linearizado sin hacer gel, como el protocolo 3.4.2.7.
- Cuantificar ADN.

Procedimiento***Día 1***

- Sembrar BV2 a 100000 células /ml en RPMI10 en placas p60 (5ml).

Día 2

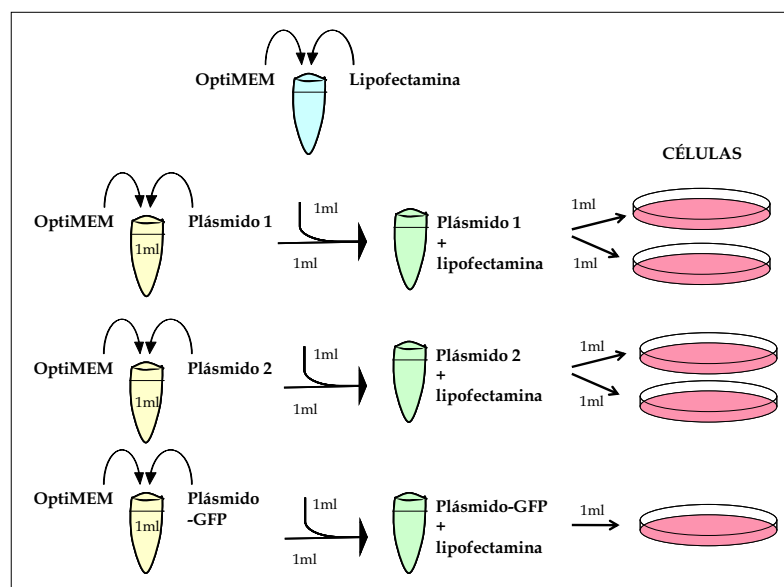
- Cambio de medio RPMI10.

Día 3

- Comprobar que la densidad de las células es, de al menos, el 80% y hacer proporción ADN:lipofectamina de 1:3.

- TUBO 1: mezclar Lipofectamina + OptiMEM I para placas totales:

- (8 μ l de lipofectamina + 492 μ l de OptiMEM I) x placas totales (=p60 con plásmido de interés (pCDNA o pTER) + placas con GFP).
- Dejar 5' a Temperatura ambiente..
- Preparar ADN + OptiMEM I:
 - TUBO 2a: mezcla plásmido de interés: (2 μ g de plásmido + volumen restante hasta 500 μ l de OptiMEM I) x placas con ese plásmido (=p60 con plásmido de interés).
 - TUBO 2b: mezcla plásmido GFP: (2 μ g de plásmido + volumen restante hasta 500 μ l de OptiMEM I) x placas con plásmido (=p60 con plásmido GFP).
- Poner Lipofectamina en tubos con los plásmidos:
 - Pasar del TUBO 1 a los TUBOS 2a y 2b: 500 μ l del MEZCLA x cada placa de cada condición.
- Incubar 25' a temperatura ambiente.
- Durante los 25' preparar las células:
 - Quitar medio de cultivo.
 - Lavar con RPMI10 sin antibiótico o sin suero.
 - Poner 1 ml de RPMI10 sin antibiótico.
- Poner 1 ml de DNA + lipofectamina (TUBOS 2a y 2b) en la placa que corresponda.
- Incubar 4h a 37° C.
- Quitar el medio de transfección y añadir RPMI10.



3.4.4 SELECCIÓN CLONAL

3.4.4.1 OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTIBIÓTICO DE SELECCIÓN

Material

Reactivos

- Zeocina
- Geneticina
- RPMI10 (=RPMI + FBS10%)

Trabajar tanto con la zeocina como con la geneticina con la luz de la campana apagada, ya que tanto la zeocina como la geneticina son fotosensibles.

Fungible y pequeño material

- Botellas T25.
- Placas de 24 pozos.

Preparativos previos

- Precalear el RPMI10 a 37° C.
- Preparar curva estándar de RPMI10 con concentraciones crecientes del antibiótico de selección (zeocina o geneticina) de forma que las concentraciones finales en los pozos de las placas de 24 pocillos sean: 37,5 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml. **Para ello se prepara medio con el antibiótico 5 veces más concentrado.**

Procedimiento

- Resuspender las células BV2 pipeteando con una pipeta serológica (10 veces).
- Sembrar 400 µl en pocillos de una placa de 24 pocillos a 100000 células/ml.
- Añadir 100 µl de RPMI10 con las diferentes concentraciones de antibiótico. Al diluir el medio con antibiótico, las concentraciones finales serán las mencionadas.

3.4.4.2 SELECCIÓN CLONAL

Las células BV2 se despegan fácilmente de la placa, por lo que tenemos que hacer una selección clonal adecuada a este hecho.

Material

Reactivos

- Zeocina o Geneticina.
- RPMI10 (=RPMI + FBS10%)

Trabajar tanto con la zeocina como con la geneticina con la luz de la campana apagada, ya que tanto la zeocina como la geneticina son fotosensibles.

Fungible y pequeño material

- Placas de 96 pocillos de cultivos.

Preparativos previos

- Precalear el RPMI10 a 37° C.
- Preparar el **medio de selección**:
 - o RPMI10 + Zeocina (transfección de pTER): 150µg/ml
 - o RPMI10 + Geneticina (transfección de pCDNA-LIP): 300µg/ml

Guardarlos a 4° C y trabajar con ellos con la luz de la campana apagada, ya que tanto la zeocina como la geneticina son fotosensibles.

Procedimiento

Día 1:

- Transfectar las células.

Día 3: DILUCIÓN INICIAL

- Aspirar el medio de cultivo.
- Añadir a la T25 5 ml de RPMI10 con el antibiótico de selección.
- Pipetear con pipeta serológica de 5 ó 10ml para despegar las células. (10 veces).
- Pasar 1ml a otra T25 y añadir 4 ml de medio de selección.

Día 5: DILUCIÓN CLONAL

- Aspirar el medio de cultivo.
- Añadir a la T25 3 ml de medio de selección.
- Pipetear con pipeta serológica de 5 ó 10 ml para despegar las células. (10 veces).
- Pasar 500 µl a una T25 nueva y añadir 4,5 ml de medio de selección.
- Pasar a un tubo estéril los 2,5 ml restantes y contar las células con un hemocitómetro.

- Diluir las células de manera que obtengamos finalmente 20 ml de células a una concentración de 0,7 células/100 µl en el medio de selección correspondiente.

- Sembrar 2 placas de 96 pocillos (100 µl/pozo).

Diluyendo de esta forma conseguimos que haya 0,7 células por pocillo de media en las placas sembradas, de tal forma que conseguiremos clones procedentes de una única célula, ya que en algunos pocillos sólo habrá una célula sembrada.

BOTELLAS T25 (DÍA 5 EN ADELANTE):

Mantener las T25 transfectadas como un “pool” de células transfectadas. En el caso del **plásmido control, utilizaremos este pool, y no un clon, para los experimentos**, para descartar diferencias por el lugar de integración del plásmido en el ADN de las células. Así, tenemos que mantenerlos en paralelo con la selección de los clones.

PLACAS 96 POCILLOS

Día 12:

- Mirar las placas de 96 pocillos 7 días tras la dilución clonal en un microscopio óptico para seleccionar los pocillos con una única colonia.

- Una vez seleccionados amplificar y comprobar la sobreexpresión (en el caso de pCDNA-LIP) o la disminución de C/EBPβ (en el caso de pTER):

- Llenar placas de 6 pozos con 2ml de medio de selección.
- Pasar los 100 µl del pocillo: Pipetear con la micropipeta los 100 µl y pasarlos a un pozo de las placas de 6 pozos.

Día 14: EXTRACCIÓN PROTEICA TOTAL

- Resuspender las células de las placas de 6 pozos y pasar 1,9 ml a un tubo eppendorf estéril, para la extracción total de la proteína.
- Añadir 2 ml de medio de selección a los pozos de las placas de 6 pozos. Estas placas servirán para seguir con el cultivo de los clones y para congelar parte (junto también con células del “pool”) y guardarlas en un tanque de nitrógeno líquido.
- Para la extracción de la proteína total de las células pasadas a los tubo eppendorf:
 - Centrifugar los tubos eppendorf 5’ a 200g.
 - Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento (son las células enteras) con PBS.
 - Añadir 100 µl de RIPA y sonicar (ver protocolo 3.6.1.).

Con los extractos proteicos se hace un Western Blot para ver qué clones nos interesan.

3.4.5 TRANSFECCIÓN DE CULTIVOS MIXTOS CON SIRNA

Material

Reactivos

- Oligonucleótidos de interferencia (siRNA) (concentración stock 2 μ M).
- Oligofectamina.
- OptiMEM I.

Fungible y pequeño material

- Tubo eppendorf RNasa free.
- Puntas RNasa free.

Preparativos previos

- Cambiar el día anterior el medio de cultivo.

Procedimiento

- Solución A: siRNA + OptiMEM I (volumen final por pocillo de placa de 24 = 50 μ l):

- o Tubo CONTROL (sin siRNA): 50 μ l de OptiMEM I x pocillos control.
- o Tubo NS (con siRNA non-silencing):
 - siRNA a 100 nM: (3 μ l + volumen restante hasta 50 μ l de OptiMEM I) x pocillos con siRNA.
 - siRNA a 10 nM: (0,3 μ l + volumen restante hasta 50 μ l de OptiMEM I) x pocillos con siRNA.
- o Tubo siRNA: mismo volumen que en el caso del siRNA non-silencing, pero poniendo el siRNA de la proteína a inhibir (p21 o C/EBP β en nuestro caso).

- Solución B: oligofectamina + OptiMEM I (15 μ l de volumen final por pocillo de placa de 24).

- o (2,4 μ l de oligofectamina + 12,6 μ l de OptiMEM I) x pocillos totales.
- o Dejar 5' a temperatura ambiente.

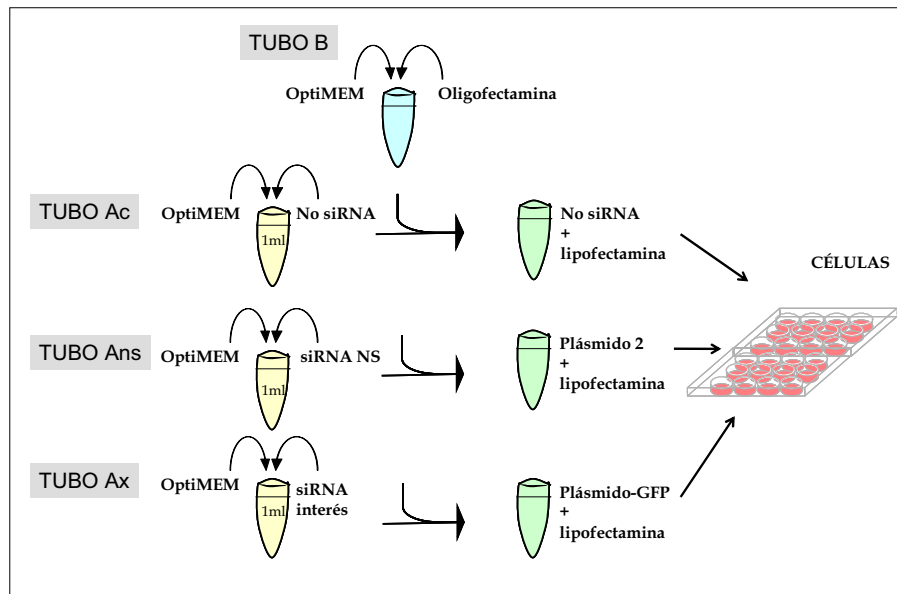
- Pasar volumen necesario de solución B a los tubos de solución A (15 μ l x pocillos de cada tubo A).

- Incubar 20-25' a Temperatura ambiente..

- Añadir a cada "tubo A" OptiMEM I: 35 μ l x pocillos de cada tubo A.

- Poner 100µl de los “tubos A” a los pocillos correspondientes.

A las 48 horas tras la transfección, ya se ve la disminución en los niveles proteicos, y se pueden hacer los experimentos.



3.4.6 PCR EN TIEMPO REAL

3.4.6.1 EXTRACCIÓN DE ARN

Para extracción del ARN de cultivo mixto se utilizan dos pocillos de una placa de 24 pocillos para cada condición.

Reactivos

- Kit de tubo eppendorf: Absolutely RNA RT-PCR miniprep.
- RNase Free DNase I, 5000U.
- Etanol 70% RNasa free: se prepara con etanol absoluto y agua RNasa-free.

Fungible y pequeño material

- Tubo eppendorf RNasa free.
- Puntas RNasa free (con filtro mejor).
- RNase away (para limpiar poyata y pipetas).

Preparativos previos

- Habilitar un sitio RNasa free.
- Rotular todos los tubos eppendorf necesarios para la extracción.
- Poner centrifuga a 4° C.

- Justo antes de ir a buscar la placa, preparar el tampón de lisis:
 - 1 pocillo de placa de 24 = 200µl
 - Añadir 7µl de β-mercaptoetanol por cada ml de tampón.
 - Poner el hielo.

Procedimiento

Se debe tener mucho cuidado porque el ARN se degrada muy fácilmente: cambiar los guantes frecuentemente y no tocar nada sin guantes.

- Sacar el medio de los pocillos.
- Añadir 200 µl/pocillo de tampón de lisis preparado previamente.
- Pipetear para ayudar a la lisis y pasar el tampón de los 2 pocillos a un tubo eppendorf.
- Añadir 1 volumen de etanol 70% (=400 µl).
- Mezclar con vórtex 5''.
- Pasar todo el volumen a una columna puesta previamente en un tubo eppendorf de 2 ml (en el kit).
- Centrifugar 60'' a velocidad máxima (4° C).
- Eliminar el filtrado y poner la columna en el mismo tubo.
- Tratamiento de DNasa:
 - Añadir 600µl de *1x Low-Salt Wash buffer*.
 - Centrifugar 2' a velocidad máxima (4° C).
 - Preparar la solución de DNasa: 50 µl de *DNase Digestion Buffer* + 5 µl de la DNasa RNasa-free reconstituida. Mezclar suavemente (no mezclar con vórtex, porque la DNasa se desnaturaliza con facilidad). **Poner en hielo.**
 - Poner 50 µl de solución directamente en la matriz de la columna.
 - Incubar las muestras a 37° C durante 15' en un incubador.
- Añadir 600 µl de *1x High-Salt Wash buffer*.
- Centrifugar 60'' a velocidad máxima (4° C).
- Eliminar el filtrado y poner la columna en el mismo tubo.
- Añadir 600 µl de *1x Low-Salt Wash buffer*.
- Centrifugar 60'' a velocidad máxima (4° C).
- Eliminar el filtrado y poner la columna en el mismo tubo.
- Añadir 300 µl de *1x Low-Salt Wash buffer*.

- Centrifugar 2' a velocidad máxima (4° C).
- Eliminar el filtrado y poner la columna en un **tubo eppendorf nuevo**.
- Añadir 30-100 µl de *Elution Buffer* previamente calentado a 60° C, directamente sobre la membrana de la columna.
- Incubar 2' a Temperatura ambiente.
- Centrifugar 60'' a velocidad máxima (4° C).

El ARN obtenido se diluye 1:10 para hacer la Reverse PCR: 5 µl del eluido + 45 µl de agua RNasa-free.

Guardar el ARN a -80° C.

3.4.6.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Reactivos

- Inhibidor de RNasa.
- Kit de Sensiscript RT enzyme (50) con: enzima, agua, dNTPs, tampón del enzima.
- *Primers aleatorios (Random primers).*

Fungible y pequeño material

- Tubo eppendorf RNasa free.
- Puntas RNasa free (con filtro mejor).
- RNase away (para limpiar poyata y pipetas).

Preparativos previos

- Habilitar un sitio RNasa free.
- Poner a descongelar

Procedimiento

- Poner en cada tubo eppendorf 10µl del ARN diluido 1:10.
- Hacer la MEZCLA (poner lo último el enzima):

	Concentración final	µl/muestras
10x RT Buffer	1x	2
RNase Inhibitor (40 units/ul)	0,5 U/ul	0,25
dNTP mezcla (5mM each dNTP)	0,5 mM	2
random hexamer (400ng/ul)	10 ng/µl	0,5
Sensiscript RT	0,05	1
Rnase free water	ajustar el volumen a 10	4,25
Muestra ARN	1,5 ng/ul	10
Volumen total	-	20

- Poner en el termociclador:
 - o 37° C 60'.
 - o 93° C 5' (para inactivar el enzima).
- Guardar el producto a -20° C hasta el momento de hacer la PCR a tiempo real

3.4.6.3 OPTIMIZACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL

La optimización de la PCR en tiempo real se utiliza para saber la eficiencia de los *primers* y la dilución de las muestras necesaria. Por eso se tiene que hacer con cada nuevo ARNm y también cuando las condiciones del cultivo son diferentes (cantidad, tipo de cultivo, etc.).

Reactivos

- Supemix SYBRGREEN (10ml).
- *Primers* para amplificar la proteína de interés (ver cuadro *primers*).
- *Primers* de normalizador (housekeeping): actina (ver cuadro *primers*).

Fungible y pequeño material (todo autoclavado)

- Tubos eppendorf.
- Puntas con filtro.
- Placas ópticas para PCR a tiempo real.
- Tapas para placas de PCR a tiempo real

Preparativos previos

- Dejar a descongelar los *primers* y las muestras.
- Hacer diluciones seriadas de las muestras de cDNA obtenido de la Reverse-PCR para hacer una curva estándar (empezar haciendo 6 puntos con un factor de dilución 1:5. Así tenemos 1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:1125).

- 30'' a 95° C
 - 1' a 60° C
 - 30'' a 72° C
 - 1' a 95° C
- Con la curva de amplificación de la curva estándar:
- Calcular la eficiencia de los *primers* con el software del termociclador.
 - Seleccionar la mejor dilución para utilizar con las muestras tratadas (lo mejor es la mayor dilución cuyo Ct esté entre 22 y 27).

3.4.6.4 PCR EN TIEMPO REAL DE LAS MUESTRAS

Reactivos

- Supermix SYBRGREEN (10ml).
- *Primers* para amplificar la proteína de interés (ver cuadro *primers*).
- *Primers* de normalizador (housekeeping): actina (ver cuadro *primers*).

Fungible y pequeño material (todo autoclavado)

- Tubos eppendorf.
- Puntas con filtro.
- Placas ópticas para PCR a tiempo real.
- Tapas para placas de PCR a tiempo real

Preparativos previos

- Dejar a descongelar los *primers* y las muestras.
- Hacer diluciones de las muestras necesarias (extrapoladas de la curva estándar).

Procedimiento

- Poner la placa en hielo.
- Hacer la mezcla: lo último que se pone es el SYBRGreen con el enzima (no dejarlo en la luz mucho rato).

n° muestras	x
n° de BLANCOS	1
n° de réplicas	3
total muestras sin margen	$Y = 3x (1 + x)$
muestras de margen (10%)	$Z = 10\% \text{ de } Y$
Total= muestras + margen	$Y + Z$

Mezcla de la PCR	Concentración final	µl/muestra
Agua	0	3,6
Primer Forward (10 µM)	300nM	0,45
Primer Reverse (10 µM)	300nM	0,45
2× Univ SYBR Green PCR Mmezcla (2x)	1x	7,5
cDNA		3

- Pipetear 3µl por triplicado de las muestras en cada pocillo (para el blanco pipetear agua).
- Pipetear 12µl de la MEZCLA del gen que corresponda en los pocillos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Blanco		Blanco								
B		M1		M1								
C		M2		M2								
D		M3		M3								
E		M4		M4								
F		M5		M5								
G		M6		M6								
H		M7		M7								
		Actina			COX-2							

- Llevar al termociclador y poner el programa que corresponde:
 - 10' a 95° C
 - 40 ciclos:
 - 30'' a 95° C
 - 1' a 60° C
 - 30'' a 72° C
 - 1' a 95° C
- Cuantificar con el programa del termociclador.

Apreciaciones

Se utilizaron 2 pocillos de una placa de 24 pozos para cada condición. Además, se hicieron 2 duplicados por condición (4 pocillos), que se trataron como muestras

independientes en todo momento: en la extracción del ARN, en la reverse PCR y en la PCR a tiempo real.

3.5 SAPA (STREPTAVIDIN AGAROSE PULLDOWN ASSAY)

Se utiliza el método descrito por el laboratorio del Dr. Wu (Wu, 2006b). Para realizar estos experimentos se necesita gran cantidad de proteína nuclear (400 µg por condición) que se extrae según el protocolo 3.6.5.

Material

Reactivos

- Bolas de agarosa unidas a estreptavidina (SA100-4 Invitrogen).
- Oligonucleótidos de DNA biotinilados e hibridados. Para hibridar los oligonucleótidos:
 - o Poner el mismo volumen de los oligonucleótidos *forward* y *reverse* 10 µM en un tubo eppendorf.
 - o Incubar 5' a 95° C en un *termoblock*.
 - o Sacar el bloque del *termoblock* y dejar enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente.
 - o Guardar los oligonucleótidos hibridados hasta su uso (-20° C).
- SOLUCIÓN B (ver protocolo de extracción proteica (protocolo 3.6.5)).

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf autoclavados.

Preparativos previos

- Junto antes de empezar, añadir a la solución B:
 - o Complete: 40 µl/ml de solución B.
 - o DTT (stock 200mM): 5 µl/ml de solución B.

Procedimiento

- Incubar durante 2h a Temperatura ambiente:
 - o 400µg de proteínas nucleares.
 - o 4µg de oligonucleótidos biotinilados.
- * COX-2:
 - COX-2 *normal* → 10µM= 0,12 µg/ul → 33ul= 4ug
 - COX-2 *mutado* → 10µM= 0,12 µg/ul → 33ul= 4ug

- 40µl de las bolas de agarosa con estreptavidina.
- Centrifugar 1' a 550 g.
- Lavar el sedimento 3 veces con 500 µl-1ml de solución B (no pipetear o hacer mezclar con vórtex).
- Resuspender en 40µl de Tx4.
- Incubar a 95 ° C para separar proteínas de las bolas de agarosa.
- Centrifugar 30'' a 7000g.
- Recoger el sobrenadante.

El sobrenadante servirá para hacer el Western.

Apreciaciones

Se sembraron 2 T75 de BV2 por condición (C, LPS) a 100000 cél/ml 48 horas antes del tratamiento.

- Secuencias de los oligonucleótidos del promotor de COX-2 con el motivo de unión C/EBP:

- COX-2 sin mutar:
 - COX-2 forward biotinilado: 5' BIO-ggttcttgcgcaactcact 3'
 - COX-2 reverse sin biotinilar: 5' agtgagttgcgcaagaacc 3'
- COX-2 mutado:
 - COX-2 forward biotinilado: 5' BIO-ggttcttgcgcaactcact 3'
 - COX-2 reverse sin biotinilar: 5' agtgagttgcgcaagaacc 3'

3.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

3.6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Material

Reactivos

- RIPA (para preparar 50 ml)
 - o 50 ml PBS
 - o 500 μ l Igepal
 - o 250 mg Na-deoxycholate
 - o 50 mg SDS
 - o 1 tableta de Complete
- PBS estéril frío

Procedimiento (placa y muestras en hielo durante todo el proceso)

- Aspirar medio.
- Lavar con PBS frío (no dejar mucho rato).
- Añadir RIPA (ver tabla).
- Rascar pocillo con rascador.
- Recuperar muestra y pasarla a tubo eppendorf.
- Sonicar 10 segundos en frecuencia de 0,8 y potencia mínima.
- Separar 5 μ l para cuantificación de proteínas.

	Placa 48 pocillos	Placa 24 pocillos	Placa 6 pocillos
Lavado (μl)	300	500	1000
Resuspender (μl)	40	50	150

3.6.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR (MÉTODO OSMÓTICO)

Material

Reactivos

III. Soluciones madre

- PBS estéril a 4° C
- KCl 1M (3,73 g/50ml) a 4°C
- NaCl 4M (11,68 g/50ml) a 4°C
- EDTA 0,5 M (3,72g (disodio)/20ml): Necesita un medio básico para disolverse por lo que se disuelve primero en un volumen reducido (5-10 ml) añadiendo NaOH (10N). Una vez disuelto se ajusta el pH a aproximadamente 8 con HCl concentrado (5N) y se lleva a un volumen final de 20 ml.
- EGTA 0,1 M (0,95 g/25 ml): Se disuelve como el EDTA, primero en solución básica y después se ajusta el pH a 8.
- PMSF 0,2 M (0,348 g PMSF / 10 ml Etanol) a 4° C: Mezclar muy bien antes de utilizar.
- DTT 0,2 M (0,154 g 5 ml de agua) a -20° C.
- Complete x 25 (1 pastilla/2 ml de agua milli Q).

IV. Soluciones de extracción:

Se preparan el día antes del experimento y duran 15 días.

- SOLUCIÓN A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA): es una solución hipotónica. Para preparar 40 ml:
 - 104 mg HEPES
 - 400 µl stock KCl 1M (7,46 g/100 ml).
 - 8 µl de EDTA 0,5 M.
 - 40 µl de EGTA 0,1M stock.
 - Enrasar con agua milliQ a 40 ml.
 - Ajustar pH a 7,9.
 - Filtrar con filtro Millipore 0,22µm y guardar a 4°C.

- SOLUCIÓN C (20 mM HEPES, pH 7,9, 0,4M NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA): es una solución hipertónica. Para preparar 20 ml:
 - o 104 mg HEPES
 - o 2 ml stock NaCl 4 M.
 - o 40 µl stock EDTA 0,5 M.
 - o 200 µl stock EGTA 0,1 M.
 - o Enrasar con agua milliQ a 40 ml.
 - o Ajustar pH a 7,9.
 - o Filtrar con filtro Millipore 0,22 µm y guardar a 4°C.

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf estériles.
- Rascador de células.

Preparativos previos

- Preparar los volúmenes de soluciones de extracción necesarios y añadir inhibidores de proteasas a las soluciones A, C y PBS. Para saber el volumen, se tiene en cuenta el número de muestras para las soluciones A y C, y el número de pocillos para el PBS. En el caso de la solución A se tiene en cuenta, además, el volumen de solución A +Igepal (se prepara a partir de la solución A ya con los inhibidores):

SOLUCIÓN A	400 µl/muestra
SOLUCIÓN A + IGEPAL	25 µl/muestra
SOLUCIÓN C	30 µl/muestra
PBS-complete	300 µl/pocillo de placa de 6 pocillos
PBS	1 ml/pocillo de placa de 6 pocillos

Cantidad de inhibidores a añadir:

Inhibidor	SOLUCIÓN A	SOLUCIÓN C	PBS-complete
PMSF (µl/ml)	2,5	5	--
DTT (µl/ml)	5	5	--
COMPLETE (µl/ml)	40	40	40

- Preparar solución A + Igepal 10 %: se pipetea cortando la punta de la pipeta (es muy viscoso) y se tiene que agitar con vórtex bien hasta que se disuelva.

Procedimiento

- Aspirar medio de cultivo.
- Lavar los pozos con 1 ml de PBS frío (sin complete)
- Poner las placas en hielo. A partir de este punto tener las muestras en hielo siempre.

- Añadir PBS-complete y rascar las células con el rascador de células: cuando se utilizan 2 pocillos por condición, se añaden 400 μ l y cuando son 3 pocillos, se añaden 300 μ l.

- Centrifugar a 7000 rpm (=4000g), 4', 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración.
- Resuspender el sedimento en 400 μ l de solución A pipeteando (10-12 veces).
- 15' en hielo.
- Añadir 25 μ l Igepal 10%
- Mezclar con vórtex 10'.
- 5' en hielo.

- Centrifugar a 3000 rpm (=720g), 10', 4°C.

- Centrifugar a 14000 rpm (=15800g), 5', 4°C. El sedimento resultante corresponde a los núcleos y el sobrenadante es la fracción citoplasmática (para la cuantificación usar un blanco con la misma cantidad de Igepal).

- Añadir 30-60 μ l de solución C con la pipeta sin tocar el sedimento. Hacerlo fuerte, de forma que se desprege el sedimento del fondo y quede flotando.

- Agitar suavemente en una plataforma vertical 90-120' a 4°C para dar tiempo a las proteínas nucleares a salir del núcleo.

- Centrifugar 2000 rpm (=320g) 5'.

- Pasar el sobrenadante con cuidado (25-40 μ l) a un tubo eppendorf nuevo, y poner 5 μ l en otro tubo eppendorf para la cuantificación proteica (usar solución C de blanco en la cuantificación).

3.6.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR A PARTIR DE TEJIDO (MÉTODO OSMÓTICO)

Este protocolo está basado en el método osmótico utilizado para células en cultivo (protocolo 3.6.2), con las mismas soluciones, pero con algunas variaciones.

Fungible y pequeño material

- Tubo eppendorf estériles
- Rascador de células.
- Homogeneizador manual Dounce pequeño

Preparativos previos

- Volúmenes de soluciones de extracción necesarios:

SOLUCIÓN A	400 µl/100 mg de muestra
SOLUCIÓN A + IGEPAL	25 µl/100 mg muestra
SOLUCIÓN C	30 µl/100 mg muestra
PBS	1 ml / pocillo de placa de 6 pocillos

- Cantidad de inhibidores a añadir:

	SOLUCIÓN A	SOLUCIÓN C	PBS-complete
PMSF (µl/ml)	2,5	5	--
DTT (µl/ml)	5	5	--
COMPLETE (µl/ml)	40	40	40

- Preparar solución A + Igepal 10 % (Igepal CA-630=Nonidet-NP40): se pipetea cortando la punta de la pipeta (es muy viscoso) y se tiene que hacer mezclar con vórtex bien hasta que se disuelva.

Procedimiento (variaciones)

- Homogeneizar el tejido con el homogeneizador manual poniéndolo en hielo, y pasarlo a un tubo eppendorf estéril.
- Seguir protocolo de método osmótico con las siguientes variaciones:
- Añadir 50 µl de solución C por cada 100 mg de tejido inicial.
- Tras estar agitándose en la plataforma, hacer un centrifugar de 15', 16000g.

Extracción de proteína nuclear (método con RIPA)

3.6.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR (MÉTODO RIPA)

Este protocolo se utiliza para hacer Western Blot de proteínas nucleares y tiene una eficiencia mayor a la del método osmótico. El procedimiento a seguir es el mismo que en el caso del método osmótico hasta el punto en el que tenemos el sedimento con núcleos.

- Centrifugar a 14000 rpm (=15800g), 5', 4°C: El sedimento resultante corresponde a los núcleos y el sobrenadante es la fracción citoplasmática (para la cuantificación usar un blanco con la misma cantidad de Igepal).

- Añadir 30 µl (para microglía primaria) o 60 µl (para mixto primario y BV2) de RIPA (ver stock en extracción de proteína total).

- Agitar suavemente en una plataforma vertical 90-120' a 4°C para dar tiempo a las proteínas nucleares a salir del núcleo.

- Sonicar 10 segundos en frecuencia de 0,8 y potencia mínima.

- Separar 5 µl para cuantificación de proteínas.

3.6.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR (PARA EXPERIMENTOS DE SAPA)

El protocolo utilizado fue el descrito por Kenneth Wu (Wu, 2006b). Para hacer los experimentos de SAPA se necesita gran cantidad de proteínas, por lo que partimos de 2 botellas T75 de cultivos por condición, y al final se juntan las proteínas obtenidas.

Reactivos

I. Soluciones madre:

Son las mismas que las utilizadas para el método osmótico (protocolo 3.6.2.).

II. Soluciones de extracción:

Se preparan el día antes del experimento y duran 15 días.

- SOLUCIÓN A (10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA): es una solución hipotónica. Para preparar **40 ml**:

- 104 mg HEPES
- 400 µl stock KCl 1M (7,46g/100ml)
- 8 µl de EDTA 0,5M
- 40µl de EGTA 0,1M stock

- Enrasar con agua milliQ a 40ml
- Ajustar pH a 7,9
- Filtrar con filtro Millipore 0.22µm y guardar a 4°C
- **SOLUCIÓN B:** en este caso el disolvente es **PBS estéril** y se añade únicamente EDTA (1 mM EDTA). Para preparar 10 ml:
 - 20 µl stock **EDTA 0.5M**
 - Enrasar con PBS a 10 ml
 - Filtrar con filtro Millipore 0.22µm y guardar a 4°C

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf estériles.
- Rascador de células.
- Tubos de 15 ml estériles.

Preparativos previos

- Preparar los volúmenes de soluciones de extracción necesarios y añadir inhibidores de proteasas a las soluciones A, B y PBS. Para saber el volumen, hay que tener en cuenta el número de muestras para las soluciones A y C, y el número de pocillos para el PBS. En el caso de la solución A se debe considerar, además, el volumen de solución A +Igepal (se prepara a partir de la solución A ya con los inhibidores):

SOLUCIÓN A	1 ml/T75
SOLUCIÓN A + IGEPAL	65 µl/ T75
SOLUCIÓN B	30 µl/ T75
PBS-complete	10 ml/ T75
PBS	15 ml/ T75

Cantidad de inhibidores a añadir:

Inhibidor	SOLUCIÓN A	SOLUCIÓN B	PBS-complete
PMSF (µl/ml)	2,5	5	--
DTT (µl/ml)	5	5	--
COMPLETE (µl/ml)	40	40	40

- Preparar solución A + Igepal 10 % (Igepal CA-630=Nonidet-NP40): se pipetea cortando la punta de la pipeta (es muy viscoso) y se tiene que hacer mezclar con vórtex bien hasta que se disuelva.

Procedimiento

- Aspirar medio de cultivo.
- Lavar las botellas T75 con 15 ml de PBS frío (sin complete)
- Añadir 10 ml de PBS-complete y rascar las células con el rascador de células.
- Pasar las muestras a tubos de 15 ml.
- Centrifugar a 1000 rpm, 5'. La centrifugación se puede hacer a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración.
- Resuspender el sedimento en 1 ml de solución A pipeteando (10-12 veces), y pasarlo a tubo eppendorf estériles.
- 15' en hielo
- Añadir 65 µl Igepal 10%
- mezclar con vórtex 10''
- 5' en hielo.
- Centrifugar a 3000 rpm (=720g), 10', 4°C.
- Centrifugar a 14000 rpm (=15800g), 5', 4°C: El sedimento resultante corresponde a los núcleos y el sobrenadante es la fracción citoplasmática (para la cuantificación usar un blanco con la misma cantidad de Igepal).
- Añadir 130 µl de solución B.
- Sonicar 10 segundos en frecuencia de 0,8 y potencia mínima.
- Centrifugar a 10000g, 5', 4°C.
- Separar 5 µl para cuantificación de proteínas.

3.6.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR (PARA CO-INMUNOPRECIPITACIÓN)

Reactivos

I. Soluciones madre:

- Las mismas que las utilizadas para el método osmótico (protocolo 3.6.2.).

Soluciones nuevas:

- NaF 50mM (21 mg/10 ml de agua) a 4° C.
- MgCl₂ 1M (20,33 g/100 ml de agua).
- Tris 20mM, pH 8 (30,28 g/250 ml de agua).

II. Soluciones de extracción:

- Tampón de lisis hipotónico (Hepes 10 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, NaF 1 mM, Igepal 0,08 %). Para 40 ml (se utilizan unos 3 ml por muestra):
 - o Hepes: 104 mg.
 - o KCl: 200µl de stock 1M.
 - o MgCl₂: 60µl de stock 1M.
 - o NaF: 800µl de stock 50 mM.
 - o Igepal: 32µl.
- Solución Digin (Hepes 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, NaCl 420 mM, B-Glicerol-fosfato 50 mM, glicerol 25%, pH 7,9). Para preparar 10 ml (se necesitan 50-100 µl por muestra):
 - o Hepes: 52,06 mg.
 - o MgCl₂: 15 µl de stock 1 M.
 - o EDTA: 40 µl de stock 50 mM.
 - o NaCl: 1 ml de stock 4 M.
 - o B-Glicerol-fosfato: 153 mg.
 - o NaF: 200 µl de stock 50mM.
 - o Glicerol: 2,5 ml.
 - o Ajustar el pH a 7,9.

Fungible y pequeño material

- Tubos eppendorf estériles.
- Rascador de células.

Preparativos previos

- Antes de empezar añadir 7,7µl de DTT por cada ml de solución Digin
- Antes de empezar añadir 1 pastilla de complete por cada 10 ml de solución IP.

Procedimiento

- Aspirar medio de cultivo.
- Lavar los pozos con PBS frío.
- Añadir 450 µl de tampón de lisis hipotónico.
- Rascar poniendo la placa sobre hielo con un rascador de células y pasar el volumen a un tubo eppendorf estéril.
- Dejar 15' en hielo.
- Centrifugar 5' a 3000 rpm.
- Lavar 2 veces con 500 µl con tampón de lisis hipotónico.
- Centrifugar 5'' a 3000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en solución Digin.
- Dejar 30' en hielo.
- Centrifugar 10' a 13000 rpm.
- Pasar el sobrenadante a un eppendorf nuevo y guardar a -20° C.

Con esas muestras ya se puede hacer el western blot.

3.7 OTRAS TÉCNICAS

3.7.1 DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN MEDIO DE CULTIVO

Materiales

Reactivos

- Griess A: 150 ml
 - o 1% de Sulfanilamida: 1,5 g.
 - o 5% de ácido fosfórico: 7,50 ml.
- Griess B: 150 ml (disolvente es agua).
 - o 0,1% de N-naptylenediamine dihydroclorido: 0,15 g

Fungible y pequeño material

- Placa 96 pocillos apta para espectofotómetro.

Preparativos previos:

- Hacer curva estándar:
 - o Solución 100 μM : 5 μl de solución stock 20 μM + 995 μl de medio de cultivo en el que estén las células.
 - o Hacer diluciones seriadas a partir de la solución 100 μM :
 - 100 μM \rightarrow 100 μl de 100 μM
 - 50 μM \rightarrow 50 μl
 - 25 μM \rightarrow 50 μl
 - 12,5 μM \rightarrow 50 μl
 - 6,25 μM \rightarrow 50 μl
 - 3,12 μM \rightarrow 50 μl
 - 1,55 μM \rightarrow 50 μl
 - 0 μM \rightarrow 50 μl descartarlos

VOLUMEN TOTAL: 50 μl / pozo

Procedimiento

- Poner 50 µl de medio/pozo en una placa de 96 pocillos.
- Preparar una solución mezclando el Griess A y el B: 100 µl/muestra de Griess A + 100 µl/muestra de Griess B.
- Añadir 200 µl de la mezcla.
- Dejar 5'.
- Leer a 540 nm.

Apreciaciones

- Cultivos primarios: El medio se recogió 24 y 48 horas después del tratamiento.
- BV2: se sembraron las células a 100000 cél/ml 48 horas antes del tratamiento.

3.7.2 CITOMETRÍA DE FLUJO

3.7.2.1 FIJACIÓN Y PERMEABILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS BV2

Materiales

Reactivos

- PBS 0,01 M.
- Etanol 100 %.

Procedimiento

- Decantar el medio de las botellas T75.
- Añadir PBS:
 - o (10 ml + 5 ml) y recoger las células con rascador.
- Centrifugar 3' a 1000 rpm (=200 g).
- Eliminar sobrenadante con la pipeta de 10 ml (no aspirar con bomba de vacío).
- Resuspender el sedimento en 5 ml de PBS (2ml para T25) y homogenizar con pipeta de 10ml.
- Centrifugar 3' a 1000 rpm.
- Eliminar sobrenadante con pipeta.
- Resuspender el sedimento en 1 ml de PBS y homogeneizamos con una pipeta de 10 ml.

- Contar las células con el hemocitómetro (o guardar 50 µl/muestra para contarlas tras la fijación).
- Añadir gota a gota 2,3 ml de etanol 100% a -20° C mientras se mantienen las células en agitación suave con vórtex. (Al añadir el etanol 100 % se ha diluido de manera que la concentración final es del 70%).
- Dejar las células 30' a -20° C.
- Pasarlas a 4° C (se pueden guardar así en etanol 70 % a 4° C durante semanas o meses).

3.7.2.2 TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO DE LAS CÉLULAS BV2

Materiales

Reactivos

- PBS 0,01 M
- Solución A (4° C, proteger de la luz).
 - o Citrato sódico 38 mM. (Sigma S4641)
 - o Yoduro de propidio 500 µg/ml. (Molecular Probes P1304)
- Solución B (4° C, proteger de la luz).
 - o RNasa (Sigma R5503) 10mg/ml PBS
 - o Yoduro de propidio 500 µg/ml. (Molecular Probes P1304)
- Solución de análisis: 940 µl PBS + 30 µl solución A +30 µl solución B.

Procedimiento

- Poner 10⁶ células en un tubo eppendorf.
- Centrifugar 3' a 400 g.
- Eliminar el sobrenadante con pipeta con mucho cuidado.
- Añadir 1 ml de PBS y homogeneizar con punta de pipeta de 1 ml.
- Centrifugar 3' a 400 g.
- Eliminar el sobrenadante con pipeta con mucho cuidado.
- Añadir 1 ml de PBS y homogeneizar con punta de pipeta de 1 ml.
- Centrifugar 3' a 400 g.
- Durante los 3 minutos se prepara la solución de análisis:
- Eliminar el sobrenadante con pipeta con mucho cuidado.

- Añadir 1 ml de solución de análisis y homogeneizar con punta de pipeta de 1 ml.
- Incubar 30' a 37° C o toda la noche a 4° C.
- Analizar en un citómetro.

3.8 TRATAMIENTOS

3.8.1 TRATAMIENTO CON LPS IN VIVO

Se trataron ratones C57BL/6 adultos de 8-10 semanas de edad mediante inyección intraperitoneal con 100 o 400µg de LPS por ratón, disuelto en 200 µl de solución salina. Los ratones control se inyectaron con el mismo volumen de solución salina.

Dieciséis horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados por desnucación y se procedió al comienzo de la fijación (inmunohistoquímica) o de la extracción proteica nuclear (western blot).

3.8.2 TRATAMIENTOS IN VITRO

Para los trabajos de C/EBP α , C/EBP β :

- Cultivo mixto: se cambió el medio de todos los tipos de cultivos 24 horas antes a DMEM:F12 + FBS 10%.

- BV2: se sembraron las células a 100000 cél/ml 48 horas antes del tratamiento y se cambió el medio 24 horas antes a DMEM:F12 + FBS 0,5%.

Para el trabajo de C/EBP δ :

- Cultivo mixto: se cambió el medio de todos los tipos de cultivos 24 horas antes a DMEM:F12 + FBS 10%.

- BV2: se sembraron las células a 100000 cél/ml 48 horas antes del tratamiento y se cambió el medio 24 horas antes a DMEM:F12 + FBS 10%.

Para el estudio de la inhibición de C/EBP β :

- Cultivo mixto de ratones deficientes: se cambió el medio 24 horas antes a DMEM:F12 + FBS 0,5%.

- BV2:

- Western Blot: se sembraron las células a 100000 cél/ml 48 horas antes del tratamiento.
- PCR en tiempo real: se sembraron las células a 25000 cél/ml 48 horas antes del tratamiento.
- Cuantificación de nitritos: se sembraron las células a 25000 cél/ml 48 horas antes del tratamiento.

Las células se trataron con:

- LPS (stock 1 mg/ml): 100 ng/ml.
- IFN γ (stock 100 μ g/ml): 40 ng/ml.
- M-CSF (stock 100 μ g/ml): 200 ng/ml.
- Poly I:C (stock 5 mg/ml): 10 μ g/ml.
- CpG1668 (stock 170 μ M): 0,1 μ M.
- Peptidoglicano (stock 1 mg/ml): 1 μ g/ml.
- LPS (100ng/ml) + IFN γ (0,5 ng/ml)

Todos los reactivos se guardaron como stocks congelados.

Tratamiento con inhibidores de MAPK: los inhibidores de MAPKs y sus combinaciones se añadieron 1h antes que el tratamiento con LPS. Como control se utilizaron células a las que se les añadía la misma cantidad de DMSO que contenían los reactivos:

- SB203580 (stock 10 mM): 20 μ M.
- U0126 (stock 20 mM): 10 μ M.
- SP600125 (stock 10 mM): 25 μ M.

4 RESULTADOS

4.1 PRIMER TRABAJO

Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia

Ejarque-Ortiz A., Medina M.G., Tusell J.M., Pérez-González A.P., Serratosa J.,

Saura J.

Glia 55(2): 178-88 (2007)

El factor de transcripción CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α) puede regular la expresión de genes importantes en la respuesta inflamatoria, aunque su papel en la activación glial es poco conocido. Mediante la utilización de cultivos primarios gliales de ratón, nosotros mostramos que las células microgliales in vitro expresan C/EBP α . El lipopolisacárido (LPS) produce una disminución del ARN mensajero de C/EBP α 2 horas tras el tratamiento, y la disminución de todas las isoformas proteicas 4 horas tras el tratamiento. Este efecto se produce con concentraciones a partir de 100 pg/ml. La disminución de C/EBP α tras el tratamiento con LPS se produce en las células microgliales de los cultivos mixtos gliales y también de los cultivos enriquecidos de microglía. Además del LPS, otros agonistas de TLR, como el ácido poliinosinico-policitidilico (agonista de TLR2), el peptidoglicano de *Staphylococcus aureus* (agonista de TLR9) y el oligonucleótido CpG1668 (agonista de TLR3) también inducen una disminución de C/EBP α . Sin embargo, las citoquinas IL-1 β , IL-6, M-CSF e IFN γ no produjeron el mismo efecto. Estos resultados sugieren que la disminución de C/EBP α podría jugar un importante papel en el aumento de la expresión de genes que son potencialmente patogénicos en varias enfermedades neurodegenerativas.

Upregulation of CCAAT/Enhancer Binding Protein β in Activated Astrocytes and Microglia

AROA EJARQUE-ORTIZ,¹ MANEL G. MEDINA,¹ JOSEP M. TUSELL,² ANNA P. PÉREZ-GONZÁLEZ,¹ JOAN SERRATOSA,¹ AND JOSEP SAURA^{1*}

¹Department of Pharmacology and Toxicology, IIBB-CSIC, IDIBAPS, E-08036 Barcelona, Spain

²Department of Neurochemistry, IIBB-CSIC, IDIBAPS, E-08036 Barcelona, Spain

KEY WORDS

C/EBP β ; lipopolysaccharide; glial activation; transcription factor; in vitro; in vivo

ABSTRACT

The transcription factor CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) regulates the expression of key genes in inflammation but little is known about the involvement of C/EBP β in glial activation. In this report, we have studied the patterns of astroglial and microglial C/EBP β expression in primary mouse cortical cultures. We show that both astrocytes and microglia express C/EBP β in untreated mixed glial cultures. C/EBP β is upregulated when glial activation is induced by lipopolysaccharide (LPS). The LPS-induced upregulation of glial C/EBP β is rapid (2 h at mRNA level, 4 h at protein level). It is elicited by low concentrations of LPS (almost maximal effect at 1 ng/mL) and it is reversed by the protein synthesis inhibitor cycloheximide. C/EBP β nuclear levels increase both in astrocytes and microglia after LPS treatment, and the response is more marked in microglia. The LPS-induced increase in microglial C/EBP β is prevented by coadministration of the MAP kinase inhibitors SB203580 (p38 inhibitor) + SP600125 (JNK inhibitor) or SB203580 + U0126 (ERK inhibitor). Systemic injection of LPS also increases brain nuclear levels of C/EBP β as shown by Western blot, and this increase is localized in microglial cells as shown by double immunofluorescence, in the first report to our knowledge of C/EBP β expression in activated glial cells in vivo. These findings support a role for C/EBP β in the activation of astrocytes and, particularly, microglia. Given the nature of the C/EBP β -regulated genes, we hypothesize that this factor participates in neurotoxic effects associated with glial activation. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

In the process known as glial activation, astrocytes and microglia upregulate the expression of a variety of proteins, cytokines, chemokines, receptors, adhesion molecules, some being potentially neurotoxic. In this complex process, transcription factors play a key role by regulating the transcription of specific sets of genes. Several transcription factors have been shown to participate in glial activation, including nuclear factor κ -B (NF- κ B) (O'Neill and Kaltschmidt, 1997), activating protein-1 (AP-1) (Herdegen and Waetzig, 2001), signal transducers and activators of transcription (STATs) (Campbell, 2005), or peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (Kielian and

Drew, 2003). A transcription factor that has received little attention in glial activation is CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β), also known as nuclear factor-interleukin-6 (NF-IL6) or liver-enriched activating protein (LAP) among other names. C/EBP β could play an important role in glial activation since several key proteins in this process are coded by C/EBP β -regulated genes, such as tumor necrosis factor- α (TNF α) (Pope et al., 2000), IL-6 (Akira et al., 1990), interleukin-1 β (IL-1 β) (Zhang and Rom, 1993), nitric oxide synthase-2 (NOS-2) (Lowenstein et al., 1993), or cyclooxygenase-2 (COX-2) (Wadleigh et al., 2000) (see (Poli, 1998) for review on C/EBPs in inflammation).

C/EBP β belongs to the b-zip family of transcription factors. It binds as homo- or heterodimers to consensus sequences in the promoter region of genes, thus activating their transcription. Three C/EBP β protein isoforms are generated from a single mRNA by alternative translational initiation (Calkhoven et al., 2000; Xiong et al., 2001), referred in this article as Full (full length), LAP, and liver-enriched inhibitory protein (LIP), and having in the mouse 297 aa, 276 aa, and 145 aa respectively. The two longer isoforms, Full and LAP, have activity as transcription factors, whereas the shorter C/EBP β isoform, LIP, lacks the transactivation domain and acts as a dominant negative form (Descombes and Schibler, 1991). Although nuclear translocation and phosphorylation have been reported, the most frequent mode of regulation of C/EBP β function is by increased *de novo* synthesis (see Bradley et al. (2003) for references).

Lipopolysaccharide (LPS), the major structural component of the outer wall of gram-negative bacteria, is a powerful activator of astrocytes and microglia. Many of the LPS effects on glial cells are mediated through activation of the MAP kinases ERK, JNK, and p38 (Bhat et al., 1998; Pyo et al., 1998). In astroglial cultures LPS has been found to increase C/EBP β mRNA levels and DNA binding (Cardinaux et al., 2000; Kelicen and Tindberg, 2004), but

Grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministerio de Sanidad; Grant numbers: PI040778, PI050638; Grant sponsor: IDIBAPS, FIS, Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

*Correspondence to: Josep Saura, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Roselló 161, planta 6, 08036-Barcelona, Spain. E-mail: jsaura@iibb.csic.es

Received 16 June 2006; Revised 12 September 2006; Accepted 14 September 2006

DOI 10.1002/glia.20446

Published online 31 October 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

other authors did not observe LPS-induced changes in C/EBP β protein levels (Giri et al., 2004; Won et al., 2003). In contrast, there is no information to our knowledge about LPS-induced changes in C/EBP β levels in microglia.

The first objective in this work was to study LPS-induced changes in C/EBP β in cultured glial cells paying special attention at differentiating whether any observed effect was occurring in astrocytes, microglia, or both. The second objective was to study C/EBP β changes in an in vivo model of glial activation by using systemic injection of LPS. In summary, we show that LPS upregulates C/EBP β in cultured glial cells. We also show for the first time the upregulation of C/EBP β in vivo in glial cells, found in microglia after systemic injection of LPS.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Trypsin-EDTA solution (No. 25200-072), Dulbecco's modified Eagle medium-F-12 nutrient mixture (No. 31330-038), RPMI-1640 (No. 21875-034), mouse laminin (No. 23017-015), foetal bovine serum (No. 10270-106), penicillin-streptomycin (No. 15140-114), and fungizone[®] (No. 15290-018) were from Invitrogen, Carlsbad, CA. Deoxyribonuclease I (No. D-5025), extravidin peroxidase (No. E-2886), biotinylated tomato lectin (No. L-9389), bisbenzamide (Hoechst 33258, No. B-1115), cytosine arabinoside (No. C-1768), mouse anti-GFAP antibody (No. G-3893, clone G-A-5), hexafluoroisopropanol (No. H-8505), SB 203580 (No. S-8307), U0126 (No. U-120), and *E. Coli* LPS serotype 055:B5 (No. L-6529) were from Sigma, St.Louis, MO. Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (No. A11017), Alexa Fluor 546 (No. 11010) goat anti rabbit antibodies, and Alexa Fluor 488-streptavidin (No. S11223) were from Molecular Probes, Eugene, OR. PVDF membranes (No. IPVH00010) were from Millipore, Bedford, MA. HRP-labelled anti-rabbit antibody (No. NA934) and ECL-Plus (No. RPN2132) were from Amersham, Buckinghamshire, UK. Protease inhibitor cocktail Complete[®] (No. 1836145) was from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany. Rabbit anti C/EBP β antibody (No. sc-150) was from Santa Cruz Biotechnology, Temecula, CA. Biotinylated anti-rabbit antibody (No. 31820) was from Pierce, Rockford, IL. Rat anti-CD11b (No. MCA711G, clone 5C6) was from Serotec, Oxford, UK. Mowiol (No. 475904) was from Calbiochem, San Diego, CA. SP 600125 (No. EL-305) was from Biomol International (Plymouth Meeting, PA). IQ SYBRGREEN SuperMix (No. 170-8882), iCycler IQ system, VersaDoc system, and Quantity One 5.4.1 software were from Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. Sensiscript RT (No. 205211) was from Qiagen, Hilden, Germany. Absolutely RNA Miniprep kit (No. 400800) was from Stratagene, La Jolla, CA. Rabbit anti-p36 antibody was a gift from Dr Oriol Bachs (Universitat de Barcelona).

Cell Cultures

Experiments were carried out in accordance with the Guidelines of the European Union Council (86/609/EU),

following the Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) for the use of laboratory animals and approved by the Ethics and Scientific Committees from the Hospital Clinic de Barcelona. Mixed glial cultures were prepared from 1- or 2-day-old neonatal C57BL/6 mice (Charles River, Lyon, France). The cerebral cortices were dissected, carefully stripped of their meninges, and digested with 0.25% trypsin for 25 min at 37°C. Trypsinization was stopped by adding an equal volume of culture medium (Dulbecco's modified Eagle medium-F-12 nutrient mixture, fetal bovine serum 10%, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/mL, and amphotericin B (Fungizone[®] 0.5 μ g/mL) to which 0.02% deoxyribonuclease I was added. The solution was pelleted (5 min, 200g), resuspended in culture medium, and brought to a single cell suspension by repeated pipetting followed by passing through a 105- μ m-pore mesh. Cells were seeded at a density of 250.000 cells/mL (=62.500 cells/cm²) and cultured at 37°C in humidified 5% CO₂/95% air. Medium was replaced every 5–7 days. Cultures reached confluency after 7–10 days in vitro and were used between 12 and 15 days in vitro. At this point they typically consisted of 75% type-I astrocytes and 25% microglia.

Mouse microglial cultures were prepared by mild trypsinization, as described (Saura et al., 2003a). Briefly, confluent mixed glial cultures were treated for 30 min with a low trypsin concentration (0.06%) in the presence of 0.25 mM EDTA and 0.5 mM Ca²⁺. This results in the detachment of an intact layer of cells containing virtually all the astrocytes and leaves a population of firmly attached cells identified as >98% microglia. Twenty four hours after isolation by this procedure, microglial cultures were used.

Mouse astroglial cultures were prepared by seeding cortical cells prepared as for mixed glial cultures on laminin (20 μ g/mL)-coated plates. Laminin-coating favors astroglial growth and inhibits microglial growth (Milner and Campbell, 2002). When confluent, cultures were treated with 10 μ M cytosine arabinoside for 4 days. Cultures were used one day after the end of cytosine arabinoside treatment. The vast majority of cells were type-I astrocytes and microglia were <2%.

The mouse microglial cell line BV2, which was generated from primary mouse microglia transfected with a *v-raf/v-myc* oncogene (Blasi et al., 1990) was maintained at 37°C in RPMI with 10% heat-inactivated fetal bovine serum under a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air.

For all culture types, medium was changed to 0.5% FBS 24 h prior to treatments.

In Vitro Treatments

Two days before experiments, BV2 cells were seeded at a density of 100,000 cells/mL in 24 well-plaques in RPMI with 10% FBS. Twenty four hours before treatment, the medium was replaced by RPMI medium with 0.5% FBS. LPS was added to the culture medium at 100 or 1 ng/mL for different incubation times. SB203580

(20 μ M), U0126 (10 μ M), SP600125 (25 μ M), and combinations of kinase inhibitors (at the same final concentration as indicated) were added 1 h prior to LPS treatment.

In Vivo Treatment with LPS

Adult C57BL/6 mice (8–10 weeks, 20–25 g) were used in most experiments. To establish the specificity of the C/EBP β signal from *in vivo* Western blots and immunohistochemistry, C/EBP β k.o. mice (Screpanti et al., 1995) and their wild type littermates were used, both on a mixed C57BL/6 129S6/SvEv background. The C/EBP β k.o. mice were generously provided by C. Croniger (Case Western Reserve University) and were kept at the Animal Facilities of the University of Barcelona. Mice were injected i.p. with 100 or 400 μ g LPS per mice dissolved in 200 μ L of saline solution. Controls received the same volume of vehicle. Sixteen hours after treatment, animals were killed by cervical dislocation. For Western blots, four animals per group were used. From every animal four regions: liver, cerebral cortex, striatum, and dorsal brainstem including the area postrema were dissected and were processed as indicated below in the isolation of nuclear proteins section. For immunohistochemistry, five animals per group were used. Brains were quickly removed and frozen with dry ice. Coronal cryostat sections (14 μ m) were obtained and processed as indicated in the immunostaining section.

Isolation of Nuclear and Total Proteins

For isolation of nuclear proteins from glial cultures 3, 5, and 6 wells (950 mm^2) of mixed glial, astroglial, and microglial cultures, respectively, were used per condition. Cells were scrapped in cold phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M, pH = 7.4), centrifuged for 4 min at 7,000g and the resulting pellet was resuspended in 400 μ L of buffer A containing 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, and 0.1 mM EGTA, and cells were swollen on ice for 15 min. After addition of 25 μ L of 10% Nonidet-40 (buffer B), cells were vigorously vortexed for 10 s. After 10 min incubation on ice, the broken cells were successively spun for 10 min at 3,000g and for 5 min at 14,000g. The pellet was resuspended in 50 μ L of buffer C consisting of 20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, and 1 mM dithiothreitol. Solutions A, B, C, and PBS were supplemented with the protease inhibitor cocktail Complete[®]. After a 90-min gentle shake at 4°C, nuclei were pelleted by a 5 min spin at 2,000g. The supernatant containing nuclear proteins was collected, and protein amount was determined by the Lowry assay.

For isolation of nuclear proteins from brain or liver, 50–100 mg tissue was immersed in ice-cold buffer A (100 mg tissue/mL), homogenized with a Dounce homog-

enizer (10 strokes), and kept on ice for 15 min at 4°C and processed as for isolation of nuclear proteins from glial cultures with two minor exceptions. On one hand, the pellet obtained after centrifugation 5 min at 14,000g was resuspended once more in buffer A and reprocessed again. In contrast, the final centrifugation was performed for 15 min at 16,000g.

For isolation of total proteins, two wells (200 mm^2) plated with BV2 cells were used. After a cold PBS wash, total proteins were recovered in 60 μ L per well of RIPA buffer containing Igepal CA-630 (10 μ L/mL), sodium deoxycholate (5 mg/mL), SDS (1 mg/mL), and protease inhibitor cocktail Complete[®], in PBS. The content of the two wells was pooled, sonicated, and stored at -20°C.

Western Blot

Around 15–20 μ g of protein, of denatured (5 min, 100°C) nuclear extracts, was subjected to SDS-PAGE on a 15% polyacrilamide gel and transferred to a PVDF membrane. The membranes were processed as follows: (1) 5 min in Tris-buffered saline (TBS, 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH = 7.5); (2) 10 s in methanol; (3) air dry; (4) overnight incubation at 4°C on primary antibody (rabbit anti-C/EBP β 1:500 or rabbit anti-p36 1:5,000) diluted in immunoblot buffer (TBS containing 0.05% Tween-20 and 5% nonfat dry milk); (5) 2 \times 15 s in TBS 0.05% Tween-20; (6) 1 h in HRP-labelled anti-rabbit antibody diluted 1:5,000 in immunoblot buffer; (7) extensive washes in TBS-0.05% Tween-20; (8) 5 min in ECL-Plus. Membranes were exposed to the camera of a Versa-Doc system, and pixel intensities of the immunoreactive bands were quantified using the % adjusted volume feature of Quantity One 5.4.1 software. Data are expressed as the ratio between the intensity of the C/EBP β band and the loading control protein band (p36 or actin). Statistical significance was determined as appropriate with ANOVA or Student's *t*-test, as indicated in the figure legends. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

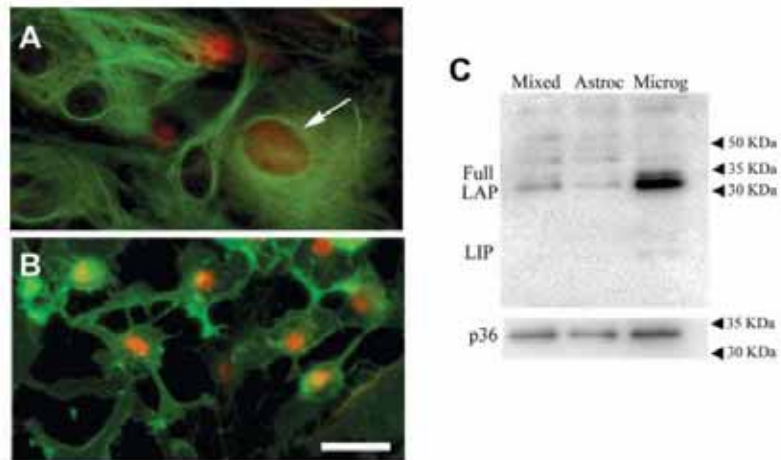
Immunocytochemistry and Immunohistochemistry

For immunocytochemistry, cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. When immunocytochemistry was revealed with diaminobenzidine the protocol was: 7 min in 0.3% H₂O₂ in methanol, 2 \times 15 min in PBS, overnight in primary anti C/EBP β antibody (1:2,000), 2 \times 15 min in PBS, 1 h in biotinylated anti-rabbit antibody (1:200), 2 \times 15 min in PBS, 1 h in ExtrAvidin-HRP (1:500), 5–10 min in diaminobenzidine (1 mg/mL), 0.15% H₂O₂ in PBS. All steps were performed at room temperature, except primary antibody incubation (4°C). All antibodies were diluted in PBS containing 7% normal goat serum. For double immunofluorescence, cells were cultured on glass coverslips and fixed with paraformaldehyde as above. Rabbit anti-C/EBP β was coincubated as primary antibody with mouse anti-GFAP (1:1,000) or rat anti-CD11b (1:500) overnight at 4°C. Secondary antibody Alexa 546-labelled

C/EBP β IN ACTIVATED GLIA

181

Fig. 1. Microglia and astrocytes express C/EBP β in primary mouse cultures. (A,B) Mixed glial cultures were immunostained for C/EBP β (red) and GFAP (green in A) or CD11b (green in B). Note in A that most astrocytes are devoid of C/EBP β but some show a moderate staining (arrow). Two GFAP-negative cells with a marked C/EBP β signal are seen and correspond probably to microglia. In B, several microglial cells are seen and all show strong C/EBP β nuclear staining. Bar, 20 μ m. (C) Western blot showing the levels of C/EBP β in the nuclear fractions of mixed glial, astroglial, and microglial cultures (15 μ g protein per lane). The C/EBP β isoforms are identified as Full, LAP, and LIP. The membrane was also probed for the constitutive nuclear protein p36 for normalization. This experiment was done three times with similar results.



goat anti-rabbit (1:1,000) was coincubated with Alexa 488-labelled goat anti-mouse (1:1,000) or Alexa 488-labelled goat anti-rat (1:1,000) for 1 h at room temperature in a dark chamber. After an extensive wash, coverslips were mounted with Mowiol and stored at 4°C. For double C/EBP β -diaminobenzidine + tomato lectin-Alexa 488 staining as in Fig. 2D, we first performed C/EBP β immunocytochemistry revealed with diaminobenzidine as described above, followed by overnight incubation with biotinylated tomato lectin 1:200 and 1 h incubation with Alexa 488-labelled streptavidin 1:500. Samples were photographed on a Nikon fluorescence microscope Eclipse E1000 equipped with a digital camera Color View 12 and powered by a HBO 100 lamp.

For immunohistochemistry, cryostat sections from fresh-frozen tissue were fixed with 4% paraformaldehyde (30 min, room temperature) and processed for double immunofluorescence with anti C/EBP β and anti CD11b antibodies, as described above for cell cultures. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (5 min, 1.25 μ g/mL). From every section, five microscopic fields ($\times 40$ objective; 0.1 mm²) were photographed for C/EBP β , CD11b, and Hoechst 33258. The photographed fields were selected following a predetermined scheme. The density of C/EBP β positive cells was estimated by counting C/EBP β - and Hoechst 33258-positive nuclei. From these, those that were also CD11b positive, were counted to establish the % of C/EBP β positive cells that were microglial.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was isolated with Absolutely RNA Miniprep kit and reverse transcribed with random primers using Sensiscript-RT. The primers used to amplify mouse C/EBP β mRNA were 5'-AAGCTGAGCGACGAGTACAAGA-3' (forward) and 5'-GTCAGCTCCAGCACCTTG-3' (reverse). For normalization of Ct values to an endogenous control, the fol-

lowing mouse actin mRNA primers were used: 5'-CAACGAGCGGTTCCGATG-3' (forward) and 5'-GCCACAGGATTCCATACCCA-3' (reverse). Real time PCR was carried out with IQ SYBRGREEN SuperMix and iCycler IQ equipment. Primer efficiency was estimated from standard curves generated by dilution of a cDNA pool. Samples were run for 36 cycles (30 s 95°C, 1 min 55°C, 30 s 72°C). Two samples per condition were analyzed in triplicates in each experiment, and four independent experiments were performed. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

RESULTS

C/EBP β Is Expressed by Astrocytes and Microglia in Primary Mouse Glial Cultures

We were first interested to determine whether astrocytes and microglia express C/EBP β in untreated mixed glial cultures. By immunofluorescence, we observed prominent C/EBP β immunostaining in the nuclei of many cells in mixed glial cultures. Double labeling experiments showed that nuclear C/EBP β was found both in astrocytes and microglia. However, whereas most microglial cells were C/EBP β immunoreactive, less than 20% of the astrocytes showed C/EBP β immunoreactivity, and the C/EBP β signal was stronger in microglia than in astrocytes (Figs. 1A,B). These findings were confirmed by Western blot analysis of C/EBP β in the nuclear fraction of untreated mixed glial, astroglial, and microglial cultures. As shown in Fig. 1C, C/EBP β levels were higher in microglial than in astroglial cultures, mixed glial cultures showing intermediate levels. LAP was the most abundant C/EBP β isoform, had an apparent molecular weight of 32–33 kDa, and was detected in all three culture types. Full-length C/EBP β (Full) had an apparent molecular weight of 35 kDa and was detected in

GLIA DOI 10.1002/glia

182

EJARQUE-ORTIZ ET AL.

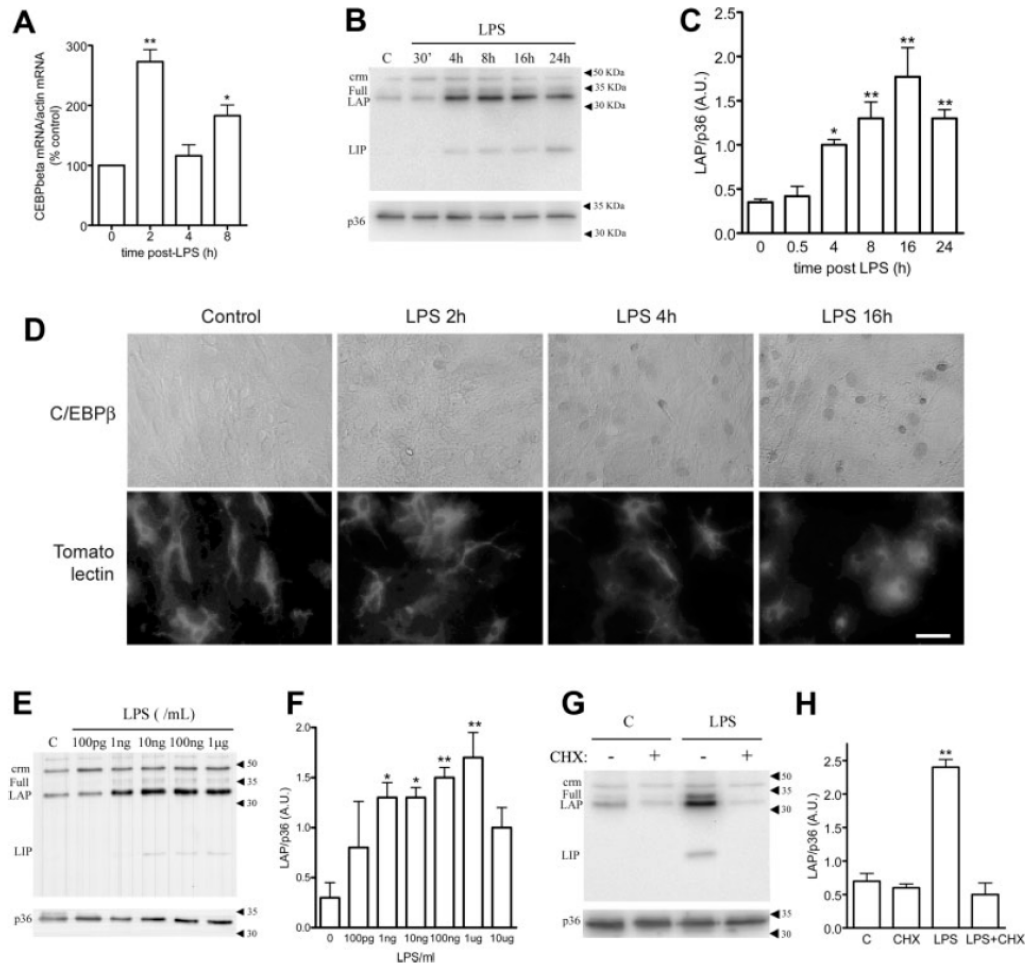


Fig. 2. Increased mRNA and protein nuclear levels of C/EBPβ in activated glia. All experiments shown in this figure were performed with mixed glial cultures. (A) Real-time PCR analysis of C/EBPβ expression induced by 100 ng/mL LPS. Cycle thresholds normalized to actin were used to calculate C/EBPβ mRNA levels. Data show mean + SD from four independent experiments. Controls were set to 100. (B,C) Time-course of 1 μg/mL LPS-induced increase in C/EBPβ protein levels. B shows a representative Western blot of nuclear proteins (15 μg per lane) probed for C/EBPβ and for p36 as loading control. The three C/EBPβ isoforms are identified as Full, LAP and LIP as well as the non-specific band crm. C shows quantitation of LAP vs p36 in 3–4 independent experiments in arbitrary units (A.U.). (D) Time-course of 100 ng/mL LPS-induced increase in C/EBPβ immunoreactivity. C/EBPβ positive nuclei increase in number

and intensity of staining 4 and 16 h after LPS treatment. Double staining with the microglial marker tomato lectin in the same field shows that C/EBPβ immunoreactive nuclei correspond to microglia and to non-microglial cells, basically astrocytes. This experiment was done three times with similar results. Bar, 20 μm. (E,F) Concentration-response of LPS-induced increase in C/EBPβ protein levels at 16 h. E shows a representative Western blot (see legend 2B for details) and F shows quantitation of four independent experiments. (G,H) Mixed glial cultures were treated with 1 μg/mL LPS ± cycloheximide (CHX, 50 μM) for 16 h. G shows a representative Western blot (see legend 2B for details) and H shows quantitation of three independent experiments. In all graphs data is shown as mean + SD. Significance was determined by ANOVA followed by Dunnett test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control.

mixed glial and microglial cultures, but not in astrocytes. Finally LIP, with an apparent molecular weight of 20 kDa, was only detected in microglial cultures. A band of approximately 50 kDa was also observed and probably corresponds to the so-called "cross reactive material" (crm; Figs. 2–5), a previously reported nonspecific band (Bradley et al., 2003; Cardinaux and Magistretti, 1996).

Increased mRNA and Protein Levels of C/EBPβ in Activated Mixed Glial Cultures

We were next interested to study whether LPS induced changes in C/EBPβ in mixed glial cultures. Time-course experiments revealed that LPS induced clear increases in C/EBPβ mRNA and nuclear protein

GLIA DOI 10.1002/glia

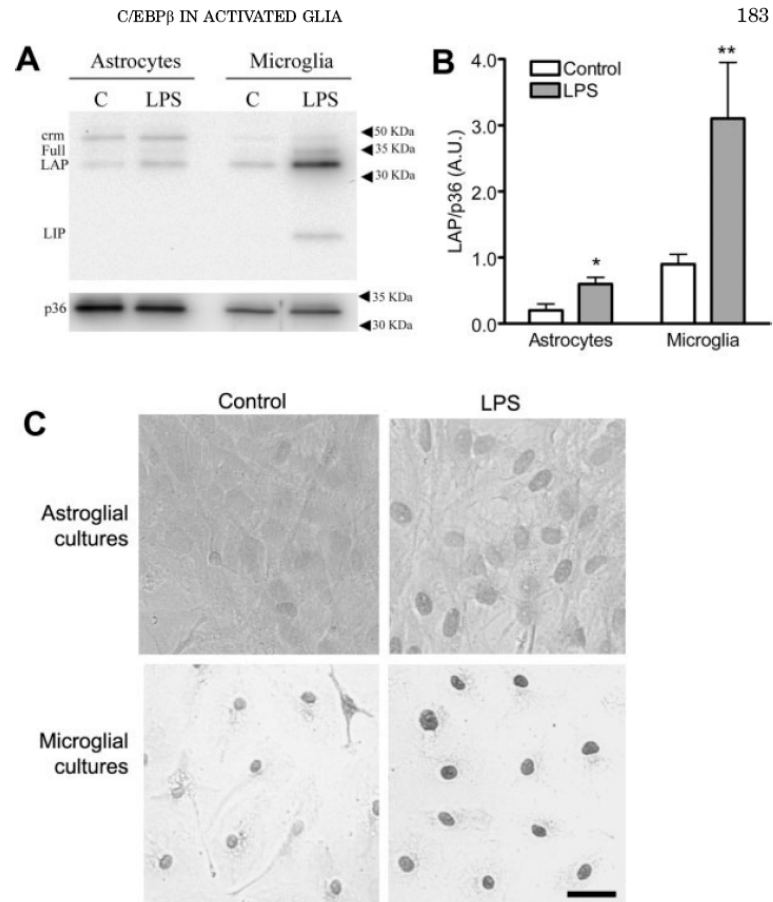


Fig. 3. LPS increases astroglial and microglial C/EBP β nuclear levels. Astroglial and microglial mouse cultures were treated with LPS (1 μ g/mL) for 16 h. (A) Nuclear proteins (15 μ g/lane) were analyzed by Western blot for C/EBP β and p36 as loading control. The three C/EBP β isoforms are identified as Full, LAP, and LIP as well as the non-specific band crm. The image shown is representative of three independent experiments. (B) shows the quantitation of LAP vs p36 in three independent experiments and is expressed as mean + SD. Note that LPS treatment increases nuclear C/EBP β levels in astroglial cultures and even more markedly in microglial cultures. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control. Significance was determined by Student's *t*-test. (C) C/EBP β immunostaining of astroglial and microglial cultures treated with vehicle or 1 μ g/mL LPS. C/EBP β nuclear signal is more prominent in control microglia than in astrocytes. LPS increases C/EBP β nuclear immunostaining in both cell types. Bar, 20 μ m.

levels. LPS (100 ng/mL) increased C/EBP β mRNA levels 2 h after treatment (2.7-fold increase, $P < 0.01$). C/EBP β mRNA levels returned to control levels 4 h after LPS, and a second phase of increase in C/EBP β mRNA was seen at 8 h (83% increase, $P < 0.05$) (Fig. 2A). Similar effects were also induced by LPS 1 μ g/mL (data not shown). At the protein level, nuclear C/EBP β levels increased from 4 h post-treatment with 1 μ g/mL LPS and the increase was maximal at 16 h (5.1-fold increase, $P < 0.01$) (Figs. 2B,C). The time-course of LPS-induced changes in C/EBP β protein levels could also be followed by immunocytochemistry. Figure 2D shows that 100 ng/mL LPS increases C/EBP β immunostaining at 4 h, but not at 2 h, and the effect is higher at 16 h. The same pattern was observed with 1 μ g/mL LPS (data not shown). LPS concentration-response experiments at 16 h showed that concentrations of LPS as low as 1–10 ng/mL markedly increase nuclear C/EBP β levels (4.0–4.1-fold increase, $P < 0.05$), and a maximal increase was observed at LPS concentrations of 100 ng/ml and 1 μ g/mL (4.8–5.1-

fold increase) (Figs. 2E,F). The mRNA results indicated that the increase in nuclear C/EBP β induced by LPS was due to de novo synthesis and not by nuclear translocation of C/EBP β . This was confirmed in experiments in which protein synthesis was inhibited with cycloheximide (50 μ M, 30 min before LPS). As shown in Figs. 2G,H, cycloheximide completely prevented the LPS-induced increase in nuclear C/EBP β .

LPS Increases Nuclear Levels of C/EBP β both in Astrocytes and Microglia

LPS is a prototypical microglial activator although it can induce effects also on astrocytes. To test whether the LPS-induced increase in nuclear C/EBP β levels in mixed glial cultures was occurring in microglia, astrocytes, or both cell types, we prepared astroglial and microglial cultures that were treated for 16 h with LPS. Western blot experiments revealed that 1 μ g/mL LPS

GLIA DOI 10.1002/glia

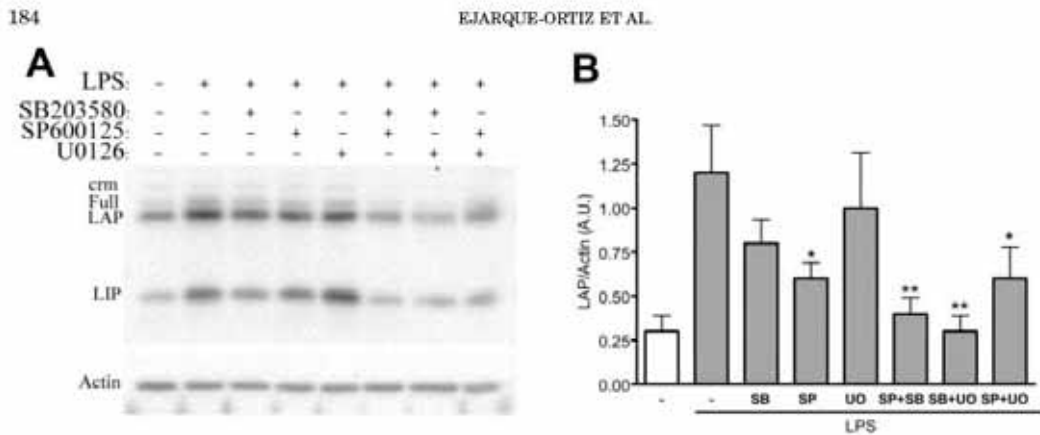


Fig. 4. LPS-induced upregulation of C/EBP β in microglia is mediated by MAP kinases. BV2 microglial cells were treated with LPS (100 ng/mL, 5 h). MAP kinase inhibitors SB203580 (SB, 20 μ M), SP600125 (SP, 25 μ M) and U0126 (UO, 10 μ M) were administered 1 h prior to LPS. Total proteins (20 μ g/lane) were analyzed by Western blot for C/EBP β and actin as loading control. **A** shows a representative Western blot. The three C/EBP β isoforms are identified as Full, LAP, and LIP as well as the non specific band crm. **B** shows the quantitation of LAP vs actin. Bars show mean \pm SD of five independent experiments. Significance was determined by ANOVA followed by Dunnett test. * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with LPS.

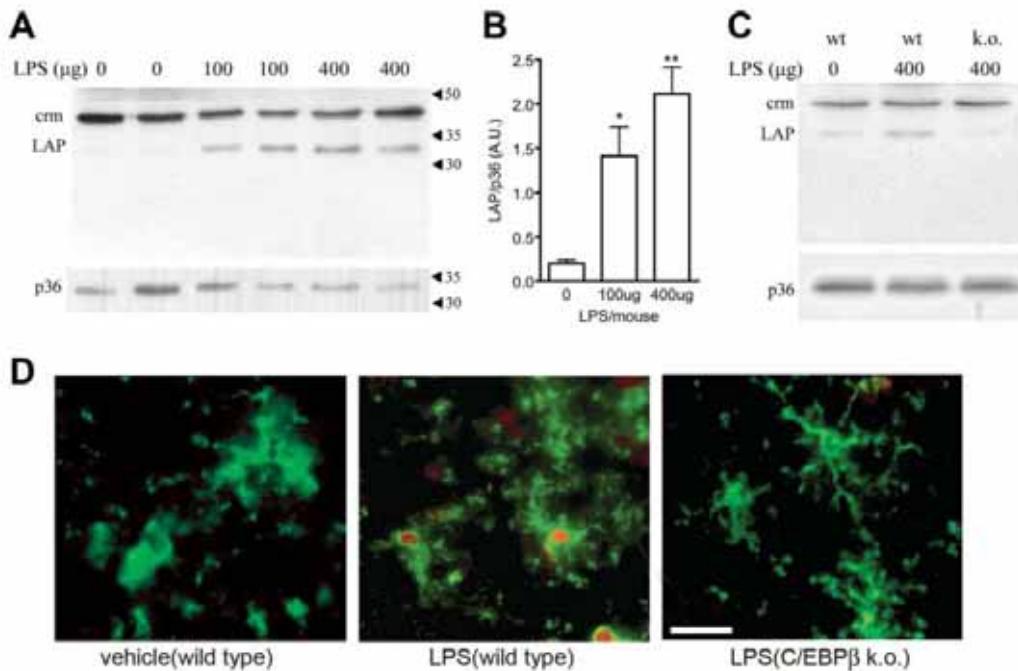


Fig. 5. LPS increases microglial C/EBP β expression in vivo. Mice were treated intraperitoneally with LPS or vehicle for 16 h and C/EBP β protein levels were analyzed by Western blot (**A,B,C**) or by immunohistochemistry (**D**). **A** shows a Western blot of the brainstem nuclear fractions of mice treated with vehicle, 100 or 400 μ g LPS. The image shows the levels of C/EBP β (LAP isoform), the non specific band crm and p36 as loading control. Twenty microgram of protein from a different animal were loaded in each lane. Two representative animals out of four per treatment are shown in this image. **B** shows the quantitation of LAP vs p36 signal in Western blots and bars show the mean \pm SD of four animals per condition. Significance was determined by ANOVA followed by Dunnett test. * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with vehicle. **C** shows a Western blot from the cortical nuclear fraction of wild type mice treated with vehicle or LPS (400 μ g) and a C/EBP β k.o. mouse treated with LPS (400 μ g) and probed for C/EBP β and p36 as in 5A. **D**: Microscopic images of brain sections of vehicle-treated wild type, LPS-treated wild-type and LPS-treated C/EBP β k.o. mice immunostained with C/EBP β (red) and CD11b (green). Note the absence of C/EBP β immunoreactivity in vehicle-treated animals and the presence of nuclear staining in a subset of cells identified as microglia by their CD11b immunoreactive signal in the LPS-treated wild-type mouse. The C/EBP β immunostaining is absent in LPS-treated C/EBP β k.o. mice. Bar, 10 μ m.

GLIA DOI 10.1002/glia

increased nuclear C/EBP β levels in astroglial cultures (2.5-fold increase, $P < 0.05$) but the effect was more marked in microglial cultures (3.5-fold increase, $P < 0.01$) (Figs. 3A,B). This finding was confirmed by immunostaining C/EBP β in control and LPS-treated astroglial and microglial cultures. In this case, the same pattern of changes was induced by LPS at 100 ng/mL (data not shown) and 1 μ g/mL (Fig. 3C). Also, in mixed glial cultures treated with LPS and double immunostained for C/EBP β and an astroglial or a microglial marker as in Fig. 1, we observed that C/EBP β immunoreactivity was enhanced by LPS treatment both in astrocytes and microglia (data not shown).

LPS Upregulates C/EBP β in Microglia via MAP Kinases

To study how the LPS signal is transduced into an increase in C/EBP β in microglia, we used the murine microglial cell line BV2. As seen with primary cultures LPS increased the levels of Full, LAP, and LIP proteins in BV2 cells in a time- and concentration-dependent manner (data not shown). The selective MAP kinase inhibitors U0126, SP600125, and SB203580 were used to test the involvement of ERK, JNK, and p38 MAP kinases, respectively, in the LPS-induced C/EBP β increase. As shown in Fig. 4, SP600125 significantly reduced the 100 ng/mL LPS-induced increase in C/EBP β . In contrast, SB203580 and U0126 did not significantly reduce the LPS-induced increase in C/EBP β , although at an average C/EBP β nuclear levels were 52 and 22% lower in the presence of SB203580 and U0126, respectively. Coadministration of SP600125 + SB203580 or U0126 + SB203580 completely abolished the LPS-induced increase in C/EBP β , whereas the coadministration of U0126 + SP600125 had a similar effect than SP600125 alone. It is interesting to note that simultaneous inhibition of p38 and ERK resulted in the total reversal of LPS-induced C/EBP β upregulation, whereas the separate inhibition of these two pathways had no significant effect.

Systemic LPS Induces Microglial C/EBP β Expression

Finally, we were interested to study whether the LPS-induced increase in C/EBP β in cultured glial cells could be reproduced in an *in vivo* model of glial activation, such as systemic injection of LPS. As shown in Figs. 5A,B the C/EBP β LAP isoform was clearly upregulated in the nuclear fraction from the brainstem at the level of the area postrema of mice treated with 100 or 400 μ g LPS. An identical increase in C/EBP β was also observed in nuclear proteins prepared from cerebral cortices and striatum and also from liver that was used as positive control (data not shown). As expected, the band corresponding to LAP was absent in the brain nuclear fraction from LPS-injected C/EBP β k.o. mice (Fig. 5C). The increase in brain C/EBP β induced by systemic injection

of LPS was confirmed by immunostaining and counting C/EBP β positive nuclei. The density of C/EBP β positive nuclei in the striatum of vehicle- and LPS-treated mice was 6.1 ± 4.2 cells/mm² ($n = 4$) and 62.8 ± 8.4 cells/mm² ($n = 4$) ($P < 0.001$, Student's *t*-test), respectively (Fig. 5D). Double C/EBP β -CD11b immunofluorescence revealed that most C/EBP β positive nuclei corresponded to microglial cells, 100% in vehicle- and 97.8% in LPS-treated mice (Fig. 5D), and no C/EBP β immunoreactive microglial cells were observed in C/EBP β k.o. mice treated with LPS (Fig. 5D). No C/EBP β immunoreactive astrocytes were observed in vehicle or LPS-treated mice, as revealed by double GFAP-C/EBP β immunohistochemistry (data not shown). A weak nuclear neuronal staining was seen in some brain regions like the cerebral cortex. This signal was much weaker than that of activated microglial cells and was not altered by LPS systemic injection (data not shown). C/EBP β nuclear staining in hepatocytes was used as a positive control and was markedly increased by systemic LPS injection.

DISCUSSION

Glial activation is observed in all neurodegenerative disorders. When there is neuronal damage there is always, to some extent, glial activation. This glial response provides trophic and metabolic support to damaged neurons, deactivates toxic species, eliminates cell debris, and protects from brain infection (Hauwel et al., 2005). However, there is growing evidence that some elements of glial activation may be detrimental to neurons (Mrak and Griffin, 2005). Upon activation, glial cells, particularly microglia, may produce potentially neurotoxic species such as TNF α or NO, shown to participate in neuronal death in animal models of neurodegenerative diseases (Liberatore et al., 1999; Mayne et al., 2001). The pharmacological modulation of glial activation could consequently be beneficial for the treatment of neurodegenerative disorders.

C/EBP β is a transcription factor that regulates the expression of genes such as IL-1 β , TNF α , NOS-2, or COX-2. Given this profile, C/EBP β could play a key role in the regulation of the "neurotoxic side" of glial activation and is therefore a candidate target for pharmacological inhibition. In the present study, we clearly show that increased expression of C/EBP β is induced in glial cells by LPS. The response is rapid, with a marked effect in mRNA at 2 h and in protein at 4 h, and it is elicited by concentrations of LPS as low as 10 pg/mL. The increase in nuclear levels of C/EBP β is caused by increased *de novo* protein synthesis and no signs of nuclear translocation of a preexisting cytoplasmic pool were observed. Our results also show that LPS increases C/EBP β expression both in astrocytes and microglia. A C/EBP β increase induced by LPS in astrocytes *in vitro* had been described by Cardinaux et al. (2000) and Kelicen and Tindberg (2004), but it was not observed by Giri et al. (2004) and Won et al. (2003). Astroglial cultures often contain contaminating microglia and, more often than thought, microglial cells are responsible for effects

observed in primary glial cultures in which the astrocyte is the predominant cell type (Saura et al., 2003b; Solà et al., 2002). The possibility that the LPS-induced increase in C/EBP β that we observed in astroglial cultures was due to contaminating microglia was excluded by C/EBP β immunostaining. Using this approach, we observed an increase in nuclear C/EBP β immunoreactivity in astroglial-enriched or mixed glial cultures treated with LPS that was localized in astrocytes.

Our finding that LPS increases C/EBP β levels also in microglial cells is a novel observation to our knowledge. Although C/EBP β activity can certainly be modulated by post-translational modifications, the most common mechanism for C/EBP β activation is increased expression (see Bradley et al. (2003) for references). Therefore, the increased C/EBP β levels in microglia induced by LPS are likely to result in increased C/EBP β activity. Since C/EBP β participates in the expression of TNF α (Dasgupta et al., 2003; Jana et al., 2002, 2003), NOS-2 (Jana et al., 2001), IL-1, and IL-6 (Dasgupta et al., 2003) in BV2 microglial cells, the increased levels and activity of C/EBP β in LPS-activated microglia will probably lead to the increased expression of these proinflammatory genes. Increased expression of TNF α or NOS-2 in microglia may have neurotoxic consequences (Mayne et al., 2001; Liberatore et al., 1999) and in fact, microglial cells activated with LPS are indeed neurotoxic (Kim et al., 2000; Zujovic et al., 2000). Altogether, these findings suggest that C/EBP β can be a key factor in microglial activation, at least when induced by LPS, and a possible target to pharmacologically modulate the neurotoxic effects of microglial activation. This hypothesis is supported by the recent finding that genetic ablation of C/EBP β is neuroprotective from focal cerebral ischemia in mice (Kapadia et al., 2006).

Following the observation that LPS upregulates C/EBP β expression in microglia, we were interested to study the signal transduction pathways involved in this effect. LPS is known to activate in microglial cells the MAP kinases ERK, JNK, and p38 (Bhat et al., 1998; Pyo et al., 1998). By use of the selective inhibitors U0126 (ERK inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor), and SB203580 (p38 inhibitor), we show that these three pathways are involved in the LPS-induced C/EBP β increase in microglia. Thus, JNK or p38 inhibition result in a marked reduction of LPS-induced C/EBP β upregulation and a complete inhibition is accomplished by simultaneous inhibition of p38 and ERK or p38 and JNK. In previous studies, p38 and ERK were found to mediate the IL-12 p40-induced C/EBP β upregulation in BV2 cells (Jana et al., 2003), and p38 was found to mediate the LPS-induced C/EBP β upregulation in macrophages (Bradley et al., 2003), but this is to our knowledge the first study in which the pathways leading from LPS to C/EBP β upregulation have been studied in microglial cells. AP-1 could mediate the involvement of JNK in LPS-induced C/EBP β upregulation since JNK activation leads to induction of AP-1 dependent genes, and AP-1 binding sites are found in the C/EBP β promoter (Cho et al., 2003; Foka et al., 2001). Similarly,

the involvement of p38 in this effect could be mediated by CREB since p38 activation leads to CREB activation (Brautigam et al., 2005; Butler et al., 2005) and CREB regulates the transcription of the C/EBP β gene (Berrier et al., 1998; Niehof et al., 1997).

The finding that LPS increases C/EBP β levels in microglia was confirmed and extended *in vivo* using systemic injection of LPS. In this model, there is astroglial activation (Gautron et al., 2002), microglial activation (Kloss et al., 2001), and blood-brain barrier disruption (Lustig et al., 1992), but no signs of neuronal damage have been reported (G.Raivich, personal communication). Previous reports have shown that LPS *i.p.* injection causes the upregulation of C/EBP β in a variety of organs, the liver most prominently (Alam et al., 1992; An et al., 1996; Sylvester et al., 1994), and also in the brain (Saito et al., 1999). Our results are in agreement with this later finding, since we observed a strong increase in C/EBP β protein levels in the brain nuclear fraction from mice injected *i.p.* with LPS. To determine the cell type(s) in which this C/EBP β increase was occurring, we performed immunohistochemistry on brain sections. In the control brain we observed a weak neuronal signal in many but not all brain areas, in agreement with a report on the distribution of C/EBP β mRNA by *in situ* hybridization (Sterneck and Johnson, 1998). In LPS-treated animals we did not observe C/EBP β immunoreactivity in astrocytes. Since all *in vivo* experiments were performed at a single time point, 16 h, we can not exclude that upregulation of C/EBP β occurs also in activated astrocytes, as we have seen *in vitro*, in an earlier or later time point. In contrast, LPS treatment induced *in vivo* a marked increase in C/EBP β immunoreactivity in microglial cells, similar to what was observed *in vitro*. This is an interesting finding because it shows for the first time the upregulation of C/EBP β in microglial cells *in vivo* supporting the hypothesis that C/EBP β participates *in vivo* in the activation of microglial cells. This result suggests that C/EBP β upregulation may be an event also in the microglial activation that accompanies neurodegenerative disorders. Experiments with animal models of glial activation, induced by neuronal lesion, and neurodegenerative diseased brain would be important to ascertain this question.

In summary, the upregulation of C/EBP β in activated astrocytes and microglia supports a role for this factor in the process of glial activation. Given the profile of the C/EBP β -regulated genes, we hypothesized that the increased expression of C/EBP β in glial cells, particularly in microglia, may play an important role in their activation and that C/EBP β is a potential target for inhibition in the treatment for neurological disorders in which activated microglia contributes to neurodegeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Oriol Bachs and Elisabetta Blasi for the generous gift of anti-p36 antibody and BV-2 cell,

respectively, to Colleen Croniger and Valeria Poli for the generous gift of C/EBP β k.o. mice, and to Greer M Murphy Jr for help on real-time PCR experiments. We also thank Pilar Pastor and Teresa Domingo for the professional care of C/EBP β k.o. mice and to Carme Solà for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

- Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T. 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 9:1897–1906.
- Alam T, An MR, Papaconstantinou J. 1992. Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem* 267:5021–5024.
- An MR, Hsieh CC, Reiser PD, Rabek JP, Scott SG, Kuninger DT, Papaconstantinou J. 1996. Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBP α and C/EBP β isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response. *Mol Cell Biol* 16:2295–2306.
- Berrier A, Siu G, Calame K. 1998. Transcription of a minimal promoter from the NF-IL6 gene is regulated by CREB/ATF and SP1 proteins in U937 promonocytic cells. *J Immunol* 161:2267–2275.
- Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL. 1998. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 18:1633–1641.
- Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. 1990. Immortalization of murine microglial cells by a *v-raf/v-myc* carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27:229–237.
- Bradley MN, Zhou L, Smale ST. 2003. C/EBP β regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol Cell Biol* 23:4841–4858.
- Brautigam VM, Frasier C, Nikodemova M, Watters JJ. 2005. Purinergic receptor modulation of BV-2 microglial cell activity: Potential involvement of p38 MAP kinase and CREB. *J Neuroimmunol* 166:113–125.
- Butler MP, Hanly JA, Moynagh PN. 2005. Pellino3 is a novel upstream regulator of p38 MAPK and activates CREB in a p38-dependent manner. *J Biol Chem* 280:27759–27768.
- Calkhoun CF, Muller C, Leutz A. 2000. Translational control of C/EBP α and C/EBP β isoform expression. *Genes Dev* 14:1920–1932.
- Campbell IL. 2005. Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease-associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 48:166–177.
- Cardinaux JR, Allaman I, Magistretti PJ. 2000. Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBP β and C/EBP δ in astrocytes. *Glia* 29:91–97.
- Cardinaux JR, Magistretti PJ. 1996. Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)- β and C/EBP δ in mouse cortical astrocytes: Involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism. *J Neurosci* 16:919–929.
- Cho YH, Lee CH, Kim SG. 2003. Potentiation of lipopolysaccharide-inducible cyclooxygenase 2 expression by C2-ceramide via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of CCAAT/enhancer binding protein β in macrophages. *Mol Pharmacol* 63:512–523.
- Dasgupta S, Jana M, Liu X, Pahan K. 2003. Role of very-late antigen-4 (VLA-4) in myelin basic protein-primed T cell contact-induced expression of proinflammatory cytokines in microglial cells. *J Biol Chem* 278:22424–22431.
- Descombes P, Schibler U. 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein LAP, a transcriptional inhibitory protein LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67:569–579.
- Foka P, Kousteni S, Ramji DP. 2001. Molecular characterization of the Xenopus CCAAT-enhancer binding protein β gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 285:430–436.
- Gautron L, Lafon P, Chaigniau M, Tramu G, Laye S. 2002. Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience* 112:717–729.
- Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, Singh I. 2004. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: A possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* 24:479–487.
- Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P. 2005. Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: The role of microglia, astrocytes, “protective” glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Res Brain Res Rev* 48:220–233.
- Herdegen T, Waetzig V. 2001. AP-1 proteins in the adult brain: Facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration. *Oncogene* 20:2424–2437.
- Jana M, Dasgupta S, Liu X, Pahan K. 2002. Regulation of tumor necrosis factor- α expression by CD40 ligation in BV-2 microglial cells. *J Neurochem* 80:197–206.
- Jana M, Dasgupta S, Saha RN, Liu X, Pahan K. 2003. Induction of tumor necrosis factor- α (TNF- α) by interleukin-12 p40 monomer and homodimer in microglia and macrophages. *J Neurochem* 86:519–528.
- Jana M, Liu X, Koka S, Ghosh S, Petro TM, Pahan K. 2001. Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells. *J Biol Chem* 276:44527–44533.
- Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, Kalluri H, Johnson PF, Vemuganti R. 2006. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein β knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 98:1718–1731.
- Kelicen P, Tindberg N. 2004. Lipopolysaccharide induces CYP2E1 in astrocytes through MAP kinase kinase-3 and C/EBP β and δ . *J Biol Chem* 279:15734–15742.
- Kielian T, Drew PD. 2003. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists on central nervous system inflammation. *J Neurosci Res* 71:315–325.
- Kim WG, Mohnhey RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. 2000. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: Role of microglia. *J Neurosci* 20:6309–6316.
- Kloss CU, Bohatschek M, Kreutzberg GW, Raivich G. 2001. Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurol* 168:32–46.
- Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. 1999. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5:1403–1409.
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9730–9734.
- Lustig S, Danenberg HD, Kafri Y, Kobiler D, Ben Nathan D. 1992. Viral neuroinvasion and encephalitis induced by lipopolysaccharide and its mediators. *J Exp Med* 176:707–712.
- Mayne M, Ni W, Yan HJ, Xue M, Johnston JB, Del Bigio MR, Peeling J, Power C. 2001. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor- α expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 32:240–248.
- Milner R, Campbell IL. 2002. Cytokines regulate microglial adhesion to laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the $\alpha 6 \beta 1$ integrin. *J Neurosci* 22:1562–1572.
- Mrak RE, Griffin WS. 2005. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 26:349–354.
- Niehof M, Manns MP, Trautwein C. 1997. CREB controls LAP/C/EBP β transcription. *Mol Cell Biol* 17:3600–3613.
- O’Neill LA, Kaltschmidt C. 1997. NF- κ B: A crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20:252–258.
- Poli V. 1998. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273:29279–29282.
- Pope R, Mungre S, Liu H, Thimmapaya B. 2000. Regulation of TNF- α expression in normal macrophages: The role of C/EBP β . *Cytokine* 12:1171–1181.
- Pyo H, Jou I, Jung S, Hong S, Joe EH. 1998. Mitogen-activated protein kinases activated by lipopolysaccharide and β -amyloid in cultured rat microglia. *Neuroreport* 9:871–874.
- Saito H, Shultz LD, Sinha M, Papaconstantinou J. 1999. Induction of the $\alpha 1$ -antichymotrypsin gene in the brain associated with TGF- $\beta 1$ deficiency or systemic administration of endotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 263:270–275.
- Saura J, Petegnief V, Wu X, Liang Y, Paul SM. 2003a. Microglial apolipoprotein E, astroglial apolipoprotein J expression in vitro: Opposite effects of lipopolysaccharide. *J Neurochem* 85:1455–1467.
- Saura J, Tusell JM, Serratosa J. 2003b. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44:183–189.
- Scrapanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D, Sellitto C, Scarpa S, Bellavia D, Lattanzio G, Bistoni F, Frati L, Cortese R, Gulino A, Ciliberto G, Costantini F, Poli V. 1995. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP β -deficient mice. *EMBO J* 14:1932–1941.
- Solà C, Casal C, Tusell JM, Serratosa J. 2002. Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. *Eur J Neurosci* 16:1275–1283.

- Sterneck E, Johnson PF. 1998. CCAAT/enhancer binding protein β is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. *J Neurochem* 70:2424–2433.
- Sylvester SL, ap Rhys CM, Luethy-Martindale JD, Holbrook NJ. 1994. Induction of GADD153, a CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, during the acute phase response in rats. Evidence for the involvement of C/EBPs in regulating its expression. *J Biol Chem* 269:20119–20125.
- Wadleigh DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S, Herschman HR. 2000. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 275:6259–6266.
- Won JS, Im YB, Key L, Singh I, Singh AK. 2003. The involvement of glucose metabolism in the regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in glial cells: Possible role of glucose-6-phosphate dehydrogenase and CCAAT/enhancing binding protein. *J Neurosci* 23:7470–7478.
- Xiong W, Hsieh CC, Kurtz AJ, Rabek JP, Papaconstantinou J. 2001. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein- β isoform synthesis by alternative translational initiation at multiple AUG start sites. *Nucleic Acids Res* 29:3087–3098.
- Zhang Y, Rom WN. 1993. Regulation of the interleukin-1 β (IL-1 β) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs. *Mol Cell Biol* 13:3831–3837.
- Zujovic V, Benavides J, Vige X, Carter C, Taupin V. 2000. Fractalkine modulates TNF- α secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia* 29:305–315.

4.2 SEGUNDO TRABAJO

CCAAT/enhancer binding protein-alpha is down-regulated by toll-like receptor agonists in microglial cells

Ejarque-Ortiz A., Tusell J.M., Serratosa J., Saura J.

Journal of Neuroscience Research 85 (5): 985-983 (2007)

El factor de transcripción CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) regula la expresión de genes clave en la inflamación. Sin embargo, no se conoce la implicación que C/EBP β tiene en la activación glial. En este trabajo, hemos estudiado el patrón de la expresión de C/EBP β en los astrocitos y microglía de cultivos primarios gliales de ratón. Aquí demostramos que en los cultivos primarios gliales mixtos, ambos tipos celulares expresan C/EBP β en condiciones basales, y su expresión se incrementa tras el tratamiento con lipopolisacárido (LPS). El incremento inducido por LPS es rápido ya que se detecta un aumento del ARN mensajero a las 2 horas tras el tratamiento, y un aumento de la proteína a las 4 horas. Este incremento se promueve a concentraciones muy bajas de LPS (1 ng/ml produce un incremento cercano al máximo) y se revierte con el tratamiento con el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida. Los niveles nucleares de C/EBP β aumentan tanto en cultivos astrogliales como en los microgliales, aunque el aumento en la microglía es mayor. El incremento de C/EBP β se bloquea mediante la coadministración de los inhibidores de las MAPK SB203580 (inhibidor de p38), SP600125 (inhibidor de JNK) o SB203580 U0126 (inhibidor de ERK).

La inyección sistémica de LPS también induce un incremento de los niveles de C/EBP β en el cerebro, como se puede ver mediante Western Blot. Además, mediante inmunofluorescencia se comprobó que las células en las que se produce este incremento son las células microgliales activadas. Estos resultados apoyan la hipótesis de que C/EBP β está implicado en la activación de los astrocitos y, especialmente, de la microglía. Debido a la naturaleza de los genes regulados por C/EBP β , nuestra hipótesis se centra en el posible papel que este factor de transcripción puede tener en los efectos neurotóxicos asociados con la activación glial.



CCAAT/Enhancer Binding Protein- α Is Down-Regulated by Toll-Like Receptor Agonists in Microglial Cells

Aroa Ejarque-Ortiz,¹ Josep M. Tusell,² Joan Serratosa,¹ and Josep Saura^{1*}

¹Department of Pharmacology and Toxicology, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain

²Department of Neurochemistry, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain

The transcription factor CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α) can regulate the expression of important genes in the inflammatory response, but little is known about its role in glial activation. By using primary cortical murine glial cultures, we show that C/EBP α is expressed by microglial cells in vitro. Lipopolysaccharide (LPS) down-regulates C/EBP α mRNA at 2 hr and all C/EBP α protein isoforms at 4 hr. This effect is elicited by LPS concentrations ≥ 100 pg/ml. LPS-induced C/EBP α down-regulation occurs in microglial cells both in mixed glial and in microglial-enriched cultures. As seen with LPS, other toll-like receptor agonists (polyinosinic-polycytidylic acid, peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*, and the oligonucleotide CpG1668) also down-regulate C/EBP α whereas cytokines such as interleukin-1 β , interleukin-6, macrophage-colony stimulating factor, and interferon- γ do not. These findings suggest that C/EBP α down-regulation in activated microglia could play an important role in the increased expression of genes that are potentially pathogenic in a variety of neurological disorders. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: in vitro; lipopolysaccharide; glial activation

CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α) is a member of the C/EBP subfamily of leucine zipper-containing transcription factors. From the CEBPA intronless gene, a single mRNA species is produced, which gives rise to various C/EBP α protein isoforms by use of alternative initiation sites (Calkhoven et al., 2000). C/EBP α proteins have to dimerize to bind to DNA, either as homodimers or as heterodimers. C/EBP α isoforms have been shown to form heterodimers with C/EBP proteins such as C/EBP β (Diehl and Yang, 1994), C/EBP δ (Cassel et al., 2000), or C/EBP ϵ (Chih et al., 2004) as well as with non-C/EBP proteins such as ATF-2 (Shuman et al., 1997).

In mouse, constitutive expression of C/EBP α is high in liver and adipose tissue, and in both tissues C/EBP α expression is associated with mature, terminal stages (Birkenmeier et al., 1989). In contrast, in myelomonocytic cells C/EBP α expression is associated with nonmature stages (Scott et al., 1992), and C/EBP α determines the commitment of bipotential (granulocytic/

monocytic) myeloid cells toward the granulocytic pathway (Radomska et al., 1998). In many cells, C/EBP α seems to have growth-arresting potential (Xie et al., 2004). In agreement with this, mutations in the CEBPA gene causing a reduced C/EBP α function seem to contribute to some acute myelogenous leukemias (Pabst et al., 2001).

Much less is known about the presence and role of C/EBP α in the CNS. In the most complete study to date, C/EBP α was not detected in neurons, astrocytes, or resting microglia in rat brain, but it was found to be expressed in activated microglia after cerebral hypoxia ischemia injury (Walton et al., 1998). An up-regulation of C/EBP α in brain was also observed after systemic lipopolysaccharide (LPS) injection (Saito et al., 1999) and in Alzheimer's disease brain (Blalock et al., 2004). These three studies suggest that C/EBP α up-regulation is associated with glial activation. In vitro, C/EBP α was detected in cultured astrocytes by some authors (Cristiano et al., 2005) but not by others (Yano et al., 1996) and in the only in vitro study of C/EBP α in activated microglia, amyloid β peptide was found to down-regulate C/EBP α in microglia (Walker et al., 2006).

Some targets for C/EBP α are important genes in glial activation. Thus, the expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) receptor (Zhang et al., 1996), tumor necrosis factor- α (TNF α ; Wedel et al., 1996), cyclooxygenase-2 (COX-2; Callejas et al., 2000), or nitric oxide synthase-2 (NOS-2; Kolyada and Madias, 2001) can be regulated by C/EBP α . This suggests that C/EBP α may play an active role in glial activation. Our aim in this study was to determine whether astrocytes and microglia express C/EBP α in vitro and to analyze their

Contract grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III from Spanish Ministerio de Sanidad; Contract grant number: PI040778; Contract grant number: PI050658.

*Correspondence to: Josep Saura, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Rosselló 161, planta 6, 08036-Barcelona, Spain. E-mail: jsafat@iibb.csic.es

Received 10 September 2006; Revised 2 November 2006; Accepted 18 November 2006

Published online 25 January 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21195

986 Ejarque-Ortiz et al.

patterns of expression in glial activation. Our results show that microglia strongly expresses C/EBP α in vitro, which is dramatically down-regulated when glial activation is induced by toll-like receptor (TLR) agonists but not by other proinflammatory stimuli such as cytokines.

MATERIALS AND METHODS

Primary Glial Cultures

Experiments were carried out in accordance with the Guidelines of the European Union Council (86/609/EU), following the Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) for the use of laboratory animals, and were approved by the Ethics and Scientific Committees from the Hospital Clínic de Barcelona. Three types of primary glial cultures were prepared: mixed glial cultures, microglial cultures, and astroglial cultures. These cultures were all prepared from 1- or 2-day-old neonatal C57BL/6 mice (Charles River, Lyon, France). The culture medium used for all cultures consisted of Dulbecco's modified Eagle medium-F12 nutrient mixture (No. 31330-038; Invitrogen, Carlsbad, CA), fetal bovine serum 10% (No. 10270-106; Invitrogen), penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μ g/ml (No. 15140-114; Invitrogen), and amphotericin B 0.5 μ g/ml (No. 15290-018; Invitrogen).

For preparation of mixed glial cultures, the cerebral cortices were dissected, carefully stripped of their meninges, and digested with 0.25% trypsin (No. 25200-072; Invitrogen) for 25 min at 37°C. Trypsinization was stopped by adding an equal volume of culture medium containing 0.02% deoxyribonuclease I (No. D-5025; Sigma, St. Louis, MO). The solution was pelleted (5 min, 200g), resuspended in culture medium, and brought to a single cell suspension by repeated pipetting, followed by passage through a 105- μ m-pore mesh. Cells were seeded at a density of 250,000 cells/ml (62,500 cells/cm²) and cultured at 37°C in humidified 5% CO₂-95% air. Medium was replaced every 5–7 days. Cultures reached confluence after 7–10 days in vitro and were used between 12 and 15 days in vitro. At this point, they typically consisted of 75% type I astrocytes and 25% microglia as assessed by counts of glial fibrillary acidic protein (GFAP)- and CD11b-immunoreactive cells.

Mouse microglial cultures were prepared by mild trypsinization as described elsewhere (Saura et al., 2003). Briefly, confluent mixed glial cultures were treated for 30 min with a low trypsin concentration (0.06%) in the presence of 0.25 mM EDTA and 0.5 mM Ca²⁺. This treatment results in the detachment of an intact layer of cells containing virtually all the astrocytes and leaves a population of firmly attached cells identified as >98% microglia as assessed by counts of CD11b-immunoreactive cells. Twenty-four hours after isolation by this procedure, microglial cultures were used.

Mouse astroglial cultures were prepared by seeding cortical cells prepared as for mixed glial cultures on plates coated with laminin (20 μ g/ml; No. 23017-015; Invitrogen). Laminin-coating favors astroglial growth and inhibits microglial growth (Milner and Campbell, 2002). When confluent, cultures were treated with 10 μ M cytosine arabinoside for 4 days. Cultures were used 1 day after the end of cytosine arabinoside treatment. The vast majority of cells

consisted of type I astrocytes, and microglia made up less than 2% as assessed by counts of GFAP- and CD11b-immunoreactive cells.

In Vitro Treatments

For all culture types, medium was changed to 0.5% FBS 24 hr prior to treatments. Drugs were stored as frozen stocks as follows: LPS (*Escherichia coli* serotype 055:B5; No. L-6529; Sigma) 1 mg/ml PBS; interferon- γ (IFN γ ; mouse recombinant; No. I-4777; Sigma) 100 μ g/ml culture medium; M-CSF (mouse recombinant; No. M-9170; Sigma) 100 μ g/ml culture medium; interleukin-1 β (IL-1 β ; mouse recombinant; No. I-5271; Sigma) 10 μ g/ml water; interleukin-6 (IL-6; mouse recombinant; No. I-9646; Sigma) 100 μ g/ml PBS-BSA; polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C); P-0913; Sigma], 5 mg/ml RNase-free buffer (Xeragon); peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* (77140; Fluka) 1 mg/ml PBS, CpG1668 (TIB MOLBIOL) 170 μ mol/liter PBS. From these stocks, intermediate $\times 30$ solutions were prepared, which were then supplied to cultures.

Isolation of Nuclear Proteins

For isolation of nuclear proteins from glial cultures three, five, and six wells (950-mm²) of mixed glial, astroglial, and microglial cultures, respectively, were used per condition. Cells were scrapped in cold PBS and centrifuged for 4 min at 7,000g, and the resulting pellet was resuspended in 400 μ l buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, and 0.1 mM EGTA), and cells were swollen on ice for 15 min. After addition of 25 μ l of 10% Nonidet-40 (buffer B), cells were vigorously vortexed for 10 sec. After a 10-min incubation on ice, the broken cells were successively spun for 10 min at 3,000g and for 5 min at 14,000g. The pellet was resuspended in 50 μ l of buffer C consisting of 20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, and 1 mM dithiothreitol. Solutions A, B, and C and PBS were supplemented with the protease inhibitor cocktail Complete (No. 1836145; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). After 90 min of gentle shaking at 4°C, nuclei were pelleted by a 5-min spin at 2,000g. The supernatant containing nuclear proteins was collected, and protein amount was determined by the Lowry assay.

Western Blot

Fifteen micrograms of protein of denatured (5 min, 100°C) nuclear extracts was subjected to SDS-PAGE on a 15% polyacrylamide gel and transferred to a PVDF membrane (No. IPVH00010; Millipore, Bedford, MA). The membranes were processed as follows: 1) 5 min in Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris, 0.15M NaCl, pH 7.5); 2) 10 sec in methanol; 3) air drying; 4) overnight incubation at 4°C on primary antibody (rabbit anti-C/EBP α (No. sc-61; Santa Cruz, Temecula, CA) 1:500; goat antinuclear factor-kB (NF κ B) p65 (No. sc-372G; Santa Cruz) 1:500; or rabbit anti-p36 (gift from Dr. O. Bachs; 1:5,000) diluted in immunoblot buffer (TBS containing 0.05% Tween-20 and 5% nonfat dry milk); 5) 2 \times 15 sec in TBS 0.05% Tween-20; 6) 1 hr in horseradish

peroxidase (HRP)-labelled anti-rabbit (No. NA934; Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) or anti-goat (No. A9432; Sigma) antibodies diluted 1:5,000 in immunoblot buffer; 7) two 30-min washes in TBS-0.05% Tween-20; and 8) 5 min in ECL-Plus (No. RPN2132; Amersham). Membranes were exposed to the camera of a VersaDoc system (Bio-Rad, Hercules, CA), and chemiluminescence was quantified in Quantity One 5.4.1 software (Bio-Rad).

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was isolated with Absolutely RNA Mini-prep kit (No. 400800; Stratagene, La Jolla, CA) and reverse transcribed with random primers using Sensiscript-RT (No. 205211; Qiagen, Hilden, Germany). The primers used to amplify mouse C/EBP α mRNA were 5'-TGGACAAGAA-CAGCAACGAGTAC-3' (forward) and 5'-TGCGCAGGCG-GTCATT-3' (reverse). For normalization of Ct values to an endogenous control, the following mouse actin mRNA primers were used: 5'-CAACGAGCGGTTCCGATG-3' (forward) and 5'-GCCACAGGATCCATACCCA-3' (reverse). Real-time PCR was carried out with IQ SYBR Green SuperMix (No. 170-8882; Bio-Rad) and iCycler IQ equipment (Bio-Rad). Primer efficiency was estimated from standard curves generated by dilution of a cDNA pool. Samples were run for 36 cycles (30 sec 95°C, 1 min 55°C, 30 sec 72°C). Two samples per condition were analyzed in triplicate in each experiment, and four independent experiments were performed. Statistical analysis was performed by using one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Immunocytochemistry

Cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 60 min at room temperature. When immunocytochemistry was revealed with diaminobenzidine (DAB), the protocol was 7 min in 0.3% H₂O₂ in methanol, 2 × 15 min in PBS, overnight in primary anti-C/EBP α antibody (1:1,000), 2 × 15 min in PBS, 1 hr in biotinylated anti-rabbit antibody (1:5,000; Pierce, Rockford, IL), 2 × 15 min in PBS, 1 hr in ExtrAvidin-HRP (1:500; No. E-2886; Sigma), 5–10 min in DAB (1 mg/ml), 0.15% H₂O₂ in PBS. All steps were performed at room temperature, except for primary antibody incubation (4°C). All antibodies were diluted in PBS containing 7% normal goat serum. For double or triple immunofluorescence, cells were fixed with paraformaldehyde as described above. Rabbit anti-C/EBP β (1:500) was coincubated as primary antibody with mouse anti-GFAP (1:1,000; No. G-3893; Sigma) and/or rat anti-CD11b (1:500; clone 5C6; Serotec, Oxford, United Kingdom) overnight at 4°C. For double labeling, the secondary antibody Alexa 546-labelled goat anti-rabbit (1:1,000; No. 11010; Molecular Probes, Eugene, OR) was coincubated with Alexa 488-labelled goat anti-mouse (1:1,000; No. A11017; Molecular Probes) or Alexa 488-labelled goat anti-rat (1:1,000; No. A11006; Molecular Probes). For triple labeling, the secondary antibodies Alexa 546-labelled goat anti-rabbit (1:1,000), Alexa 488-labelled goat anti-rat (1:1,000), and Alexa 350-labelled goat anti-mouse (1:300; No. A11068; Molecular Probes) were used. Incubations with secondary antibodies

C/EBP α Down-Regulation in Activated Glia 987

were for 1 hr at room temperature in a dark chamber. After an extensive wash, coverslips were mounted with Mowiol (No. 475904; Calbiochem, San Diego, CA) and stored at 4°C. For double C/EBP α -DAB + tomato lectin-Alexa 488 staining as in Figure 3, we first performed C/EBP α immunocytochemistry revealed with DAB as described above, followed by overnight incubation with biotinylated tomato lectin 1:200 and 1 hr of incubation with Alexa 488-labelled streptavidin 1:500. All samples were photographed on a Nikon fluorescence microscope Eclipse E1000 equipped with a digital camera Color View 12 and powered by an HBO 100 lamp.

RESULTS

Basal C/EBP α Expression in Mixed Glial Cultures

We were first interested to determine whether C/EBP α is expressed in mixed glial cultures under basal conditions. By immunocytochemistry, we observed in a subset of cells positive C/EBP α immunostaining localized in the nucleus. Double immunofluorescence revealed that the majority of C/EBP α immunoreactive nuclei corresponded to microglia, identified by CD11b immunostaining (Fig. 1A,C,G), and that virtually all microglial cells showed C/EBP α nuclear immunoreactivity. In contrast, astrocytes, identified by GFAP immunostaining, were generally devoid of C/EBP α (Fig. 1B,D,H), although weak C/EBP α immunoreactivity was occasionally observed in a small proportion of astrocytes.

LPS Decreases C/EBP α Expression in Mixed Glial Cultures

We were next interested in determining whether C/EBP α was affected in mixed glial cultures by LPS, a TLR4 agonist that induces a strong glial activation. By quantitative RT-PCR, we observed a marked decrease in C/EBP α mRNA levels induced by 100 ng/ml LPS. This effect was rapid (66% decrease at 2 hr, $P < 0.01$) and sustained (77% decrease at 8 hr, $P < 0.01$; Fig. 2A). An LPS-induced down-regulation of C/EBP α was also observed at the protein level by Western blot. In the nuclear fraction of untreated mixed glial cultures, 4 C/EBP α isoforms were identified with apparent molecular weights of 42, 38–39, 32–33, and 30 kDa (Fig. 2B). LPS markedly reduced C/EBP α nuclear levels in a time-dependent manner. No change was observed 30 min after LPS, but a marked reduction was seen after 4 hr, which was even stronger after 16 hr. All four C/EBP α proteins were similarly affected by LPS, with minor differences in the intensity and time course among the isoforms. Thus p38–39 and p30 showed the strongest reduction (51–60% at 4 hr, $P < 0.01$; 76% at 16 hr, $P < 0.01$), whereas p32–33 was the C/EBP α isoform most resistant to being down-regulated by LPS (36% and 39% reduction at 4 and 16 hr, respectively, $P < 0.05$; Fig. 2C). As shown in Figure 2B, the decrease in C/EBP α nuclear levels induced by LPS was concomitant with the increase in the nuclear levels of transcription factors involved in the expression of proinflammatory genes in glial cells such as C/EBP β and NF κ B (p65 subunit).

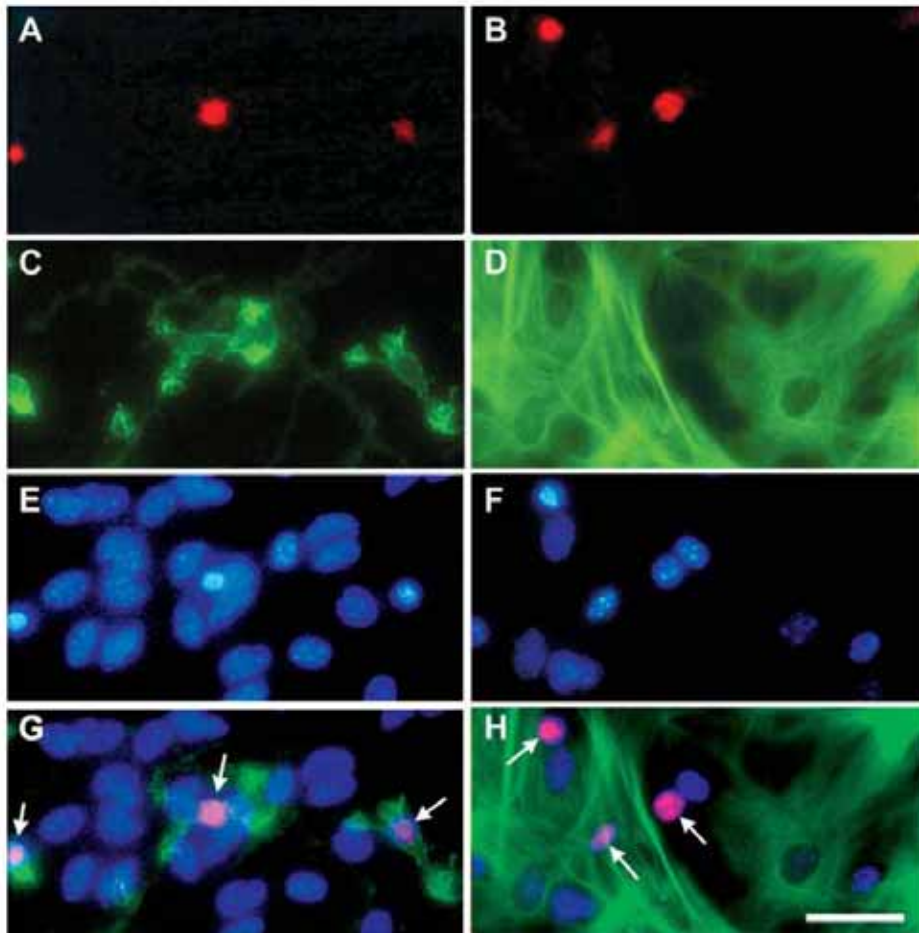


Fig. 1. Microglial C/EBP α in untreated mixed glial cultures. Mixed glial cultures were immunolabelled for C/EBP α (A,B), CD11b (C), or GFAP (D), and nuclei were stained with Hoechst 33258 (E,F). G: Merged image of A,C,E. In this field, three C/EBP α -positive nuclei (arrows) are observed, and they all correspond to microglial

cells, identified by their CD11b staining. H: Merged image of B,D,F. In this field, three C/EBP α -positive nuclei are also observed (arrows), and none of them corresponds to an astrocyte, identified by GFAP immunostaining. Most likely, these three C/EBP α -immunoreactive cells correspond to microglial cells. Scale bar = 20 μ m.

The LPS-induced reduction in C/EBP α nuclear levels observed by Western blot was confirmed and extended by immunocytochemistry as shown in Figure 2D. By using this approach, we observed that C/EBP α nuclear immunostaining remains unaltered 30 min or 2 hr after LPS, whereas a marked decrease was seen at 4 hr, and a maximal decrease was seen at 8 hr and 16 hr (Fig. 2D). The decrease in nuclear C/EBP α immunostaining was not accompanied by an increase in cytoplasmic C/EBP α signal, suggesting that the protein is rapidly degraded following export from the nucleus.

By immunocytochemistry, we analyzed the concentration response of LPS-induced decrease in C/EBP α in mixed glial cultures with a range of concentrations from 100 μ g/ml to 1 μ g/ml and a time posttreatment of 16 hr. No change in C/EBP α immunostaining was seen with LPS concentrations \leq 1 μ g/ml. A small reduction was observed at 10 μ g/ml, which was greater at 100 μ g/ml and was maximal at LPS concentrations \geq 1 μ g/ml (Fig. 3). Double staining for C/EBP α and the microglial marker tomato lectin confirmed that C/EBP α immunostaining was mostly microglial in control and LPS-treated

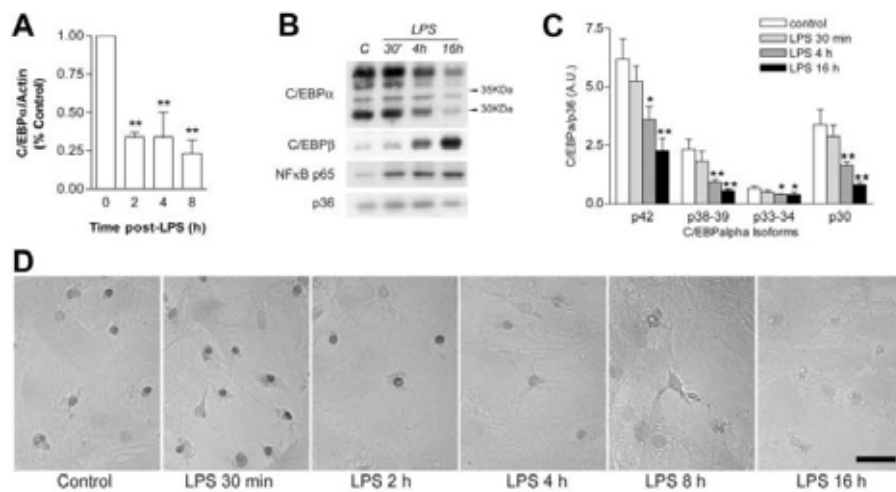


Fig. 2. LPS down-regulates C/EBP α in mixed glial cultures. Mixed glial cultures were treated with 100 ng/ml LPS for various times. **A**: Time course analysis of LPS-induced changes in C/EBP α mRNA by quantitative real-time PCR. LPS significantly decreases C/EBP α mRNA levels at all time points studied. Data show mean \pm SD of three independent experiments and are expressed as percentage control of the C/EBP α /actin mRNA. Significance was determined by ANOVA, followed by Dunnett test, * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with control. **B**: Time course of LPS-induced down-regulation of C/EBP α proteins by Western blot. Mixed glial cultures were treated with LPS, and nuclear proteins were extracted at various times and separated by SDS-PAGE. Four C/EBP α isoforms of apparent molecular weights of 42, 38–39, 33–34, and 30 kDa were

observed in control samples. The four isoforms were down-regulated by LPS at 4 or 16 hr. In the same samples, C/EBP β and the p65 isoform of NF κ B were up-regulated by LPS. p36 was used as the loading control. **C**: Densitometric analysis of three independent Western blot time course experiments. Data show mean \pm SD and are expressed as C/EBP α /p36 ratio. Significance was determined by ANOVA followed by Dunnett test, * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with control. **D**: Time course of LPS-induced down-regulation of C/EBP α in mixed glial cultures revealed by immunocytochemistry. Strongly labelled C/EBP α -positive nuclei are seen in untreated cultures and 30 min or 2 hr after LPS. The C/EBP α immunoreactivity is markedly reduced 4 hr after LPS, and it virtually disappears 8 or 16 hr after LPS treatment. Scale bar = 20 μ m.

cultures and that the absence of C/EBP α immunostaining observed at LPS concentrations \geq 1 ng/ml was not caused by a toxic effect of LPS on microglial cells (Fig. 3).

LPS Decreases C/EBP α in Microglial-Enriched Cultures

Thus far, all experiments had been performed on mixed glial cultures, and we had observed that C/EBP α was localized primarily in microglia, which is not the most abundant cell type in these preparations (75% astrocytes, 25% microglia). To confirm these findings and to determine whether the presence of astrocytes played a role in the LPS-induced down-regulation of C/EBP α in microglia, we studied the effects of LPS in astroglial- and microglial-enriched cultures. As shown in Figure 4, C/EBP α levels in astroglial cultures were barely detectable, either by Western blot (Fig. 4A,B) or by immunocytochemistry (Fig. 4C), and LPS did not induce any measurable effect on C/EBP α in astroglial cultures. In contrast, a strong C/EBP α nuclear signal was observed in microglial cultures with both methods. As observed in mixed glial cultures, LPS (100 ng/ml) markedly decreased nuclear C/EBP α levels in microglial-enriched cultures.

This finding confirms the mainly microglial localization of C/EBP α in glial cultures and shows that the presence of astrocytes is not necessary for the LPS-induced C/EBP α down-regulation in microglia.

C/EBP α Down-Regulation Is Induced by TLR Agonists but Not by Proinflammatory Cytokines

We were finally interested in determining whether C/EBP α down-regulation was a common feature of glial activation induced by different stimuli. To this end, mixed glial cultures were treated for 16 hr with various proinflammatory cytokines and TLR agonists. The cytokines tested were IFN γ (4, 40 ng/ml), M-CSF (20, 200 ng/ml), IL-1 β (20 ng/ml), and IL-6 (100 ng/ml), and the TLR agonists were poly(I:C) (TLR3 agonist, 10, 100 μ g/ml), CpG1668 (TLR9 agonist, 0.1, 1 μ M), and peptidoglycan (TLR2 agonist, 1, 10 μ g/ml). All TLR agonists dramatically decreased C/EBP α immunoreactivity (Fig. 5) at both concentrations tested and to the same extent as LPS. In contrast, no effect on C/EBP α immunoreactivity was induced by IFN γ , M-CSF (Fig. 5), IL-1 β , or IL-6 (not shown).

990 Ejarque-Ortiz et al.

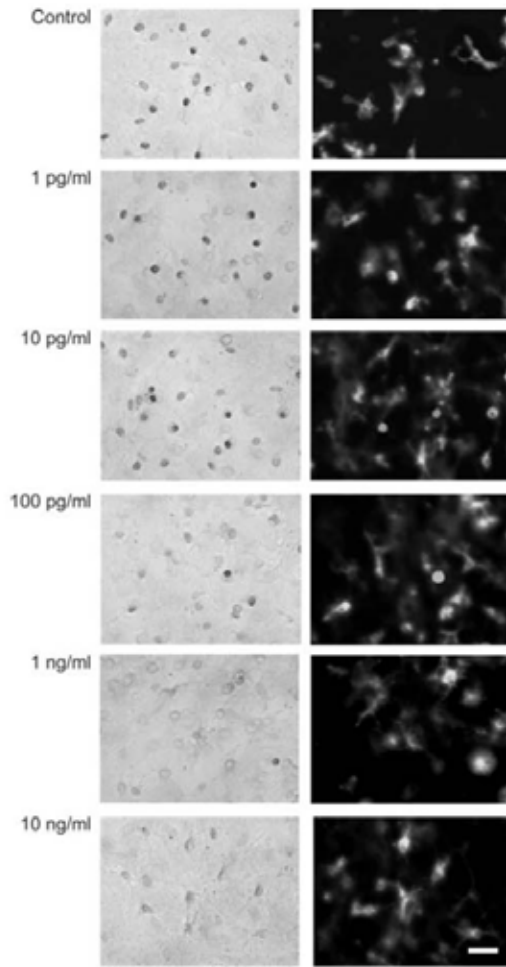


Fig. 3. Concentration response of LPS-induced C/EBP α down-regulation in mixed glial cultures. Mixed glial cultures were treated for 16 hr with various LPS concentrations, which are indicated at left. The right column shows C/EBP α immunoreactivity revealed by DAB immunocytochemistry. The left column shows the microglial marker tomato lectin revealed by Alexa-488. The intensity of C/EBP α immunoreactivity is reduced by 100 pg/ml LPS, and it virtually disappears at 1 or 10 ng/ml LPS. The tomato lectin images show that the reduction in C/EBP α immunostaining was not due to a loss of microglial cells induced at these LPS concentrations. Scale bar = 20 μ m.

DISCUSSION

Activated microglial cells play important roles in the event of neuronal injury. They provide trophic sup-

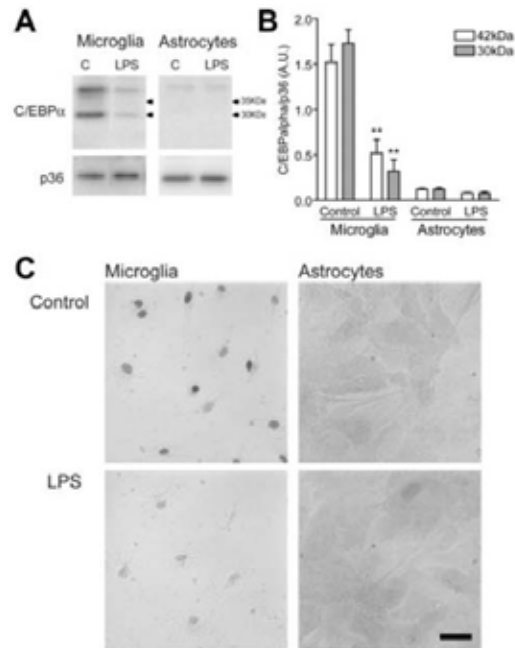


Fig. 4. LPS down-regulates C/EBP α in microglial-enriched cultures. Microglial- or astroglial-enriched cultures were treated for 16 hr with 100 ng/ml LPS. **A:** Nuclear proteins from untreated or LPS-treated microglial- or astroglial-enriched cultures were separated by SDS-PAGE. C/EBP α was detected and p36, which was used as the loading control. C/EBP α is present in the nuclear fraction of microglial-enriched cultures, the p42 and p30 isoforms being particularly prominent. LPS markedly down-regulates C/EBP α in microglial-enriched cultures. In contrast, C/EBP α is virtually undetected in the nuclear fraction from astroglial-enriched cultures. **B:** Densitometric quantitation of C/EBP α p42 and p30 isoforms as in A. Data show mean \pm SD of three independent experiments and are expressed as C/EBP α /p36 ratio. Significance was determined by Student's *t*-test (control vs. LPS), ***P* < 0.01 compared with control. **C:** C/EBP α immunocytochemistry in untreated or LPS-treated microglial- or astroglial-enriched cultures. A strong nuclear C/EBP α staining is seen in microglial-enriched cultures, which virtually disappears after LPS treatment. In contrast, extremely weak C/EBP α nuclear staining is seen in astroglial-enriched cultures. Scale bar = 20 μ m.

port to damaged neurons, clear cellular debris, and fight infections (Kim and de Vellis, 2005). However, activated microglia are also able to release potentially neurotoxic compounds, such as NO, O₂⁻, TNF- α , glutamate, or proteases, supporting the hypothesis that the activation of microglia may contribute to pathogenesis in some neurological disorders (Block and Hong, 2005). To be able to potentiate the beneficial side of microglial activation and to inhibit its neurotoxic side, it is critical to understand how this response is regulated. Transcription

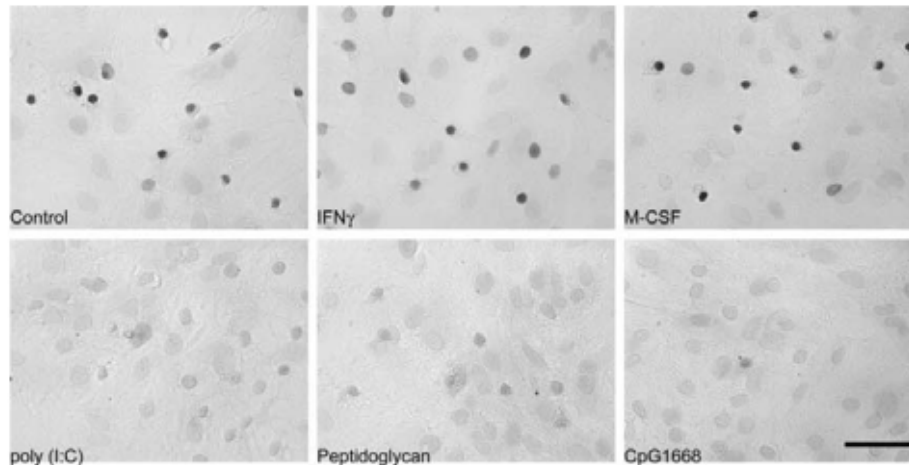


Fig. 5. C/EBP α down-regulation by TLR agonists but not by cytokines. Mixed glial cultures were treated for 16 hr with TLR agonists or cytokines, and C/EBP α was identified by immunocytochemistry. Numerous C/EBP α -immunoreactive nuclei are seen in untreated control cultures. No changes in the intensity of C/EBP α immunoreactivity were induced by IFN γ (40 ng/ml) or M-CSF (200 ng/ml).

In contrast, the TLR agonists poly(I:C) (10 μ g/ml), CpG1668 (0.1 μ M), and peptidoglycan (1 μ g/ml) drastically reduced C/EBP α nuclear staining, as seen before with LPS. The images are representative of an experiment repeated three times with the same result. Scale bar = 50 μ m.

factors play a key role in the regulation of complex processes such as microglial activation, in which the expression of many genes is altered. The transcription factor C/EBP α regulates the expression of important genes in microglial activation, but it has received little attention with regard to glial cells. We have therefore undertaken a study to characterize C/EBP α expression in glial cells *in vitro* and to determine how C/EBP α expression is affected in glial activation.

In this study, we show that C/EBP α is expressed by microglial cells both in mixed glial and in microglial-enriched primary cultures under control conditions. This is the first unequivocal demonstration of microglial C/EBP α expression *in vitro*, a finding suggested in a recent microarray study (Walker et al., 2006), and it also agrees with the reported microglial expression of C/EBP α *in vivo* (Walton et al., 1998). In this study, C/EBP α expression was detected in activated but not in quiescent microglia. Our observation of basal C/EBP α expression by microglia in culture probably reflects a basal level of activation in cultured microglial cells. Regarding the expression of C/EBP α in astrocytes, the literature is short and conflicting. Yano et al. (1996) and Walton et al. (1998) did not detect astroglial C/EBP α expression *in vitro* and *in vivo*, respectively. In contrast, Cristiano et al. (2005) showed the presence of C/EBP α in protein extracts from primary astroglial cultures. This signal, or part of it, could be microglial, insofar as the authors did not show any double staining, and microglial cells are always present, though to a variable extent, in

primary astroglial-enriched cultures. In our study, we have observed that most astrocytes are devoid of C/EBP α but occasional GFAP-positive astrocytes with weak C/EBP α immunoreactivity were observed. Therefore, we conclude that astrocytes are able to express C/EBP α *in vitro* but in any case with a much lower level of expression than microglial cells.

After the characterization of glial C/EBP α expression *in vitro* under control conditions, we were interested in analyzing C/EBP α expression in activated glial cells. C/EBP α has been studied in the brain in three situations in which glial activation occurs: after a cerebral hypoxia ischemia injury (Walton et al., 1998), after systemic LPS injection (Saito et al., 1999), and in Alzheimer's disease brain (Blalock et al., 2004). In these three reports, C/EBP α was up-regulated in the brain. In the study of Walton et al. (1998) C/EBP α up-regulation was shown to occur in activated microglial cells, whereas, in the other two studies, the C/EBP α increase was not resolved at the cellular level. These studies suggest that C/EBP α up-regulation could be a common feature in the glial activation response. However, Walker et al. (2006) have recently shown that C/EBP α mRNA is decreased in cultured microglial cells treated with amyloid β peptide. We were therefore interested in studying in detail the pattern of changes in C/EBP α expression in an *in vitro* model of glial activation. We used LPS as a tool to induce glial activation. LPS, the major structural component of the outer wall of gram-negative bacteria, is a prototypical activator of astrocytes

and microglia, primarily by binding to TLR4. LPS has been reported to down-regulate (Alam et al., 1992; An et al., 1996; Hsieh et al., 1998; Tengku-Muhammad et al., 2000) or up-regulate (Granger et al., 2000; Mackey and Darlington, 2004; Kido et al., 2005) C/EBP α expression in various tissues or cells. This is the first study of LPS-induced changes in glial C/EBP α expression. We show here that LPS strongly decreases C/EBP α mRNA and protein levels in cultured glial cells. The effect is rapid, with a marked reduction in mRNA levels at 2 hr; it is elicited by LPS concentrations as low as 1 ng/ml; and it occurs in microglial cells. These findings are in line with the amyloid β peptide-induced down-regulation of C/EBP α in cultured microglia (Walker et al., 2006) and not with the above-mentioned reports of C/EBP α up-regulation in *in vivo* experimental or pathological situations in which glial activation occurs (Walton et al., 1998; Saito et al., 1999; Blalock et al., 2004). The LPS-induced down-regulation of C/EBP α in microglia could be mediated by Sp1, because this transcription factor is rapidly activated (15–30 min) by LPS in monocytes/macrophages (Jarvis and Qureshi, 1997; Sakuta et al., 2001) and is able to repress the C/EBP α promoter in adipocytes (Tang et al., 1999).

Probably the most interesting observation in this study is that C/EBP α down-regulation is induced by all TLR agonists tested, acting on TLR2, TLR3, TLR4, or TLR9, but not by key proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, or IFN γ or the microglial mitogen M-CSF. This is a novel finding. Apart from the above-mentioned studies on LPS and C/EBP α there is only one study to our knowledge on the effects of TLR agonists on C/EBP α (Takeshita et al., 2004). In this work, the TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotide K3 was found to down-regulate C/EBP α in a human myeloma cell line. TLR are receptors recognizing pathogen-associated molecular patterns (Netea et al., 2004), which can also be activated by molecules derived from injured tissue (Karikó et al., 2004). Through TLR signalling, these danger signals elicit the activation of genes that are important for host defense, such as proinflammatory cytokine genes (Netea et al., 2004). In microglial cells, TLR agonists (Olson and Miller, 2004) and proinflammatory cytokines (John et al., 2003) elicit microglial activation, but to our knowledge a proper comparison between the microglial responses induced by the two stimuli has not been made. For human monocytes, Farina et al. (2004) have reported that TLR agonists induce higher TNF α production than proinflammatory cytokines. Also, TLR agonists induce responses in monocytes that are not induced by proinflammatory cytokines, such as CD150 expression and CD38, CD86, and ICOS-L down-regulation. These observations suggest that TLR agonists induce a broader and more robust response than proinflammatory cytokines, whose effects are more specific. In this context, even though we cannot exclude the possibility that other cytokines not tested in this study or, especially, a combination of

cytokines could down-regulate C/EBP α in microglial cells, our findings seem to indicate that C/EBP α down-regulation is part of the microglial response induced by TLR agonists.

It has been shown that C/EBP α may promote the expression of M-CSF receptor (Zhang et al., 1996) and TNF α (Wedel et al., 1996) in monocytes and of NOS-2 in endothelial cells (Kolyada and Madias, 2001), genes that are up-regulated in activated glia. Our findings suggest that C/EBP α does not participate in the expression of these genes in glial activation, because we observed a clear down-regulation of C/EBP α in activated microglial cells. We think instead that the physiological role of C/EBP α down-regulation in microglial activation is to allow more C/EBP β -C/EBP δ homo- and heterodimers to be formed, as it occurs in liver in the acute-phase response (Poli, 1998). Finally, overexpression of C/EBP α in hepatocytes blocks LPS-induced COX-2 expression (Callejas et al., 2000); this gene is up-regulated in microglial activation. C/EBP α down-regulation could therefore be a way to derepress the expression of COX-2 and maybe other proinflammatory genes in microglial activation.

In conclusion, we provide evidence that the transcription factor C/EBP α is expressed *in vitro* by microglia and that LPS and other TLR agonists markedly down-regulate microglial C/EBP α expression. Further studies with other experimental models of glial activation, particularly *in vivo* models, will be important to establish the role and significance of C/EBP α down-regulation in microglial activation. If reduction of C/EBP α levels is proved to be a necessary element for increased gene expression in glial activation, then restoring C/EBP α levels could be a strategy to attenuate the neurotoxic effects of glial activation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Oriol Bachs for the generous gift of anti-p36 antibody and to Estefanía de la Fuente for technical support. A.E.-O. is the recipient of a predoctoral grant from IDIBAPS, and J.S. is the recipient of a Ramón y Cajal contract from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

REFERENCES

- Alam T, An MR, Papaconstantinou J. 1992. Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem* 267:5021–5024.
- An MR, Hsieh CC, Reisner PD, Rabek JP, Scott SG, Kuninger DT, Papaconstantinou J. 1996. Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBP α and C/EBP β isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response. *Mol Cell Biol* 16:2295–2306.
- Birkenmeier EH, Gwynn B, Howard S, Jerry J, Gordon JI, Landschulz WH, McKnight SL. 1989. Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev* 3:1146–1156.
- Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. 2004. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2173–2178.

- Block ML, Hong JS. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76:77–98.
- Calkhoven CF, Muller C, Leutz A. 2000. Translational control of C/EBP α and C/EBP β isoform expression. *Genes Dev* 14:1920–1932.
- Callejas NA, Bosca L, Williams CS, DuBois RN, Martin-Sanz P. 2000. Regulation of cyclooxygenase 2 expression in hepatocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins. *Gastroenterology* 119:493–501.
- Cassel TN, Nordlund-Moller L, Andersson O, Gustafsson JA, Nord M. 2000. C/EBP α and C/EBP δ activate the clara cell secretory protein gene through interaction with two adjacent C/EBP-binding sites. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:469–480.
- Chih DY, Park DJ, Gross M, Idos G, Vuong PT, Hiram T, Chumakov AM, Said J, Koefler HP. 2004. Protein partners of C/EBP ϵ . *Exp Hematol* 32:1173–1181.
- Cristiano L, Cimini A, Moreno S, Ragnelli AM, Paola CM. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and related transcription factors in differentiating astrocyte cultures. *Neuroscience* 131:577–587.
- Diehl AM, Yang SQ. 1994. Regenerative changes in C/EBP α and C/EBP β expression modulate binding to the C/EBP site in the c-fos promoter. *Hepatology* 19:447–456.
- Farina C, Theil D, Semlinger B, Hohlfeld R, Meinel E. 2004. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol* 16:799–809.
- Granger RL, Hughes TR, Ramji DP. 2000. Stimulus- and cell-type-specific regulation of CCAAT-enhancer binding protein isoforms in glomerular mesangial cells by lipopolysaccharide and cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1501:171–179.
- Hsieh CC, Xiong W, Xie Q, Rabek JP, Scott SG, An MR, Reisner PD, Kuninger DT, Papaconstantinou J. 1998. Effects of age on the posttranscriptional regulation of CCAAT/enhancer binding protein α and CCAAT/enhancer binding protein β isoform synthesis in control and LPS-treated livers. *Mol Biol Cell* 9:1479–1494.
- Jarvis BW, Qureshi N. 1997. Inhibition of lipopolysaccharide-induced transcription factor Sp1 binding by spectrally pure diphosphoryl lipid A from *Rhodobacter sphaeroides*, protein kinase inhibitor H-8, and dexamethasone. *Infect Immun* 65:1640–1643.
- John GR, Lee SC, Brosnan CF. 2003. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* 9:10–22.
- Kariko K, Weissman D, Welsh FA. 2004. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling—a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:1288–1304.
- Kido J, Hayashi N, Kataoka M, Nagata T. 2005. Calprotectin expression in human monocytes: induction by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β . *J Periodontol* 76:437–442.
- Kim SU, de Vellis J. 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302–313.
- Kolyada AY, Madias NE. 2001. Transcriptional regulation of the human iNOS gene by IL-1 β in endothelial cells. *Mol Med* 7:329–343.
- Mackey SL, Darlington GJ. 2004. CCAAT enhancer-binding protein α is required for interleukin-6 receptor α signaling in newborn hepatocytes. *J Biol Chem* 279:16206–16213.
- Milner R, Campbell IL. 2002. Cytokines regulate microglial adhesion to laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the α 6 β 1 integrin. *J Neurosci* 22:1562–1572.
- Netea MG, van der GC, Van der Meer JW, Kullberg BJ. 2004. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leuk Biol* 75:749–755.
- Olson JK, Miller SD. 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173:3916–3924.
- Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. 2001. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 27:263–270.
- Poli V. 1998. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273:29279–29282.
- Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. 1998. CCAAT/enhancer binding protein α is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* 18:4301–4314.
- Saito H, Shultz LD, Sinha M, Papaconstantinou J. 1999. Induction of the α 1(1)-antichymotrypsin gene in the brain associated with TGF- β 1 deficiency or systemic administration of endotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 263:270–275.
- Sakuta T, Matsushita K, Yamaguchi N, Oyama T, Motani R, Koga T, Nagaoka S, Abeyama K, Maruyama I, Takada H, Torii M. 2001. Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. *J Med Microbiol* 50:233–237.
- Saura J, Tusell JM, Serratos J. 2003. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44:183–189.
- Scott LM, Civin CI, Rorth P, Friedman AD. 1992. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood* 80:1725–1735.
- Shuman JD, Cheong J, Coligan JE. 1997. ATF-2 and C/EBP α can form a heterodimeric DNA binding complex in vitro. Functional implications for transcriptional regulation. *J Biol Chem* 272:12793–12800.
- Takeshita F, Suzuki K, Sasaki S, Ishii N, Klinman DM, Ishii KJ. 2004. Transcriptional regulation of the human TLR9 gene. *J Immunol* 173:2552–2561.
- Tang QQ, Jiang MS, Lane MD. 1999. Repressive effect of Sp1 on the C/EBP α gene promoter: role in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 19:4855–4865.
- Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Ranki H, Cryer A, Ramji DP. 2000. Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines. *Cytokine* 12:1430–1436.
- Walker DG, Link J, Lue LF, Dalsing-Hernandez JE, Boyes BE. 2006. Gene expression changes by amyloid β peptide-stimulated human postmortem brain microglia identify activation of multiple inflammatory processes. *J Leuk Biol* 79:596–610.
- Walton M, Saura J, Young D, MacGibbon G, Hansen W, Lawlor P, Sirimanne E, Gluckman P, Dragunow M. 1998. CCAAT-enhancer binding protein α is expressed in activated microglial cells after brain injury. *Brain Res Mol Brain Res* 61:11–22.
- Wedel A, Sulski G, Ziegler-Heitbrock HW. 1996. CCAAT/enhancer binding protein is involved in the expression of the tumour necrosis factor gene in human monocytes. *Cytokine* 8:335–341.
- Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117:663–676.
- Yano S, Fukunaga K, Takiguchi M, Ushio Y, Mori M, Miyamoto E. 1996. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein family members by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes. *J Biol Chem* 271:23520–23527.
- Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM, Hiebert SW, Tenen DG. 1996. CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF α 2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol Cell Biol* 16:1231–1240.

4.3 TERCER TRABAJO

CCAAT/enhancer binding protein delta in microglial activation

Ejarque-Ortiz A., Gresa N., Straccia M., Carme Solà C., Maria Tusell J.M.,
Serratosa J., Saura J.

Submitted to Journal of Neurochemistry

El factor de transcripción CCAAT/enhancer binding protein δ (C/EBP δ) puede regular la transcripción de genes que juegan un importante papel en la activación glial. Estudios anteriores muestran la expresión astrogial de C/EBP δ , pero la expresión en las células microgliales no ha sido estudiada, excepto en dos estudios de microarrays. En este trabajo, mediante la utilización de cultivos primarios gliales murinos y cultivos con la línea celular BV2, demostramos el claro incremento de esta proteína cuando se estimulan estas células con LPS. El aumento inducido por el LPS es similar en astrocitos y microglía, y se produce de una forma tiempo-dependiente, con un efecto máximo a las 3 horas a nivel del ARNm y a las 8 horas a nivel proteico, y concentración-dependiente, con un efecto máximo a 100 ng/ml. De forma similar al LPS, agonistas de los receptores TLR 2, 3 y 9 producen un aumento similar de C/EBP δ , que se puede prevenir con un inhibidor de la extracelular signal-regulated kinase. C/EBP δ de la microglía activada se une in vitro al promotor de COX-2 y forma complejos con C/EBP β y con la subunidad p65 de NF- κ B. Estos resultados sugieren un posible papel de C/EBP δ en la regulación de genes proinflamatorios en la activación microglial.

Submitted to the Journal of Neurochemistry

Feb 28 2008

CCAAT/enhancer binding protein delta in microglial activation

Aroa Ejarque-Ortiz, Núria Gresa-Arribas, Marco Straccia, Carme Solà, Josep Maria Tusell, Joan Serratosa, Josep Saura

Department of Cerebral Ischaemia and Neurodegeneration, IIBB, CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain

Address for correspondence:

Josep Saura

Biochemistry Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS

Casanova 143

08036-Barcelona

Spain

e-mail: josepsaura@ub.edu

List of abbreviations:

C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein

COX-2: cyclooxygenase

ERK: extracellular signal-regulated kinase

GFAP: glial fibrillary acidic protein

IFN γ : interferon- γ

IL: interleukin

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LPS: lipopolysaccharide

MAP kinase: mitogen-activated protein kinase

NF- κ B: nuclear factor- κ B

NOS-2: NO synthase-2

TLR: toll-like receptors

Abstract

The transcription factor CCAAT/enhancer binding protein δ (C/EBP δ) can regulate transcription of genes that play important roles in glial activation. Previous studies have shown the astroglial expression of C/EBP δ but the microglial expression of C/EBP δ remains virtually unexplored, with the exception of two microarray studies. In this report, using murine primary cultures and BV2 cells we clearly demonstrate the microglial expression of C/EBP δ and its upregulation when these cells are activated with lipopolysaccharide. In fact, lipopolysaccharide induces a similar C/EBP δ upregulation in astrocytes and microglia. This effect is time-dependent, with a maximum effect at 3 hours at mRNA level and at 8 hours at protein level, and concentration-dependent, with a maximum effect at 100 ng/mL. The lipopolysaccharide-induced C/EBP δ upregulation in microglia is mimicked by agonists of the toll-like receptors 2, 3 and 9 and can be prevented by an inhibitor of the extracellular signal-regulated kinase. C/EBP δ from activated microglia binds in vitro to the cyclooxygenase-2 promoter and forms complexes with C/EBP β and the p65 subunit of NF- κ B. These results point to a possible role of C/EBP δ in the regulation of proinflammatory genes in microglial activation.

Keywords: Glial activation, transcription factors, astrocyte, toll-like receptors, interferon- γ , NF- κ B

Running title: C/EBP δ in microglia

CCAAT/enhancer binding protein δ (C/EBP δ) is a transcription factor of the b-zip family. Unlike other C/EBP members such as C/EBP α , β or ϵ , for which isoforms exist, there is a single C/EBP δ protein (Lekstrom-Himes et al, 1998b). C/EBP δ regulates gene expression by binding to C/EBP binding sites (RTTGCGYAAAY, R=A/G, Y=C/T) (Osada et al, 1996b) as homo- or heterodimers. C/EBP β is the most common C/EBP δ protein partner (Kinoshita et al, 1992; Lee et al, 1998c; Caivano et al, 2001b; Giri et al, 2002), but dimerization with C/EBP α (Cao et al, 1991b), nuclear factor- κ B (NF- κ B)-p65 (Ray et al, 1995), NF- κ B-p50 (Ruocco et al, 1996) or PU.1 (Nagulapalli et al, 1995) has also been observed. C/EBP δ participates in the regulation of various physiological processes including growth and differentiation of adipocytes (Lekstrom-Himes et al, 1998a) and epithelial cells (O'Rourke et al, 1999), tumour suppression (Agrawal et al, 2007a), learning and memory (Sterneck et al, 1998b) and inflammation (Poli, 1998c).

One of the hallmarks of inflammation in the CNS is glial activation, i.e. the activation of astrocytes and microglia. Glial activation can be triggered by various stimuli such as signals from damaged cells, cell debris, inflammatory cytokines, abnormal deposits or pathogen-associated molecular patterns resulting in different programmes of glial activation (Town et al, 2005). The activation response triggered by pathogen-associated molecular patterns in glial cells is mediated by toll-like receptors (TLR) which are present in microglia and to a lesser extent in astrocytes (Bsibsi et al, 2002; Olson et al, 2004; Jack et al, 2005; Farina et al, 2007a; Carpentier et al, 2008b). In glial cells TLR agonists such as the TLR4 agonist lipopolysaccharide (LPS) induce an innate immune response characterized by the expression of numerous proinflammatory mediators (Carpentier et al, 2008a). TLRs signal via a common pathway in which mitogen-activated protein (MAP) kinases and NF- κ B play a critical role (Kawai et al, 2007).

C/EBP δ expression has been often observed in astroglial cultures and such expression is upregulated by proinflammatory stimuli (Cardinaux et al, 2000c; Lee et al, 1998b; Giri et al, 2004a; Won et al, 2003b; Li et al, 2004b). In contrast, microglial C/EBP δ expression has only been reported in microarray studies (Paglinawan et al, 2003c; Lund et al, 2006c) and to our knowledge has not been studied in detail. Since C/EBP δ regulates the expression of many genes that are upregulated in activated microglia we hypothesized that C/EBP δ may play an important role in microglial activation. To test

this hypothesis we have conducted a study to characterize the expression of C/EBP δ in cultured microglia in control and in activated conditions.

MATERIALS AND METHODS

Glial cultures

Experiments were carried out in accordance with the Guidelines of the European Union Council (86/609/EU), following the Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) for the use of laboratory animals and approved by the Ethics and Scientific Committees from the Hospital Clínic de Barcelona. Three types of primary glial cultures were prepared: mixed glial cultures, microglial cultures and astroglial cultures. These cultures were all prepared from 1- or 2-day-old neonatal C57BL/6 mice (Charles River, Lyon, France). The culture medium used for all cultures consisted of Dulbecco's modified Eagle medium-F-12 nutrient mixture (#31330-038, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), fetal bovine serum 10% (#10270-106, Invitrogen), penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/mL (#15140-114, Invitrogen) and amphotericin B 0.5 μ g/mL (#15290-018, Invitrogen).

For preparation of mixed glial cultures, the cerebral cortices were dissected, carefully stripped of their meninges and digested with 0.25% trypsin (#25200-072, Invitrogen) for 25 min at 37°C. Trypsinization was stopped by adding an equal volume of culture medium containing 0.02% deoxyribonuclease I (#D-5025, Sigma, St.Louis, MO, USA). The solution was pelleted (5 min, 200 g), resuspended in culture medium and brought to a single cell suspension by repeated pipetting followed by passage through a 105 μ m pore mesh. Cells were seeded at a density of 250.000 cells/mL (=62.500 cells/cm²) and cultured at 37°C in humidified 5% CO₂-95% air. Medium was replaced every 5-7 days. Cultures reached confluency after 7-10 days in vitro and were used between 12 and 15 days in vitro. At this point they typically consisted of 75% type-I astrocytes and 25% microglia.

Mouse microglial cultures were prepared by mild trypsinization as described (Saura et al, 2003c). Briefly, confluent mixed glial cultures were treated for 30 min with a low trypsin concentration (0.06%) in the presence of 0.25 mM EDTA and 0.5 mM Ca²⁺. This treatment results in the detachment of an intact layer of cells containing virtually all the astrocytes and leaves a population of firmly attached cells identified as >98%

microglia. Twenty-four hours after isolation by this procedure microglial cultures were used.

Mouse astroglial cultures were prepared by seeding cortical cells prepared as for mixed glial cultures on plates coated with laminin (20 µg/mL, #23017-015, Invitrogen). Laminin-coating favours astroglial growth and inhibits microglial growth (Milner et al, 2002). When confluent, cultures were treated with 10 µM cytosine arabinoside for 4 days. Cultures were used one day after the end of cytosine arabinoside treatment. The vast majority of cells were type-I astrocytes and microglia were less than 2%.

The mouse microglial cell line BV2, which was generated from primary mouse microglia transfected with a v-raf/v-myc oncogene (Blasi et al, 1990a) was maintained at 37°C in RPMI medium (#21875-034, Invitrogen) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics under a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air.

Cell treatments

For all experiments with primary culture, medium was changed 24 hours prior to treatments.

For experiments with BV2, cells were seeded at a density of 100000 cells/mL 42 hours before treatment. Drugs were added to cultured cells as x25 stocks. MAP kinase inhibitors were added 1 hour prior to LPS treatment.

Isolation of nuclear proteins

For Western blots 3, 5, 6 and 3 wells (950-mm²) of mixed glial, astroglial, microglial cultures and BV2 cultures, respectively, were used per condition. For streptavidin-agarose pulldown assay and co-immunoprecipitation experiments a T75 flask from BV2 cultures was used per condition. Cells were scrapped in cold PBS, centrifuged for 4 min at 7000 g and the resulting pellet was resuspended in 400 µL of buffer A: 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol and 0.1 mM EGTA and cells were swollen on ice for 15 min. After addition of 25 µL of 10% Nonidet-40 (buffer B), cells were vigorously vortexed for 10 s. After 10 min incubation on ice, the broken cells were successively spun for 10 min at 3000 g and for 5 min at 14000 g. The pellet was resuspended for Western Blot in 50 µL of RIPA buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride and 1 mM dithiothreitol) and sonicated for 10 secs. Protein concentration was determined by the Lowry assay. For streptavidin-agarose

pull-down assay and co-immunoprecipitation pellet was resuspended in 130 μ L of buffer B2 consisting of PBS with 1mM EDTA and 1mM DTT, and sonicated 3 x secs. Once sonicated, samples were centrifugated for 5 min at 10000 g and supernatant containing nuclear proteins was collected and protein amount was determined by the Lowry assay. Solutions A, B, B2 and PBS were supplemented with the protease inhibitor cocktail Complete® (#1836145, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Western blot

20-40 μ g of protein of denatured (5 min, 100°C) nuclear extracts were subjected to SDS-PAGE on a 15% polyacrilamide gel and transferred to a PVDF membrane (#IPVH00010, Millipore, Bedford, MA, USA). The membranes were processed as follows: 1) 5 min in Tris-buffered saline (TBS, 20 mM Tris, 0.15M NaCl, pH=7.5); 2) 10 s in methanol; 3) air dry; 4) overnight incubation at 4°C on primary antibody (rabbit anti-C/EBP δ (#C-22, Santa Cruz, Temecula, CA, USA) 1:500; goat anti-lamin B (#sc-6217, Santa Cruz) 1:5000; rabbit anti p65 (#sc-372, Santa Cruz) 1:500; ; rabbit anti C/EBP β (#sc-150, Santa Cruz) 1:500), diluted in immunoblot buffer (TBS containing 0.05% Tween-20 and 5% nonfat dry milk); 5) 2x 15 s in TBS 0.05% Tween-20; 6) 1 hour in HRP-labelled anti-rabbit (#NA934, Amersham, Buckinghamshire, UK) or anti-goat (#A9432, Sigma) antibodies diluted 1:2000 in immunoblot buffer; 7) 2x 30min washes in TBS-0.05% Tween-20; 8) 5 min in ECL-Plus (#RPN2132, Amersham). Membranes were exposed to the camera of a VersaDoc system (BioRad) and chemiluminescence was quantified using Quantity One 5.4.1 software (BioRad).

Immunocytochemistry

Cultured cells were fixed with 4 % paraformaldehyde for 30 min at room temperature. When immunocytochemistry was revealed with diaminobenzidine the protocol was: 7 min in 0.3% H₂O₂ in methanol, 2 x 15 min in PBS, overnight in primary rabbit anti C/EBP δ antibody (1:1000), 2 x 15 min in PBS, 1 h in biotinylated secondary anti-rabbit antibody (1:1000, Pierce, Rockford, IL, USA), 2 x 15 min in PBS, 1 h in ExtrAvidin-HRP (1:500; #E-2886, Sigma), 5-10 min in diaminobenzidine (1 mg/mL), 0.15% H₂O₂ in PBS. All steps were performed at room temperature except primary antibody incubation (4°C). All antibodies were diluted in PBS containing 7% normal goat serum. For double immunofluorescence cells were fixed with paraformaldehyde as above. Rabbit anti-C/EBP δ (1:300) was coincubated as primary antibody with mouse anti-GFAP (1:500,

#G-3893, Sigma) or rat anti-CD11b (1:400, clone 5C6, Serotec, Oxford, UK) overnight at 4°C. For double labeling, the secondary antibody Alexa 546-labelled goat anti-rabbit (1:1000; #11010, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was coincubated with Alexa 488-labelled goat anti-mouse (1:1000; #A11017, Molecular Probes) or biotin-labelled goat anti-rat (1:300; #BA-9400, Vector) followed by Alexa 488-labelled Streptavidin (1:500, #S11223, Molecular Probes). Incubations with secondary antibodies were performed for 1h at room temperature in a dark chamber. All samples were photographed on a Nikon fluorescence microscope Eclipse E1000 equipped with a digital camera Color View 12 and powered by a HBO 100 lamp.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was isolated with Absolutely RNA Miniprep kit (#400800, Stratagene, La Jolla, CA, USA) and reverse transcribed with random primers using Sensiscript-RT (#205211, Qiagen, Hilden, Germany). The primers used to amplify mouse C/EBP δ mRNA were 5'-CTCCACGACTCCTGCCATGT-3' (forward) and 5'-GAAGAGGTCGGCGAAGAGTTC-3' (reverse). For normalization of Ct values to an endogenous control the following mouse actin mRNA primers were used: 5'-CAACGAGCGGTTCGGATG-3' (forward) and 5'-GCCACAGGATTCCATACCCA-3' (reverse). Real-time PCR was carried out with IQ SYBRGREEN SuperMix (#170-8882, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and iCycler IQ equipment (Bio-Rad Laboratories). Primer efficiency was estimated from standard curves generated by dilution of a cDNA pool. Samples were run for 40 cycles (30 secs 95°C, 1 min 60°C, 30 secs 72 °C). Two samples per condition were analyzed in triplicate in each experiment and 4 independent experiments were performed.

Streptavidin-agarose pulldown assay

C/EBP δ binding to a C/EBP-specific probe in the COX-2 promoter was determined by a streptavidin-agarose pulldown assay (Wu, 2006a). A 19-bp 5'-biotinylated double-strand COX-2 promoter probe was used in the binding experiment (5'-GGTTCTTGCGCAACTCACT-3'), and a mutated form was used as a specificity control (5'-GGTTCTTGCGCAACTCACT-3'). Nuclear extracts (400 μ g protein) were incubated in a 500 μ L mixture of buffer B2 (PBS with 1mM EDTA and 1mM DTT supplemented with the protease inhibitor cocktail Complete® (#1836145, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)) containing 4 μ g of a 5'-biotinylated probe and 4% streptavidin-

conjugated agarose beads (Sigma, S1638) at room temperature for 2 hours in a rotating shaker. A control was created to ensure that C/EBP δ did not bind to agarose beads by incubating 400 μ g nuclear extracts in a 500 μ L mixture without the 5'-biotinylated probe. Beads were pelleted by centrifugation, and washed 3 times. Proteins were recovered by adding 40 μ L of loading buffer, heating at 95 °C for 5 min and centrifugating at 7000 g for 30 seconds. Proteins were analyzed by Western Blot.

Immunoprecipitation

300 μ g of nuclear proteins, extracted as described above, were precleared by incubating for 30 min at 4°C in 500 μ l of IP buffer (Tris 20 mM pH=7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton-100 1%) containing 10% normal rabbit serum and 1% protein A-agarose beads (Sigma, P3476). After a 5 min centrifugation at 800 g the supernatant was collected and incubated for 2 hr at 4°C with 0.5 μ g of rabbit anti-C/EBP δ antibody. 20 μ l of 25% protein A-agarose beads were added and incubated overnight at 4°C in constant agitation. Beads were washed three times with IP buffer, resuspended in x4 sample buffer and boiled. Immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blot as described above.

Statistics

Statistical analysis of Western blot densitometric measurements and quantitative real-time PCR Ct estimates were performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

RESULTS

LPS increases C/EBP δ in astrocytes and microglia from primary mixed glial cultures

We were first interested to study whether LPS affects C/EBP δ levels in primary mouse cortical mixed glial cultures, composed mainly by astrocytes and microglia. LPS (100 ng/mL, 24 hours) markedly increased C/EBP δ levels in the nuclear fraction, identified as a single band of 32 kDa by Western blot (Fig 1a). This finding was confirmed by immunocytochemistry. C/EBP δ immunoreactivity was observed in the nuclei of most cells from primary mouse cortical mixed glial cultures and the intensity of the nuclear C/EBP δ immunostaining was increased by LPS (100 ng/mL, 24 hours) (Fig 1B-E). By double immunofluorescence LPS-induced increase in C/EBP δ immunoreactivity was

observed both in astrocytes and microglia identified by glial fibrillary acidic protein (GFAP) and CD11b immunostaining, respectively (Fig 1B-E).

LPS-induced increase in C/EBP δ in astrocytes and microglia is a direct effect on these two cell types

LPS-induced effects in astrocytes from mixed glial cultures are sometimes mediated by factors produced by LPS activated microglia and the opposite situation is also possible. In order to determine whether the LPS-induced increases in nuclear C/EBP δ on astrocytes and microglia from mixed glial cultures were direct effects on these two cell types we analyzed LPS-induced changes in C/EBP δ in astroglial-enriched and microglial cultures. As shown in figure 2, LPS increased C/EBP δ in astrocytes from astroglial cultures and in microglia from microglial cultures indicating that the LPS-induced increase in C/EBP δ is a direct effect in both cell types.

LPS-induced increase in C/EBP δ in microglia: time-course and concentration-response.

The up-regulation of C/EBP δ in activated astrocytes is a well-documented observation (see Introduction). In contrast, a similar effect has only been reported in microglia in microarray studies (Paglinawan et al, 2003b; Lund et al, 2006b). We were therefore interested to further explore the C/EBP δ upregulation in activated microglia using LPS as the activating stimulus and the murine microglial cell line BV2. The experiments shown in figure 3 revealed that LPS increases C/EBP δ expression in BV2 cells in a time-dependent manner. The maximum increase in mRNA was observed 3 hours after LPS (Fig 3a) and in nuclear protein 8 hours after LPS (Fig 3B). The LPS-induced increase in C/EBP δ nuclear protein levels was also concentration-dependent and the maximum effect was obtained with 100ng/mL LPS (Fig 3C,D).

TLR agonists increase microglial C/EBP δ expression

We were next interested to determine whether the upregulation of C/EBP δ induced by the TLR4 agonist LPS was a common pathway in microglial activation induced by TLR agonists. To this end we studied the effects on C/EBP δ levels caused by various TLR agonists and also by interferon- γ (IFN γ), a proinflammatory cytokine that activates microglia independently of TLR engagement. As shown in figure 4, C/EBP δ levels were upregulated by all the TLR agonists tested: poly (I:C) (TLR3 agonist, 100 μ g/mL),

CpG1668 (TLR9 agonist, 1 μ M) and peptidoglycan (TLR2 agonist, 10 μ g/mL). In contrast, IFN γ (2 ng/mL) did not significantly increase nuclear C/EBP δ nuclear levels when applying the same ANOVA analysis. However, when IFN γ values were compared with control values with a paired Student t-test, IFN γ -induced C/EBP δ protein levels were significantly higher ($p=0.018$).

Signal transduction of LPS-induced C/EBP δ upregulation in microglia

To determine whether MAP kinases were involved in the LPS-induced upregulation of C/EBP δ in microglial cells the selective inhibitors U0126 (extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor, 10 μ M), SP600125 (c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor, 25 μ M) and SB203580 (p38 inhibitor, 20 μ M) were used (Fig 5). U0126 markedly reduced the LPS-induced increase in nuclear C/EBP δ levels (-85%, $p < 0.01$) whereas SP600125 and SB203580 had no significant effect. Significant reductions were also observed by coadministration of U0126 + SB203580, SP600125 + SB203580 and with the simultaneous use of the three inhibitors but these conditions were toxic to BV2 cells (not shown).

C/EBP δ in activated microglia binds to the COX-2 promoter

We were next interested to study whether C/EBP δ protein in activated microglia has DNA binding activity. To demonstrate this, nuclear proteins from control and LPS-treated BV2 microglial cells were incubated with biotinylated oligonucleotides containing the C/EBP sequence of the murine cyclooxygenase-2 (COX-2) promoter. Bound proteins were pulled down with streptavidin-agarose beads and identified by SDS-PAGE. As shown in figure 6A, C/EBP δ binding to the COX-2 promoter was observed in nuclear proteins from LPS-treated but not from control microglia. The specificity of this protein-DNA binding was demonstrated by the absence of C/EBP δ binding to a mutated oligonucleotide.

Dimerization of C/EBP δ in activated microglia

C/EBP δ regulates transcription by binding to DNA as homo- or heterodimers. We were therefore interested to identify protein partners of C/EBP δ in nuclear extracts of activated microglia. Immunoprecipitation experiments showed that in microglia treated with LPS (100 ng/ml) or LPS (100 ng/ml) + IFN γ (0.5 ng/ml) for 4 hours,

C/EBP δ was forming complexes with the C/EBP β isoforms LAP and LIP as well as with the p65 subunit of NF- κ B (Fig 6B)

DISCUSSION

In this study we have confirmed previous reports showing the astroglial expression of C/EBP δ and its upregulation upon astroglial activation by proinflammatory stimuli (Cardinaux et al, 2000b; Lee et al, 1998a; Giri et al, 2004b; Lee et al, 1998d; Li et al, 2004a). In addition, we have observed that not only astrocytes but also microglia express C/EBP δ and that C/EBP δ expression is markedly increased in microglial activation. This is the most relevant finding from this study. Two microarray studies have reported upregulation of C/EBP δ mRNA in cultured microglia induced by IFN γ + tumour necrosis factor- α (Paglinawan et al, 2003a) and LPS (Lund et al, 2006a) but this effect was not confirmed in these studies by additional experiments. The present study clearly demonstrates that C/EBP δ is expressed by microglial cells in vitro and that LPS upregulates C/EBP δ mRNA and protein in a time- and concentration-dependent manner. The expression of C/EBP δ in microglia is interesting because C/EBP sites are found in many proinflammatory genes that are upregulated in activated microglia and are therefore potentially regulated by C/EBP δ (Poli, 1998a; Li et al, 2004d). A direct regulation by C/EBP δ has been demonstrated for the expression of COX-2 in macrophages (Wadleigh et al, 2000), NO synthase-2 (NOS-2) in C6 cells and primary astroglial cultures (Won et al, 2003a), interleukin (IL)-1 β in macrophages (Godambe et al, 1994) or IL-6 in osteoblasts (Ruddy et al, 2004). Interestingly, these are some of the genes most often suggested to participate in deleterious effects of microglial activation (Chao et al, 1996; Minghetti et al, 1998; Block et al, 2007b). This raises the possibility that microglial C/EBP δ could play an orchestrating role in microglial-induced neurotoxic effects as proposed for astroglial C/EBP δ (Li et al, 2004e) or microglial C/EBP β (Ejarque-Ortiz et al, 2007b).

In this study we also show that not only the TLR4 agonist LPS induces a strong increase of C/EBP δ expression in microglia, but also agonists of TLR2, 3 and 9. C/EBP δ induction in non-microglial cells has been reported with TLR4 agonists (Caivano et al, 2001a; Callejas et al, 2000; Hou et al, 2007) and TLR2 agonists (Pennini et al, 2007; Huang et al, 2007b) but not with TLR3 or TLR9 agonists. In contrast to TLR agonists the pleiotropic cytokine IFN γ , also a strong microglial activator (Mount et al, 2007),

caused a much more modest increase in microglial C/EBP δ levels in our study. Previous reports have observed that IFN γ can induce C/EBP δ upregulation (Tengku-Muhammad et al, 2000a; Granger et al, 2000b; Qing et al, 2004) but, in agreement with our data, LPS is a stronger inducer of C/EBP δ upregulation than IFN γ when these two stimuli have been directly compared (Cardinaux et al, 2000a; Uto et al, 2007). TLR agonists and IFN γ are two of the strongest macrophage/microglia activating stimuli. Classical macrophage activation is generally achieved by the combination of TLR agonists and host-derived factors such as IFN γ (Schroder et al, 2006). Both stimuli use different signalling pathways and activate different sets of transcription factors which underlies their synergistic effects. MAP kinases and NF- κ B activation are critical in the signalling pathways of TLR agonists whereas the biological effects of IFN γ are primarily mediated via the JAK/STAT pathway (Schroder et al, 2006). The strong induction of C/EBP δ microglial levels by TLR agonists prompted us to focus on the signalling pathways involved. Experiments with MAP kinases inhibitors revealed that LPS-induced C/EBP δ upregulation was mediated by ERK and not by JNK or p38-MAP kinase. These findings point to c-Rel as a candidate to mediate the downstream effects of ERK on C/EBP δ since c-Rel is an ERK target (Koike et al, 2003) and mediates LPS-induced C/EBP δ transcription in macrophages (Liu et al, 2007).

The astroglial and microglial LPS-induced C/EBP δ upregulation shown here are concomitant with the downregulation of C/EBP α in microglia (Ejarque-Ortiz et al, 2007d) and the upregulation of C/EBP β in astrocytes and microglia (Ejarque-Ortiz et al, 2007c). This pattern of C/EBP α downregulation and C/EBP β and δ upregulation has been observed in a variety of cells and tissues upon treatment with proinflammatory stimuli (Alam et al, 1992b; Tengku-Muhammad et al, 2000b; Granger et al, 2000a). Also, in the acute-phase response the amount of C/EBP α -containing complexes bound to acute-phase gene promoters decreases whereas C/EBP β - and C/EBP δ -containing complexes increase (Chen et al, 1993b; Juan et al, 1993; Alam et al, 1993; Ray et al, 1994a). This switch from C/EBP α to C/EBP β/δ is probably important for the increased transcription of genes such as NOS-2, COX-2, IL-1 β or IL-6 in inflammation. Although C/EBP α has stronger transactivating activity than C/EBP β or δ in some genes (Reddy et al, 2003), in most cases C/EBP δ is the most potent transactivator form (Chen et al, 1993a; Ray et al, 1994b; Huang et al, 1994; Kitami et al, 1999; Hu et al, 1998). The highest transactivating potential of C/EBP δ is not related to a

differential affinity for C/EBP-binding sites since the binding affinities of C/EBP α , β and δ for C/EBP sites are similar (Osada et al, 1996a) in line/accordance with the high degree of homology in the DNA binding domains of C/EBP α , β and δ . Instead, the highest transactivating potential of C/EBP δ when compared to C/EBP α or C/EBP β could be related to the fact that C/EBP δ mRNA codes for a single, activating protein, whereas both C/EBP α and C/EBP β mRNAs code for both activating and inhibitory proteins. Thus, p30-C/EBP α and LIP are inhibitory isoforms of C/EBP α and C/EBP β respectively. A highest transactivating potential of C/EBP δ could also be caused by a stronger effect in the recruitment of coactivators and/or by a stronger capacity to synergize with other transcription factors such as NF- κ B.

A question that remains unanswered in this study is to what extent microglial C/EBP δ expression occurs also in vivo. Increased C/EBP δ expression in brain has been observed in situations in which glial activation occurs such as systemic injection of LPS (Saito et al, 1999a; Alam et al, 1992a) or traumatic brain injury (von Gertten et al, 2005) but this increase has not been resolved at a cellular level. In an animal mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis we have observed C/EBP δ immunoreactivity in microglia which could not be observed in wild type mice, but such signal was cytoplasmatic (Tarabal, Esquerda et al, unpublished observations). It is interesting to note that cytoplasmatic C/EBP δ immunoreactivity has been observed in astrocytes in Alzheimer brain (Li et al, 2004f) and in discrete neuronal populations in spinocerebellar ataxia type 3 (Evert et al, 2006).

In summary, this study shows for the first time the characterization of C/EBP δ expression in microglial activation. Given the central role in microglial activation of some of the potential targets for C/EBP δ , this transcription factor appears as a new candidate to orchestrate gene regulation in this process.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank Elisabetta Blasi for the generous gift of BV2 cells, to Katarzyna Cieslik for advice on the streptavidin-agarose pulldown assay, to Pilar Mancera for technical help and to Olga Tarabal and Josep Esquerda for performing C/EBP δ immunohistochemistry on an ALS mouse model which has finally not been

included in the paper. This work was supported by grants PI040778, PI050658 and PI070455 from Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Health, and V-2006-TV063031-O from Fundació Marató-TV3). AEO is recipient of an IDIBAPS grant and NG and MS of I3P grants from CSIC.

REFERENCES

- Agrawal S., Hofmann W. K., Tidow N., Ehrich M., van den B. D., Koschmieder S., Berdel W. E., Serve H., and Muller-Tidow C. (2007) The C/EBPdelta tumor suppressor is silenced by hypermethylation in acute myeloid leukemia. *Blood* **109**, 3895-3905.
- Alam T., An M. R., Mifflin R. C., Hsieh C. C., Ge X., and Papaconstantinou J. (1993) trans-activation of the alpha 1-acid glycoprotein gene acute phase responsive element by multiple isoforms of C/EBP and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **268**, 15681-15688.
- Alam T., An M. R., and Papaconstantinou J. (1992) Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem* **267**, 5021-5024.
- Blasi E., Barluzzi R., Bocchini V., Mazzolla R., and Bistoni F. (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* **27**, 229-237.
- Block M. L., Zecca L., and Hong J. S. (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* **8**, 57-69.
- Bsibsi M., Ravid R., Gveric D., and van Noort J. M. (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 1013-1021.
- Caivano M., Gorgoni B., Cohen P., and Poli V. (2001) The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) and C/EBP delta transcription factors. *J Biol Chem* **276**, 48693-48701.
- Callejas N. A., Bosca L., Williams C. S., DuBOIS R. N., and Martin-Sanz P. (2000) Regulation of cyclooxygenase 2 expression in hepatocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins. *Gastroenterology* **119**, 493-501.
- Cao Z., Umek R. M., and McKnight S. L. (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* **5**, 1538-1552.

- Cardinaux J. R., Allaman I., and Magistretti P. J. (2000) Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. *Glia* **29**, 91-97.
- Carpentier P. A., Duncan D. S., and Miller S. D. (2008) Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun* **22**, 140-147.
- Chao C. C., Hu S., and Peterson P. K. (1996) Glia: the not so innocent bystanders. *J Neurovirol* **2**, 234-239.
- Chen H. M. and Liao W. S. (1993) Differential acute-phase response of rat kininogen genes involves type I and type II interleukin-6 response elements. *J Biol Chem* **268**, 25311-25319.
- Ejarque-Ortiz A., Medina M. G., Tusell J. M., Perez-Gonzalez A. P., Serratosa J., and Saura J. (2007a) Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. *Glia* **55**, 178-188.
- Ejarque-Ortiz A., Tusell J. M., Serratosa J., and Saura J. (2007b) CCAAT/enhancer binding protein-alpha is down-regulated by toll-like receptor agonists in microglial cells. *J Neurosci Res* **85**, 985-993.
- Evert B. O., Schelhaas J., Fleischer H., de Vos R. A., Brunt E. R., Stenzel W., Klockgether T., and Wullner U. (2006) Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin Neuropathol* **25**, 272-281.
- Farina C., Aloisi F., and Meinl E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* **28**, 138-145.
- Giri S., Jatana M., Rattan R., Won J. S., Singh I., and Singh A. K. (2002) Galactosylsphingosine (psychosine)-induced expression of cytokine-mediated inducible nitric oxide synthases via AP-1 and C/EBP: implications for Krabbe disease. *EASEB J* **16**, 661-672.
- Giri S., Nath N., Smith B., Viollet B., Singh A. K., and Singh I. (2004) 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* **24**, 479-487.
- Godambe S. A., Chaplin D. D., Takova T., and Bellone C. J. (1994) Upstream NFIL-6-like site located within a DNase I hypersensitivity region mediates LPS-induced transcription of the murine interleukin-1 beta gene. *J Immunol* **153**, 143-152.
- Granger R. L., Hughes T. R., and Ramji D. P. (2000) Stimulus- and cell-type-specific regulation of CCAAT-enhancer binding protein isoforms in glomerular mesangial cells by lipopolysaccharide and cytokines. *Biochim Biophys Acta* **1501**, 171-179.

- Hou D. X., Masuzaki S., Hashimoto F., Uto T., Tanigawa S., Fujii M., and Sakata Y. (2007) Green tea proanthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-activated mouse macrophages: molecular mechanisms and structure-activity relationship. *Arch Biochem Biophys* **460**, 67-74.
- Hu H. M., Baer M., Williams S. C., Johnson P. F., and Schwartz R. C. (1998) Redundancy of C/EBP alpha, -beta, and -delta in supporting the lipopolysaccharide-induced transcription of IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol* **160**, 2334-2342.
- Huang J. H. and Liao W. S. (1994) Induction of the mouse serum amyloid A3 gene by cytokines requires both C/EBP family proteins and a novel constitutive nuclear factor. *Mol Cell Biol* **14**, 4475-4484.
- Huang Y. C., Chang W. C., Su J. G., Cai J. L., Chen C. C., Hung J. J., and Liu Y. W. (2007) Peptidoglycan enhances transcriptional expression of CCAAT/enhancer-binding protein delta gene in mouse macrophages. *J Biomed Sci* **14**, 407-418.
- Jack C. S., Arbour N., Manusow J., Montgrain V., Blain M., McCrea E., Shapiro A., and Antel J. P. (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* **175**, 4320-4330.
- Juan T. S., Wilson D. R., Wilde M. D., and Darlington G. J. (1993) Participation of the transcription factor C/EBP delta in the acute-phase regulation of the human gene for complement component C3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2584-2588.
- Kawai T. and Akira S. (2007) TLR signaling. *Semin Immunol* **19**, 24-32.
- Kinoshita S., Akira S., and Kishimoto T. (1992) A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1473-1476.
- Kitami Y., Fukuoka T., Hiwada K., and Inagami T. (1999) A high level of CCAAT-enhancer binding protein-delta expression is a major determinant for markedly elevated differential gene expression of the platelet-derived growth factor-alpha receptor in vascular smooth muscle cells of genetically hypertensive rats. *Circ Res* **84**, 64-73.
- Koike T., Yamagishi H., Hatanaka Y., Fukushima A., Chang J. W., Xia Y., Fields M., Chandler P., and Iwashima M. (2003) A novel ERK-dependent signaling process that regulates interleukin-2 expression in a late phase of T cell activation. *J Biol Chem* **278**, 15685-15692.

- Lee S. J., Hou J., and Benveniste E. N. (1998) Transcriptional regulation of intercellular adhesion molecule-1 in astrocytes involves NF-kappaB and C/EBP isoforms. *J Neuroimmunol* **92**, 196-207.
- Lekstrom-Himes J. and Xanthopoulos K. G. (1998) Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* **273**, 28545-28548.
- Li R., Strohmeyer R., Liang Z., Lue L. F., and Rogers J. (2004) CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta) expression and elevation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**, 991-999.
- Liu Y. W., Chen C. C., Wang J. M., Chang W. C., Huang Y. C., Chung S. Y., Chen B. K., and Hung J. J. (2007) Role of transcriptional factors Sp1, c-Rel, and c-Jun in LPS-induced C/EBPdelta gene expression of mouse macrophages. *Cell Mol Life Sci* **64**, 3282-3294.
- Lund S., Christensen K. V., Hedtjarn M., Mortensen A. L., Hagberg H., Falsig J., Hasseldam H., Schratzenholz A., Porzgen P., and Leist M. (2006) The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *J Neuroimmunol* **180**, 71-87.
- Milner R. and Campbell I. L. (2002) Cytokines regulate microglial adhesion to laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the alpha6beta1 integrin. *J Neurosci* **22**, 1562-1572.
- Minghetti L. and Levi G. (1998) Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol* **54**, 99-125.
- Mount M. P., Lira A., Grimes D., Smith P. D., Faucher S., Slack R., Anisman H., Hayley S., and Park D. S. (2007) Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci* **27**, 3328-3337.
- Nagulapalli S., Pongubala J. M., and Atchison M. L. (1995) Multiple proteins physically interact with PU.1. Transcriptional synergy with NF-IL6 beta (C/EBP delta, CRP3). *J Immunol* **155**, 4330-4338.
- O'Rourke J. P., Newbound G. C., Hutt J. A., and DeWille J. (1999) CCAAT/enhancer-binding protein delta regulates mammary epithelial cell G0 growth arrest and apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 16582-16589.
- Olson J. K. and Miller S. D. (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* **173**, 3916-3924.

- Osada S., Yamamoto H., Nishihara T., and Imagawa M. (1996) DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem* **271**, 3891-3896.
- Paglinawan R., Malipiero U., Schlapbach R., Frei K., Reith W., and Fontana A. (2003) TGFbeta directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. *Glia* **44**, 219-231.
- Pennini M. E., Liu Y., Yang J., Croniger C. M., Boom W. H., and Harding C. V. (2007) CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta binding to CIITA promoters is associated with the inhibition of CIITA expression in response to Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein. *J Immunol* **179**, 6910-6918.
- Poli V. (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* **273**, 29279-29282.
- Qing Y. and Stark G. R. (2004) Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* **279**, 41679-41685.
- Ray A., Hannink M., and Ray B. K. (1995) Concerted participation of NF-kappa B and C/EBP heteromer in lipopolysaccharide induction of serum amyloid A gene expression in liver. *J Biol Chem* **270**, 7365-7374.
- Ray A. and Ray B. K. (1994a) Serum amyloid A gene expression under acute-phase conditions involves participation of inducible C/EBP-beta and C/EBP-delta and their activation by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **14**, 4324-4332.
- Ray B. K. and Ray A. (1994b) Expression of the gene encoding alpha 1-acid glycoprotein in rabbit liver under acute-phase conditions involves induction and activation of beta and delta CCAAT-enhancer-binding proteins. *Eur J Biochem* **222**, 891-900.
- Reddy K. V., Serio K. J., Hodulik C. R., and Bigby T. D. (2003) 5-lipoxygenase-activating protein gene expression. Key role of CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) in constitutive and tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced expression in THP-1 cells. *J Biol Chem* **278**, 13810-13818.
- Ruddy M. J., Wong G. C., Liu X. K., Yamamoto H., Kasayama S., Kirkwood K. L., and Gaffen S. L. (2004) Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem* **279**, 2559-2567.

- Ruocco M. R., Chen X., Ambrosino C., Dragonetti E., Liu W., Mallardo M., De Falco G., Palmieri C., Franzoso G., Quinto I., Venuta S., and Scala G. (1996) Regulation of HIV-1 long terminal repeats by interaction of C/EBP(NF-IL6) and NF-kappaB/Rel transcription factors. *J Biol Chem* **271**, 22479-22486.
- Saito H., Shultz L. D., Sinha M., and Papaconstantinou J. (1999) Induction of the alpha(1)-antichymotrypsin gene in the brain associated with TGF-beta1 deficiency or systemic administration of endotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **263**, 270-275.
- Saura J., Tusell J. M., and Serratos J. (2003) High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* **44**, 183-189.
- Schroder K., Sweet M. J., and Hume D. A. (2006) Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* **211**, 511-524.
- Sterneck E., Paylor R., Jackson-Lewis V., Libbey M., Przedborski S., Tessarollo L., Crawley J. N., and Johnson P. F. (1998) Selectively enhanced contextual fear conditioning in mice lacking the transcriptional regulator CCAAT/enhancer binding protein delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10908-10913.
- Tengku-Muhammad T. S., Hughes T. R., Ranki H., Cryer A., and Ramji D. P. (2000) Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines. *Cytokine* **12**, 1430-1436.
- Town T., Nikolic V., and Tan J. (2005) The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation* **2**, 24.
- Uto T., Fujii M., and Hou D. X. (2007) Effects of 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate on cyclooxygenase-2 expression induced by lipopolysaccharide, interferon-gamma and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Oncol Rep* **17**, 233-238.
- von Gertten C., Flores M. A., Holmin S., Mathiesen T., and Nordqvist A. C. (2005) Genomic responses in rat cerebral cortex after traumatic brain injury. *BMC Neurosci* **6**, 69.
- Wadleigh D. J., Reddy S. T., Kopp E., Ghosh S., and Herschman H. R. (2000) Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* **275**, 6259-6266.
- Won J. S., Im Y. B., Key L., Singh I., and Singh A. K. (2003) The involvement of glucose metabolism in the regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in glial cells: possible role of glucose-6-phosphate dehydrogenase and CCAAT/enhancing binding protein. *J Neurosci* **23**, 7470-7478.

Wu K. K. (2006) Analysis of protein-DNA binding by streptavidin-agarose pulldown. *Methods Mol Biol* **338**, 281-290.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. C/EBP δ upregulation in mixed glial cultures. A) Primary mixed glial cultures were treated with 100 ng/mL LPS for 24 hours. Nuclear extracts were prepared and analyzed by Western blot using anti-C/EBP δ antibody and anti-p36 as loading control. B-E) Primary mixed glial cultures were treated with vehicle (B, D) or 100 ng/mL LPS for 24 hours (C, E) and processed for double immunofluorescence with anti-C/EBP δ antibody (red in B-E) combined with the astroglial marker anti-GFAP (green in B, C) or the microglial marker anti-Cd11b (green in D, E). Images are representative of 3 independent experiments. Bar, 50 μ m.

Figure 2. C/EBP δ upregulation in astroglial- and microglial cultures. A) Primary astroglial and microglial cultures were treated with 100 ng/mL LPS for 24 hours. Nuclear extracts were prepared and analyzed by Western blot using anti-C/EBP δ antibody and anti-p36 as loading control. B-E) Astroglial (B, C) or microglial (D, E) primary cultures were treated with vehicle (B, D) or 100 ng/mL LPS for 24 hours (C, E) and processed for immunocytochemistry with anti-C/EBP δ antibody. Images are representative of 3 independent experiments. Bar, 20 μ m.

Figure 3. C/EBP δ upregulation in microglia is time- and concentration-dependent. A, B) BV2 microglial cells were treated with 100 ng/mL LPS for various times and C/EBP δ mRNA and nuclear protein levels were analyzed by real-time PCR (A) and Western blot (B) respectively. C, D) BV2 microglial cells were treated with various concentrations of LPS for 8 hours and nuclear C/EBP δ protein levels were analyzed by Western blot. A, B and C show mean + SEM of 3 independent experiments. ** $p < 0.01$ vs control (ANOVA). D is an image of a representative concentration-response experiment.

Figure 4. BV2 upregulation of C/EBP δ is induced by TLR agonists. BV2 microglial cells were treated for 8 hours with the TLR agonists poly(I:C) (I:C, 100 μ g/mL), CpG1668 (CpG, 1 μ M), peptidoglycan (PGN, 10 μ g/mL) and LPS (100 ng/mL) and the proinflammatory cytokine IFN γ (2 ng/mL). Nuclear extracts were prepared and analyzed by Western blot with an anti-C/EBP δ antibody. A shows the mean + SEM of 3 independent experiments and B is a representative Western blot image. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control (ANOVA).

Figure 5. ERK inhibition prevents LPS-induced C/EBP δ upregulation in microglia. BV2 microglial cells were treated for 8 hours with LPS (100 ng/mL) alone or in combination with the MAPK inhibitors U0126 (UO, 10 μ M), SP600125 (SP, 25 μ M) and SB203580 (SB, 20 μ M), which were added 1 hour prior to LPS treatment. Nuclear extracts were prepared and analyzed by Western blot with an anti-C/EBP δ antibody. A shows the mean + SEM of 3 independent experiments and B is a representative Western blot image. ** $p < 0.01$ vs LPS alone (ANOVA).

Figure 6. DNA binding and dimerization of C/EBP δ in activated microglia. A) Nuclear extracts were prepared from BV2 cells treated with vehicle or LPS (100 ng/ml 8 h). Binding of C/EBP δ to DNA oligonucleotides containing a C/EBP site from the COX-2 promoter or a mutated site (mut) was performed by SAPA followed by Western blot as described in Methods. After the assay, proteins bound to DNA are found in the pellet and proteins not bound to DNA are found in the supernatant. Lamin B in the supernatant fraction is used as a loading control. The image shown is representative of 3 independent experiments. B) Nuclear extracts from BV2 cells treated with vehicle, LPS (100 ng/ml, 4h) or L+I (LPS 100 ng/ml + IFN γ 0.5 ng/ml, 4h) were immunoprecipitated (IP) with an anti-C/EBP δ antibody. The presence in the C/EBP δ complexes of the C/EBP β isoforms LAP and LIP and the NF- κ B protein p65 was revealed by Western blot. Both images are representative of 3 independent experiments.

Figure 1

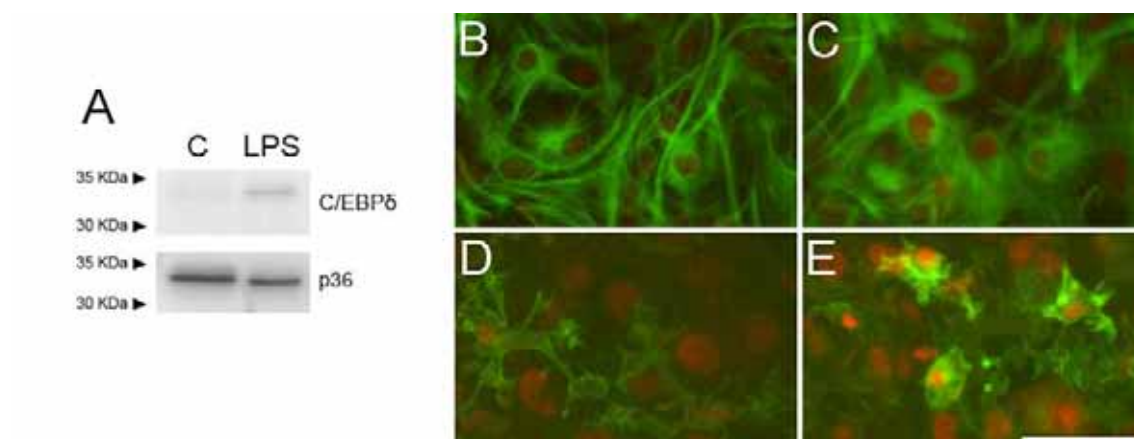


Figure 2

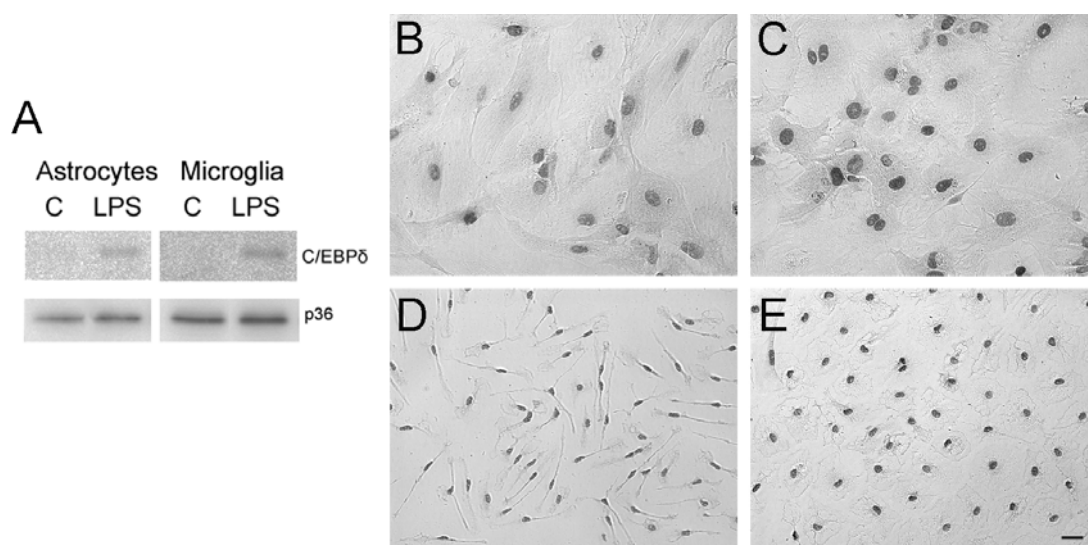


Figure 3

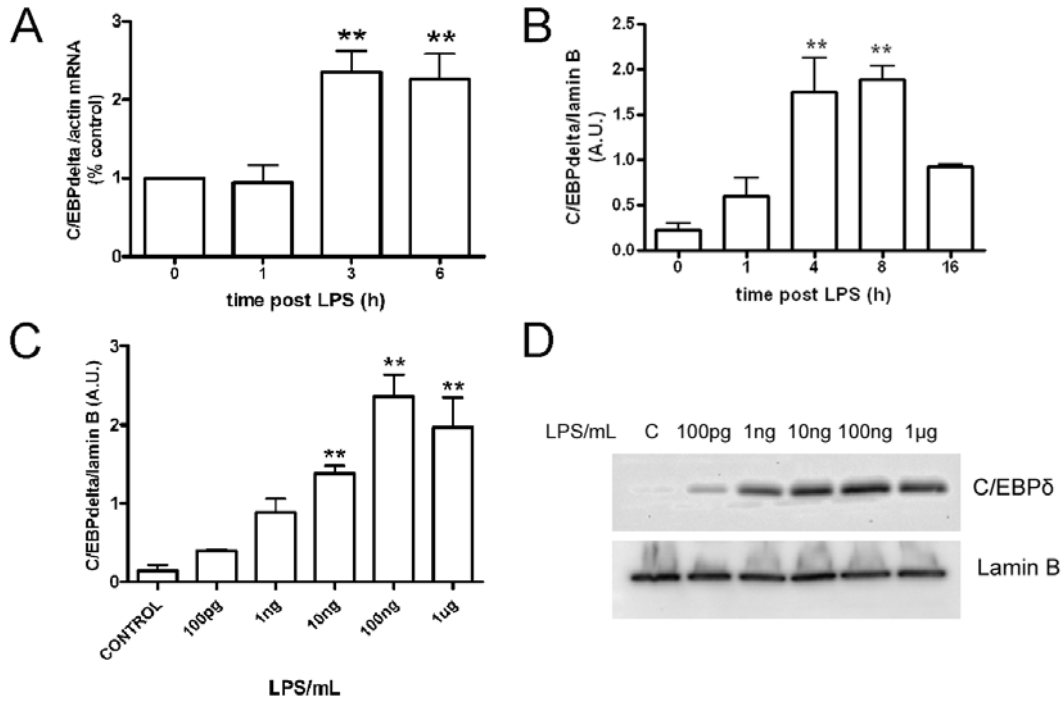


Figure 4

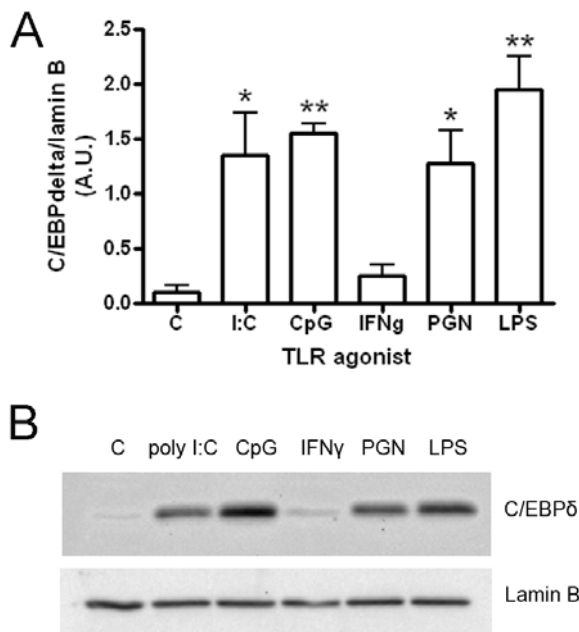


Figure 5

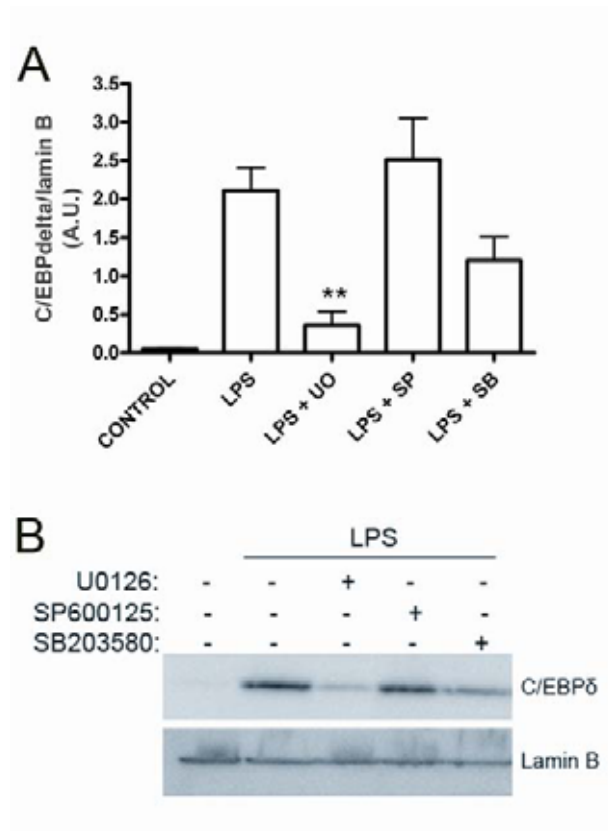
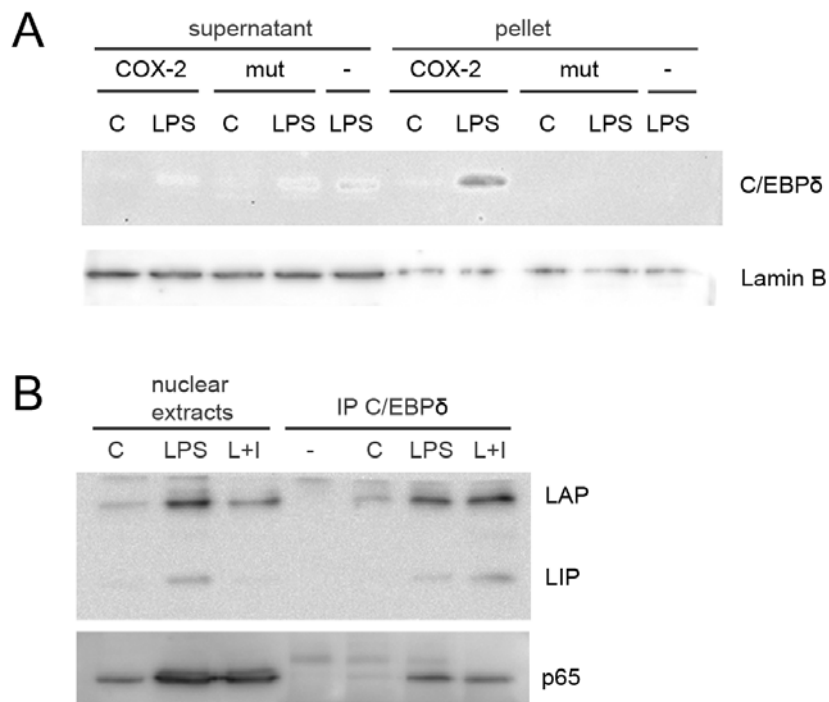


Figure 6



4.4 CUARTO TRABAJO

CCAAT/enhancer binding protein beta regula la expresión de genes proinflamatorios durante la activación glial

Ejarque-Ortiz A. y Straccia M., Serratosa J., Saura J.

El factor de transcripción CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) regula la expresión de genes clave en diversos procesos inflamatorios. Durante la activación glial su expresión se ve incrementada en astrocitos y, especialmente, en microglía. En este trabajo, hemos estudiado el papel que C/EBP β juega en la transcripción de diferentes mediadores proinflamatorios en una línea murina de microglía llamada BV2 y en cultivos primarios. Nuestros resultados muestran cómo el número de células en los cultivos de las células que sobreexpresan LIP, una isoforma de C/EBP β que actúa como un dominante negativo, es menor, aunque no es debido que existan diferencias en las fases del ciclo celular ni a una diferencia en la muerte por apoptosis. Los niveles del ARN mensajero IL-6, TNF- α , COX-2 y NOS-II se ven reducidos durante la activación glial en las células que sobreexpresan LIP. El estudio con cultivos primarios nos muestra cómo el aumento del ARN mensajero de IL-6, COX-2 y NOS-II cuando las células se activan con LPS (100 ng/ml) se ve atenuada en los cultivos de ratones deficientes en C/EBP β . La producción de NO, cuando las células se tratan con LPS e IFN γ , es menor en los cultivos primarios de los ratones deficientes en C/EBP β respecto a los ratones silvestres. Nuestros resultados muestran la implicación de C/EBP β en la regulación de la transcripción de diferentes mediadores proinflamatorios que son potencialmente neurotóxicos, sugiriendo el posible papel que podría jugar en diversas enfermedades neurodegenerativas.

CCAAT/enhancer binding protein beta regula la expresión de genes proinflamatorios durante la activación glial

INTRODUCCIÓN

CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) es un factor de transcripción que, junto con otros cinco miembros (α , $-\delta$, $-\gamma$, $-\epsilon$, $-\zeta$) forma la subfamilia C/EBP, dentro de la familia b-zip. C/EBP β presenta una elevada homología con el resto de C/EBPs en su extremo C-terminal, donde se encuentra el dominio b-zip, formado por la región de unión al ADN y una región de dimerización. C/EBP β puede formar homo- y heterodímeros con miembros de su familia y también de otras como NF- κ B (Stein et al, 1993) o PU. 1 (Oelgeschlager et al, 1996). El ARNm de C/EBP β da lugar a tres isoformas (Full, LAP y LIP) a partir de tres codones de inicio diferentes mediante un mecanismo de iniciación alternativa (Descombes et al, 1991). Mientras que Full y LAP son isoformas activadoras, LIP actúa como un dominante negativo debido a que, a diferencia de Full y LAP, no posee dominio transactivador. Las funciones de C/EBP β incluyen varios procesos celulares como la proliferación y diferenciación celular y la inflamación (revisado por Ramji et al, 2002).

La activación glial es un proceso que puede desencadenarse bien por la disrupción de las señales inhibitoras que las células gliales reciben en condiciones fisiológicas, como la fractalkina (CXC3L1) o CD200 (Hanisch et al, 2007), o bien por la aparición de estímulos activadores, tales como restos celulares, citoquinas proinflamatorias, precipitados proteicos anormales o patógenos. Este proceso se caracteriza por el cambio morfológico y la proliferación de los astrocitos y la microglía, así como la producción de una gran variedad de mediadores pro- y antiinflamatorios. Entre los mediadores proinflamatorios producidos se encuentran varias citoquinas, como IL-1 β , IL-6, TNF- α o las enzimas NOS-II y COX-2 (Hanisch, 2002).

Se ha postulado que la presencia continuada de niveles elevados de moléculas como el TNF- α , NO o los ROS, debido a la existencia de una activación glial crónica y/o exacerbada, podrían dañar finalmente a las células circundantes. De esta forma, la activación glial podría jugar un papel clave en enfermedades como la isquemia cerebral (Hailer, 2007), el dolor neuropático (Moalem et al, 2006) o enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (Heneka et al, 2007; Boillee et al, 2006).

C/EBP β está implicado en la regulación de la expresión de diversos mediadores proinflamatorios como COX-2 (Wu et al, 2005), IL-6 (Akira et al, 1990), IL-1 β , o TNF- α (Pope et al, 2000) en varios tipos celulares como hepatocitos o macrófagos. En el SNC, un estudio mostró que el ARNm de C/EBP β era uno de los más incrementados en pacientes con enfermedad de Alzheimer respecto a los individuos sanos (Colangelo et al, 2002). Además, recientemente nosotros demostramos cómo los niveles de C/EBP β aumentan en los astrocitos y, de forma más acusada, en la microglía (Ejarque-Ortiz et al, 2007a) durante la activación glial.

Teniendo en cuenta el papel que C/EBP β juega en la regulación de diversos mediadores proinflamatorios potencialmente neurotóxicos y el claro incremento que sufre este factor de transcripción durante la activación glial, el objetivo que nos propusimos con este trabajo fue el de estudiar el papel que C/EBP β juega en la activación glial y, más concretamente, en la producción de mediadores potencialmente neurotóxicos por parte de las células gliales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para ver el procedimiento en cada uno de ellos, ver el apartado de “Materiales y Métodos” de la memoria (apartado 3). Los métodos empleados en este trabajo fueron:

- Cultivos primarios de glía mixta, enriquecidos de astrocitos y enriquecidos de microglía.
- Transfección de siRNAs:
Las secuencias de los siRNAs están en la tabla 1.4. Para el experimento de los siRNAs metilados, se pidieron a Dharmacon los siRNAs “MAS” y D1 metilados en todos los restos de guanosina de la cadena sense.
- Construcción de plásmido pTER con insertos para la síntesis de shRNAs.
- Transfección de plásmidos.
- Selección de células transfectadas.
- Extracción de proteínas nucleares para Western Blot.
- Western Blot.
- Recuento de células.
- Citometría de flujo.
- Extracción de ARN.
- PCR reversa.
- PCR en tiempo real.

- ELISA.
- Determinación de nitritos en el medio de cultivo.

RESULTADOS

Inhibición mediante ARN de interferencia en cultivos primarios gliales

Como primer paso para la inhibición mediante ARN de interferencia, se optimizaron las condiciones de transfección con un ARN de interferencia de cadena corta (siRNA) que inhibe p21^{CIP1} (Zou et al, 2002). La inhibición de p21^{CIP1} se comprobó 48 horas tras la transfección mediante Western Blot, y sus niveles se compararon con los niveles de expresión de los cultivos transfectados con un siRNA no silenciador para evitar posibles variaciones debidas a la entrada del ARN en la célula. Tanto en cultivos gliales mixtos (figura 1A) como en cultivos enriquecidos en astrocitos o microglía (datos no mostrados) se obtuvo una marcada reducción en los niveles de p21^{CIP1} a los 2, 4 ó 6 días tras la transfección.

Una vez comprobada la eficacia de la técnica de ARN de interferencia en nuestro modelo in vitro, se transfectaron 7 siRNAs comerciales para inhibir C/EBP β . Mediante Western Blot y cuantificación densitométrica, se comprobó que los niveles de C/EBP β no disminuían en ningún caso de forma significativa (figura 1B).

Dado el hecho de que C/EBP β se encuentra implicado en la respuesta inflamatoria, nos planteamos que la presencia del ARN de doble cadena pudiera activar alguna vía proinflamatoria y con ello la expresión de C/EBP β . Una estrategia para reducir es posible respuesta inflamatoria, fue disminuir la concentración del siRNA. Observamos que a 10 nM los siRNA dirigidos contra p21 seguían induciendo una fuerte reducción en los niveles de esta proteína (figura 1C), pero, sin embargo, en el caso de C/EBP β no pudimos ver ninguna reducción significativa (figura 1D).

Diferentes estudios han mostrado cómo la transfección de siRNA metilados de forma similar al ARN eucariota, puede prevenir la activación de la respuesta inflamatoria (Judge et al, 2006) (Gorina et al., en revisión), por lo que nosotros decidimos utilizar también siRNAs con esta modificación. Para este experimento se utilizaron dos siRNAs, el D1, que había obtenido una mayor inhibición en los experimentos previos, y el "MAS", que presenta una diana en el ARNm de C/EBP β de ratón, que es equivalente a la del siRNA utilizado por Marshall (Marshall et al, 2003) para inhibir C/EBP β en células humanas. Estos dos siRNAs se transfectaron a 10 nM, tanto metilados como sin metilar, por separado y también combinados. Los niveles de

expresión de C/EBP β se comprobaron mediante PCR en tiempo real 48 horas tras la transfección. Sin embargo, a pesar de que los niveles de ARNm de C/EBP β en las células transfectadas con el siRNA D1 eran menores que en las demás condiciones, no se consiguió una inhibición significativa con ninguna de las combinaciones utilizadas (figura 1D). Además, como se puede observar en la figura, la metilación parecía que, lejos de inhibir, incrementaba la expresión de C/EBP β .

En paralelo a la transfección de los diferentes oligonucleótidos de ARN de interferencia, se insertaron diferentes secuencias en el plásmido pTER. Este plásmido fue creado por van de Wetering (van de et al, 2003), y a partir de él se sintetiza el llamado hRNA ("hairpin RNA"), que una vez procesado por el complejo DICER genera siRNAs. Esta técnica permite una síntesis continua del ARN de interferencia en la célula, por lo que puede inhibir aquellas proteínas con una vida media muy larga. Para utilizar esta técnica, se transfectaron células de la línea celular de fibroblastos murinos NIH3T3, y se comprobaron los niveles de C/EBP β mediante Western Blot 20 días después de la selección de las células con el antibiótico de selección zeocina (300 μ g/ml). Sin embargo, mediante esta técnica tampoco se obtuvo una disminución significativa de los niveles de C/EBP β (datos no mostrados).

Generación de células BV2 microgliales que sobreexpresan LIP, la isoforma inhibidora de C/EBP β

Con el objetivo final de bloquear la actividad de C/EBP β y como alternativa a los estudios con ARN de interferencia, nos propusimos sobreexpresar LIP, la isoforma inhibidora de C/EBP β , en la línea de células microgliales BV2. Para ello utilizamos el plásmido cedido por el Dr. Smale (Howard Hughes Medical Institute, UCLA), a partir del cual sólo se expresa LIP.

Las células se transfectaron con el plásmido pCDNA-LIP, se seleccionaron con el antibiótico de selección geneticina (300 μ g/ml) y se aislaron hasta obtener unos clones a partir de una célula. La sobreexpresión se comprobó mediante Western Blot de las proteínas totales, comparando los niveles de LIP de los clones transfectados con pCDNA-LIP (células BV2-LIP) con las células que habían sido transfectadas en paralelo con el plásmido pCDNA vacío (células BV2-pCDNA). Los dos clones con una mayor expresión de LIP (3 veces mayor que BV2-pCDNA) fueron BV2-LIP3 y BV2-LIP6 (figura 2A).

Lo primero que nos interesó una vez generados los clones que sobreexpresaban la isoforma LIP, fue ver si se producía algún cambio compensatorio en las células microgliales que sobreexpresaban LIP. Para ello, estudiamos el comportamiento de los niveles nucleares de otros factores de transcripción durante la activación de las células microgliales con LPS. Los factores de transcripción estudiados fueron las formas activadoras de C/EBP β (LAP y Full), C/EBP α , C/EBP δ y p65 (componente más frecuente en el dímero que forma NF- κ B). Mediante Western Blot de las proteínas nucleares extraídas tras el tratamiento con LPS (100 ng/ml) a diferentes tiempos, se compararon los niveles de estos factores de transcripción en las células BV2-LIP3, BV2-LIP6 frente a las células control (BV2-pCDNA). En la figura 2B se puede observar que no existen diferencias en los niveles de ninguno de estos factores de transcripción respecto a las células control, de tal forma que el incremento inducido por LPS en los niveles nucleares de las isoformas activadoras de C/EBP β , C/EBP δ y p65 se produce de forma muy similar en el tiempo en las tres líneas celulares.

La sobreexpresión de LIP disminuye la densidad celular

Debido a que C/EBP β promueve la proliferación celular, nos interesaba comprobar si la sobreexpresión de LIP producía una disminución de la proliferación de las células. En efecto, en la figura 3A se muestra cómo el número de células totales incrementa de forma más lenta en las células BV2-LIP3 y BV2-LIP6, de tal forma que a día 4 las diferencias entre el número de estas células y el de las células BV2-pCDNA son estadísticamente significativas tanto en el caso de BV2-LIP3 ($p < 0,01$) como en el de BV2-LIP6 ($p < 0,05$).

Para intentar elucidar si alguna fase del ciclo celular se encuentra afectada por la sobreexpresión de LIP, se realizó un estudio de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Sin embargo, se vió que la proporción de células que se encuentra en cada una de las fases del ciclo celular no varía. Además, las diferencias en el número total de células no se pueden explicar por la existencia de diferencias en la muerte por apoptosis, ya que la proporción de células que entran en apoptosis es menor del 5% y es muy similar en las tres poblaciones celulares (figura 2B).

Los niveles del ARNm de varios mediadores proinflamatorios disminuyen cuando existe una sobreexpresión de LIP

Para estudiar la repercusión que el incremento de la isoforma inhibidora de C/EBP β puede tener en la producción de los mediadores proinflamatorios durante la activación de la microglía, se estudió la variación de los niveles de ARNm de TNF- α y M-CSFR tras 1 hora de tratamiento y de NOS-II, COX-2, IL-6 e IL-1 β , tras 6 horas de tratamiento con LPS (100 ng/ml). Estos tiempos corresponden los que, en estudios previos, se había visto una expresión máxima para cada uno de los genes (datos no mostrados). Mediante la cuantificación del ARNm con PCR a tiempo real se detectó una disminución significativa en los niveles del ARNm de NOS-II (35%), COX-2 (40%), IL-6 (45%) y TNF- α (25%) en los clones con sobreexpresión de LIP (figura 4). Hay que destacar que el comportamiento de BV2-LIP3 y BV2-LIP6 es muy similar, lo cual permite descartar que los efectos observados sean debidos a una mutación espontánea o a un efecto debido a la inserción del plásmido, producidos durante la selección clonal (figura 4).

La disminución del ARNm no se traduce en una disminución de la proteína

Una vez que vimos que los niveles de ARNm de 4 de los 6 mediadores estudiados sufrían una disminución, quisimos ver qué repercusión tenía dicha disminución a nivel de la proteína. En primer lugar, cuantificamos mediante ELISA los niveles de TNF- α secretados al medio de cultivo por las células 24 horas tras el tratamiento con LPS (100 ng/ml), pero no se hallaron diferencias significativas entre las células que sobreexpresan LIP y las que no lo hacen (figura 5). Los niveles de la proteína IL-6 no pudieron detectados mediante ELISA, debido a que eran demasiado bajos, lo cual está respaldado por el hecho de que los niveles de ARNm también eran muy bajos, ya que su amplificación mediante PCR en tiempo real era mucho más tardía que los otros mediadores estudiados.

En segundo lugar, para el estudio de la enzima NOS-II y de su producto, el NO, se trataron las células con LPS (100 ng/ml) y también LPS con IFN γ (100 ng/ml + 0,5 ng/ml). No se detectó una diferencia significativa en la producción de NO tras 24 horas de tratamiento (figura 5) ni tampoco en los niveles proteicos de NOS-II tras 16 horas de tratamiento (datos no mostrados).

Por último, se estudiaron los niveles de COX-2 mediante Western Blot tras 16 horas de tratamiento con LPS (100 ng/ml) y LPS con IFN γ (100 ng/ml + 0,5 ng/ml

LPS, pero tampoco en este caso se pudo detectar ninguna diferencia significativa (figura 5).

Los animales *cebp* $+/+$ y *cebp* $-/-$ presentan la misma densidad celular.

Finalmente, como tercera estrategia para estudiar la función de C/EBP β en la activación glial, se analizó el comportamiento de las células gliales durante su activación mediante la utilización de cultivos gliales secundarios de ratones deficientes en C/EBP β (*cebp* $-/-$) frente a los ratones silvestres (*cebp* $+/+$). La ausencia total de C/EBP β fue confirmada tanto a nivel de ARN mediante PCR en tiempo real (figura 6B), como a nivel proteico mediante inmunofluorescencia (figura 6A).

Antes de iniciar los experimentos para comparar la activación glial en cultivos gliales de ratones *cebp* $+/+$ y *cebp* $-/-$ quisimos saber si los cultivos eran comparables en cuanto a su densidad celular. Para ello realizamos un recuento del número total de células en cultivos de ambos genotipos a día 20, que era el día en el que se realizaron los tratamientos. Tal y como muestra la figura 7, no se observaron diferencias en la densidad celular entre ambos cultivos.

La ausencia de C/EBP β afecta a varios mediadores proinflamatorios

Como en el caso de la línea celular microglial, quisimos estudiar en los cultivos primarios gliales la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α y de las enzimas NOS-II y COX-2, lo cual se realizó mediante la técnica de PCR a tiempo real. Los niveles de ARNm de IL-1 β y TNF- α no se vieron afectados por la falta de C/EBP β . Sin embargo, los niveles de IL-6, COX-2 y NOS-II sufrieron una disminución, de tal forma que tras el tratamiento con LPS (100 ng/ml) los niveles de NOS-II disminuyeron hasta en un 60% en los cultivos mixtos gliales *cebp* $-/-$ respecto a los *cebp* $+/+$, y los de COX-2 e IL-6 lo hicieron en un 50% y un 25% respectivamente (figura 8).

Por último, estudiamos el efecto de la ausencia de C/EBP β sobre la producción de NO, para lo cual tratamos a las células con LPS (100 ng/ml) y LPS con IFN γ (100 ng/ml + 0,5 ng/ml). En el caso del LPS, como ocurría con la línea celular microglial, no existían diferencias significativas entre los dos genotipos. Sin embargo, cuando se trataron las células con LPS + IFN γ , la producción de NO disminuyó de forma muy significativa (hasta en un 50%) (Figura 9) en los cultivos gliales *cebp* $-/-$.

DISCUSIÓN

Las células gliales mantienen constantemente un “diálogo” con las neuronas y otras células gliales, y también con el medio que las rodea, con la finalidad de monitorizar el estado de las células nerviosas. La alteración de este diálogo, bien sea por la disrupción de señales constitutivas procedentes de neuronas sanas, como la fractalkina (Cardona et al, 2006), o bien sea por la aparición de estímulos que puedan amenazar la funcionalidad neuronal, como patógenos, restos celulares u otras moléculas extrañas como precipitados proteicos anormales, puede derivar finalmente en la activación de las células gliales.

La activación glial es un proceso que sufren los astrocitos y la microglía, y cuyo objetivo final es eliminar cualquier elemento que amenace la funcionalidad y/o viabilidad neuronal, y reparar el posible daño causado. Para ello, los astrocitos y la microglía proliferan, secretan factores tróficos, aportan factores metabólicos y fagocitan los restos celulares (Hauwel et al, 2005). Durante la activación glial también se sintetizan mediadores pro- y antiinflamatorios, que incluyen citoquinas, quimioquinas y NO entre otros, que ayudan a una rápida eliminación del elemento extraño (revisado por Hanisch et al, 2007).

Sin embargo, se ha postulado que una activación glial exacerbada y/o crónica podría llegar a resultar perjudicial debido a que puede derivar en una disminución de los factores tróficos producidos (Nagatsu et al, 2006) y a la presencia continuada de mediadores proinflamatorios potencialmente neurotóxicos, como las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , o los productos de las enzimas NOS-II y COX-2 (Hanisch, 2002). Diferentes estudios han sugerido que la activación glial podría estar implicada en la patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Gordon, 1993), el Parkinson (Hirsch et al, 2005), la esclerosis múltiple (Brosnan et al, 1996) o la esclerosis lateral amiotrófica (Pasinelli et al, 2006). Apoyando esta hipótesis, existen diversos estudios que muestran cómo la inhibición de la activación glial podría reducir la neurodegeneración en algunas de estas enfermedades. Así, se ha visto que el tratamiento prolongado con antiinflamatorios no esteroideos es capaz de reducir el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer (revisado por Heneka et al, 2007). Además, varios trabajos muestran cómo la utilización de minociclina, un inhibidor de la activación glial, reduce la neurodegeneración en diferentes modelos animales de esclerosis múltiple (Yong et al, 2004) y de la enfermedad de Parkinson (Wu et al, 2002). Recientemente se ha descrito el compuesto AV411 (Avigen) como un posible fármaco

para reducir el dolor neuropático, cuyo mecanismo está basado en la inhibición de la activación glial mediante el antagonismo de los receptores TLR (Ledeboer et al, 2007a).

C/EBP β juega un papel muy importante en la regulación de genes implicados en procesos inflamatorios como la respuesta de fase aguda (revisado por Schrem et al, 2004), mediante la unión a los motivos de unión C/EBP que se encuentran en el promotor de muchos de estos genes (Poli, 1998). De forma análoga a lo que ocurre en la respuesta de fase aguda, durante la activación glial los niveles de C/EBP β aumentan en los astrocitos y, de forma más acentuada, en microglía (Ejarque-Ortiz et al, 2007a; Cardinaux et al, 2000). Diversos trabajos han demostrado la importancia de C/EBP β en la regulación de diversos mediadores proinflamatorios durante la activación glial, como TNF- α (Jana et al, 2003), NOS-II (Jana et al, 2001; Jana et al, 2005) y RANTES/CCL5 (Kim et al, 2004). Asimismo, un estudio reciente mostró cómo los ratones deficientes en C/EBP β presentaban una disminución de varios mediadores proinflamatorios y del daño neuronal tras una oclusión isquémica transitoria (Kapadia et al, 2006).

Para abordar el estudio del papel de C/EBP β en la activación glial, nos propusimos inhibirlo mediante diferentes mecanismos. A pesar de que existen estudios de diferentes compuestos flavonoides cuyo mecanismo de acción se postula que es a través de la inhibición de la función de C/EBP β (Woo et al, 2005; Woo et al, 2006; Chen et al, 2004), en ninguno de ellos se ha demostrado la especificidad de forma inequívoca. Por otra parte, no podíamos usar oligonucleótidos decoy, ya que su mecanismo de acción es bloquear los motivos de unión de los factores de transcripción que hay en los promotores, y C/EBP β tiene el mismo motivo de unión que otros C/EBPs (Osada et al, 1996d).

El ARN de interferencia tiene la gran ventaja de ser un método muy específico de inhibición, ya que se basa en la degradación dirigida del ARNm, de forma que se impide la traducción de la proteína (revisado por McManus et al, 2002). Sin embargo, nosotros no conseguimos ver una inhibición de esta proteína, a pesar de que mediante la inhibición con siRNAs contra p21CIP1 demostramos que la inhibición por ARN de interferencia funcionaba en nuestro modelo. El mecanismo de ARN de interferencia se basa en una respuesta de las células a una posible infección vírica (Hannon, 2002) de tal forma que el ARN vírico que entra en la célula es utilizado para la degradación del ARNm que se produce para la propagación de dicho virus. Por lo tanto, no es de extrañar que el tratamiento con RNA puede desencadenar, a partir de diferentes TLRs,

la activación de diferentes vías de señalización de IRF-3, NF- κ B y de las MAPK que, finalmente, conllevan a la síntesis de citoquinas proinflamatorias e IFN (revisado por Marques et al, 2005). Recientemente, un trabajo de nuestro laboratorio mostró cómo el aumento de C/EBP β en las células gliales está mediado por diferentes MAPKs (Ejarque-Ortiz et al, 2007a). Además, se ha visto que el IFN γ induce la síntesis y activación de este factor de transcripción (Li, 2007). Así, una razón por la que el ARN de interferencia que en otras células inhibe C/EBP β de forma eficaz, no lo haga en las células gliales, podría ser que en estas células la presencia de siRNAs induciría la síntesis de C/EBP β . Apoyando esta hipótesis, se ha observado que el tratamiento in vitro de astrocitos con ARN de doble cadena induce la activación de C/EBP β (Auch et al, 2004). Además, se ha visto que el tratamiento con siRNA induce la activación de la vía Jak/Stat en los astrocitos y no en otros tipos celulares no gliales, y el TLR3 se ha postulado como mediador de dicha activación (Gorina et al, en preparación).

La estrategia que utilizamos para disminuir la respuesta inflamatoria fue la de utilizar siRNAs metilados. La utilización de siRNAs que contienen grupos 2'OMe en varios residuos de la cadena sense reducen la activación de vías proinflamatorias sin reducir su potencial inhibitor (Judge et al, 2006). Sin embargo, C/EBP β tampoco disminuyó con la utilización de estos siRNAs, lo cual sugiere que probablemente el problema en la inhibición de esta proteína no radique en la respuesta inflamatoria, sino en las secuencias empleadas, y apoyaría la posibilidad de que no todos los ARNm son igualmente susceptibles de ser silenciadas mediante ARN de interferencias.

Un mecanismo alternativo al ARN de interferencia fue la generación de clones de la línea microglial BV2 que sobreexpresan LIP, que se une a las formas activadoras de C/EBP β y, al no poseer dominio de transactivación, inhibe su función (Descombes et al, 1991).

El hecho de que hubiera una menor densidad celular en los cultivos de las células que sobreexpresan LIP frente a las células control C/EBP β , lo atribuimos en un primer momento al papel que C/EBP β tiene en la proliferación. Sin embargo, el hecho de que la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular así como en los niveles de apoptosis sean similares a las células control refutaría las hipótesis de que la inhibición de C/EBP β resulte en una activación de la apoptosis o en un arresto del ciclo celular. Una razón que podría explicarlo, sería que la sobreexpresión de LIP pueda afectar a las propiedades de adherencia de esta línea, de manera que las células se despeguen del sustrato con mayor facilidad. Dado que otros tipos celulares requieren

el contacto con el sustrato para dividirse, esta falta de adherencia podría conllevar finalmente que sólo las que se queden adheridas al sustrato se puedan dividir. Por otra parte, dicha falta de adherencia también podría suponer una subestimación del número de células por la técnica empleada para su recuento.

Los resultados del trabajo con estos clones muestran que, durante la activación microglial, el aumento en los niveles del ARNm de NOS-II, COX-2, TNF- α e IL-6 es menor en las células que presentan una sobreexpresión de la isoforma inhibidora LIP, lo cual apoya los resultados obtenidos en estudios anteriores mediante transfección transitoria en BV2, con TNF- α (Jana et al, 2003) y NOS-II (Jana et al, 2001; Jana et al, 2005; Kim et al, 2004)). El hecho de que estas diferencias no se vean reflejadas a nivel proteico, puede deberse a que los mecanismos reguladores en los diferentes pasos de la síntesis compensen las diferencias que tienen lugar en el ARNm. Por otra parte, en este trabajo se han estudiado los niveles del ARNm y de la proteína de todos estos mediadores en un punto en el tiempo en el que habíamos visto una mayor producción de los mismos. Sin embargo, no podemos descartar que el perfil de expresión a lo largo del tiempo de las proteínas de NOS-II, COX-2 y TNF- α sea diferente en aquellas células que sobreexpresan LIP, de manera que el hecho de que haya menos ARNm produzca un aumento de la proteína más tardío o una disminución más temprana. Por ello, un estudio en el que se tuviera en cuenta este parámetro sería de utilidad, ya que, si bien los niveles de los mediadores proinflamatorios son muy importantes para producir una neurotoxicidad, el hecho de que dichos niveles se mantengan un período de tiempo más o menos prologando también es muy importante.

El poder disponer de un dominante negativo para el estudio de C/EBP β representa un elemento de gran utilidad para nuestro estudio, aunque a la hora de interpretar los resultados se debe ser prudente, ya que LIP, al igual que sucede con las isoformas LAP y Full, podría formar dímeros con otras proteínas, y no sólo con C/EBP β .

Los cultivos primarios gliales de los ratones deficientes en C/EBP β generados por el laboratorio de Poli (Screpanti et al, 1995) ofrecen una herramienta adicional para el estudio funcional de esta proteína, con características muy importantes respecto al estudio de las células BV2, ya que esta herramienta permite tener un sistema más fisiológico que en el caso de las líneas celulares inmortalizadas, y que también permite estudiar la relación entre los astrocitos y la microglía. De forma análoga a lo que sucedía en las células BV2, cuando se produce la activación glial, el aumento del

ARNm de NOS-II, COX-2 e IL-6 es menor cuando C/EBP β no está presente. Sin embargo, en este caso no se ve una disminución significativa de TNF- α , aunque sí una tendencia a disminuir.

El NO es un mediador proinflamatorio que puede afectar a diversas moléculas promoviendo la neurotoxicidad (Heneka, 2007). En este trabajo mostramos cómo la producción de NO es menor en los cultivos *ceb β -/-*. El hecho de que sólo se vea una diferencia significativa cuando las células se tratan con LPS e IFN γ , puede deberse a que C/EBP β media la transcripción de muchos genes a partir de la estimulación con IFN γ (Li et al, 2007), con lo que su ausencia podría afectar de una forma más importante cuando esta vía está afectada.

En conclusión, los resultados mostrados en este trabajo apoyan la importancia de C/EBP β en la regulación de mediadores proinflamatorios durante la activación glial. Estos resultados, junto con el hecho de que el aumento de C/EBP β en las células gliales se produce cuando la muerte neuronal viene acompañada por una respuesta inflamatoria, cuando la muerte neuronal es excitotóxica pero no cuando es apoptótica (Perez-Capote et al, 2006) ponen de manifiesto el papel que C/EBP β puede jugar en los efectos más neurotóxicos de la activación glial. Así, la actividad de C/EBP β podría ser clave para la neurotoxicidad que se ha sugerido que la activación glial podría tener en varias enfermedades neurodegenerativas, y su inhibición podría reducir dichos efectos.

Bibliografía

- Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y *et al.* A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. **EMBO J** 1990: **9**:1897-1906.
- Auch CJ, Saha RN, Sheikh FG, Liu X, Jacobs BL, Pahan K Role of protein kinase R in double-stranded RNA-induced expression of nitric oxide synthase in human astroglia. **FEBS Lett** 2004: **563**:223-228.
- Boillee S, Vande VC, Cleveland DW ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. **Neuron** 2006: **52**:39-59.
- Brosnan CF, Raine CS Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. **Brain Pathol** 1996: **6**:243-257.
- Cardinaux JR, Allaman I, Magistretti PJ Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. **Glia** 2000: **29**:91-97.
- Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM *et al.* Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. **Nat Neurosci** 2006: **9**:917-924.
- Chen CJ, Raung SL, Liao SL, Chen SY Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by baicalein in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. **Biochem Pharmacol** 2004: **67**:957-965.
- Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. **J Neurosci Res** 2002: **70**:462-473.
- Descombes P, Schibler U A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. **Cell** 1991: **67**:569-579.
- Ejarque-Ortiz A, Medina MG, Tusell JM, Perez-Gonzalez AP, Serratos J, Saura J Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. **Glia** 2007: **55**:178-188.
- Gordon MN Microglia and immune activation in Alzheimer's disease. **J Fla Med Assoc** 1993: **80**:267-270.
- Hailer NP Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: It is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. **Prog Neurobiol** 2007.
- Hanisch UK Microglia as a source and target of cytokines. **Glia** 2002: **40**:140-155.

- Hanisch UK, Kettenmann H Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci** 2007; **10**:1387-1394.
- Hannon GJ RNA interference. **Nature** 2002; **418**:244-251.
- Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. **Brain Res Brain Res Rev** 2005; **48**:220-233.
- Heneka MT, O'Banion MK Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **J Neuroimmunol** 2007; **184**:69-91.
- Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord** 2005; **11 Suppl 1**:S9-S15.
- Jana M, Anderson JA, Saha RN, Liu X, Pahan K Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. **Free Radic Biol Med** 2005; **38**:655-664.
- Jana M, Dasgupta S, Saha RN, Liu X, Pahan K Induction of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by interleukin-12 p40 monomer and homodimer in microglia and macrophages. **J Neurochem** 2003; **86**:519-528.
- Jana M, Liu X, Koka S, Ghosh S, Petro TM, Pahan K Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells. **J Biol Chem** 2001; **276**:44527-44533.
- Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. **Mol Ther** 2006; **13**:494-505.
- Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, Kalluri H, Johnson PF, Vemuganti R Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. **J Neurochem** 2006; **98**:1718-1731.
- Kim MO, Suh HS, Brosnan CF, Lee SC Regulation of RANTES/CCL5 expression in human astrocytes by interleukin-1 and interferon-beta. **J Neurochem** 2004; **90**:297-308.
- Ledeboer A, Hutchinson MR, Watkins LR, Johnson KW Ibudilast (AV-411). A new class therapeutic candidate for neuropathic pain and opioid withdrawal syndromes. **Expert Opin Investig Drugs** 2007; **16**:935-950.
- Li H, Gade P, Xiao W, Kalvakolanu DV The interferon signaling network and transcription factor C/EBP-beta. **Cell Mol Immunol** 2007; **4**:407-418.
- Marques JT, Williams BR Activation of the mammalian immune system by siRNAs. **Nat Biotechnol** 2005; **23**:1399-1405.

- Marshall J, Dolan BM, Garcia EP, Sathe S, Tang X, Mao Z *et al.* Calcium channel and NMDA receptor activities differentially regulate nuclear C/EBPbeta levels to control neuronal survival. **Neuron** 2003; **39**:625-639.
- McManus MT, Sharp PA Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. **Nat Rev Genet** 2002; **3**:737-747.
- Moalem G, Tracey DJ Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Res Rev** 2006; **51**:240-264.
- Nagatsu T, Sawada M Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines. **Cell Mol Neurobiol** 2006; **26**:781-802.
- Oelgeschlager M, Nuchprayoon I, Luscher B, Friedman AD C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. **Mol Cell Biol** 1996; **16**:4717-4725.
- Osada S, Yamamoto H, Nishihara T, Imagawa M DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. **J Biol Chem** 1996; **271**:3891-3896.
- Pasinelli P, Brown RH Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. **Nat Rev Neurosci** 2006; **7**:710-723.
- Perez-Capote K, Saura J, Serratosa J, Sola C Expression of C/EBPalpha and C/EBPbeta in glial cells in vitro after inducing glial activation by different stimuli. **Neurosci Lett** 2006; **410**:25-30.
- Poli V The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. **J Biol Chem** 1998; **273**:29279-29282.
- Pope R, Mungre S, Liu H, Thimmapaya B Regulation of TNF-alpha expression in normal macrophages: the role of C/EBPbeta. **Cytokine** 2000; **12**:1171-1181.
- Ramji DP, Foka P CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. **Biochem J** 2002; **365**:561-575.
- Schrem H, Klempnauer J, Borlak J Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. **Pharmacol Rev** 2004; **56**:291-330.
- Screpanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D *et al.* Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. **EMBO J** 1995; **14**:1932-1941.
- Stein B, Cogswell PC, Baldwin AS, Jr. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. **Mol Cell Biol** 1993; **13**:3964-3974.

- van de WM, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D *et al.* Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. **EMBO Rep** 2003; **4**:609-615.
- Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, Park JW, Kwon TK Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. **FEBS Lett** 2005; **579**:705-711.
- Woo KJ, Lim JH, Suh SI, Kwon YK, Shin SW, Kim SC *et al.* Differential inhibitory effects of baicalein and baicalin on LPS-induced cyclooxygenase-2 expression through inhibition of C/EBPbeta DNA-binding activity. **Immunobiology** 2006; **211**:359-368.
- Wu DC, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Vila M, Jackson-Lewis V *et al.* Glial cell response: A pathogenic factor in Parkinson's disease. **J Neurovirol** 2002; **8**:551-558.
- Wu KK, Liou JY, Cieslik K Transcriptional Control of COX-2 via C/EBPbeta. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2005; **25**:679-685.
- Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM The promise of minocycline in neurology. **Lancet Neurol** 2004; **3**:744-751.
- Zou X, Ray D, Aziyu A, Christov K, Boiko AD, Gudkov AV *et al.* Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. **Genes Dev** 2002; **16**:2923-2934.

Figura 1. Inhibición mediante ARN de interferencia. A) y B) Los cultivos gliales primarios mixtos se transfectaron con un siRNA (100 nM en A) y 10 y 100 nM en B)) dirigido contra p21^{Cip1}. Dos días después se extrajeron las proteínas totales y se analizaron mediante Western blot con un anticuerpo anti- p21^{Cip1} y anti-actina como control de carga. Como controles de la inhibición se utilizaron células sin transfectar (Ø) y células transfectadas con un siRNA no silenciador (NS). C) Los cultivos gliales primarios mixtos se transfectaron con 7 siRNAs comerciales diferentes (A1-D4, 100 nM) dirigidos contra C/EBPβ. Dos días después se extrajeron las proteínas totales y se analizaron mediante Western blot con un anticuerpo anti-C/EBPβ y anti-actina como control de carga. Como controles de la inhibición se utilizaron células sin transfectar (Ø) y células transfectadas con un siRNA no silenciador (NS). D) Los cultivos gliales primarios mixtos se transfectaron con siRNAs (10nM) metilados (D1-M, MAS-M) y sin metilar (D1, MAS) dirigidos contra C/EBPβ. 48 horas tras la transfección se extrajo el ARN y se cuantificaron los niveles de ARNm mediante PCR a tiempo real. Como controles se utilizaron células con un siRNA no silenciador (NS). Las imágenes A), B) y C) son representativas de 3 experimentos independientes. D) muestra las medias + SEM de 2 experimentos.

Figura 2. Sobreexpresión de LIP y análisis de los niveles de diferentes factores de transcripción. A) Las células BV2 se transfectaron con pCDNA-LIP y pCDNA vacío como control. Tras 7 días de selección con el antibiótico geneticina, se realizó la selección clonal. 21 días después, se extrajeron las proteínas totales y se analizaron los niveles proteicos mediante Western blot con un anticuerpo anti-C/EBPβ y anti-actina como control de carga. B) Los clones se trataron LPS (100 ng/ml) a diferentes tiempos y, tras la extracción de proteínas nucleares, se analizaron los niveles de las 3 isoformas de C/EBPβ (Full, LAP y LIP), C/EBPδ, C/EBPα y la subunidad de NF-κB, p65. Como control de carga se utilizó lamin B. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

Figura 3. Densidad celular y fases del ciclo celular de las células que sobreexpresan LIP. A) Las células BV2 se sembraron (25000 células/ml), se fijaron a diferentes tiempos y se marcaron con Hoechst-33258. El recuento se realizó con el programa ImageJ. B) 24 horas tras sembrar las células (100000 células /ml) se resuspendieron, se

fijaron y se tiñeron con yoduro de propidio. El análisis de la proporción de células que había en cada fase se realizó con un citómetro de flujo.

Figura 4. Niveles de ARNm de diferentes genes proinflamatorios en células BV2 con sobreexpresión de LIP. A las 42 horas de la siembra, se trataron las células con LPS (100 ng/ml). Tras 1 hora (para TNF- α y MCSFR) y 6 horas (el resto) de tratamiento, se extrajo el ARN. Los niveles de ARNm fueron analizados mediante PCR en tiempo real. Los gráficos muestran las medias + SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ BV2-C3 y BV2-C6 vs BV2-pCDNA (ANOVA).

Figura 5. A) Los niveles de TNF- α se determinaron 24 horas tras el tratamiento de BV2-pCDNA, BV2-LIP3 y BV2-LIP6 con LPS (100 ng/ml). B) 24 horas tras el tratamiento con LPS (100 ng/ml) y LPS + IFN γ (100 ng/ml + 0,5 ng/ml), se determinó la cantidad de nitritos en el medio de cultivo (pg/ml) mediante el método Griess. C) 24 horas tras el tratamiento con LPS (100 ng/ml) y LPS + IFN γ (100 ng/ml + 0,5 ng/ml), se extrajeron las proteínas totales y se determinaron los niveles de la proteínas COX-2 de BV2-pCDNA, BV2-LIP3 y BV2-LIP6 con LPS (100 ng/ml). Como control de carga se utilizó la tubulina.

Figura 6. Comprobación de la expresión de C/EBP β en cultivos gliales mixtos primarios de ratones *cebp* $-/-$ y *cebp* $+/+$. Tras 20 días de cultivo, se analizó la expresión de C/EBP β mediante A) inmunocitoquímica y B) PCR en tiempo real (U.A.) en situación control.

Figura 7. Densidad celular en cultivos primarios de ratones *cebp* $-/-$ y *cebp* $+/+$. Tras 20 días de cultivo, las células se fijaron y se tiñeron con Hoechst-3358. El recuento del número de células totales se realizó contando con el programa ImageJ (células totales/pocillo de placa de 48 pocillos).

Figura 8. Niveles de ARNm de diferentes genes proinflamatorios en cultivos primarios gliales mixtos de ratones *cebp* $-/-$ respecto a los cultivos de *cebp* $+/+$. Tras 20 días de cultivo, se trataron las células con LPS (100 ng/ml). Tras 6 horas de tratamiento, se extrajo el ARN y se analizaron los niveles de ARNm mediante PCR en tiempo real. Los

gráficos muestran las medias + SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA con post-test Dunnet).

Figura 9. Producción de NO en cultivos primarios *cebpb* -/- respecto a los cultivos *cebpb* +/+. Tras 20 días de cultivo, se trataron las células con LPS (100 ng/ml) y LPS con IFN γ (100 ng/ml + 0.5 ng/ml). Tras 48 horas de tratamiento, se analizó la producción de NO mediante el método Griess. El gráfico muestra las medias + SEM de 3 experimentos independientes. *** $p < 0.001$ (ANOVA).

Figura 1.

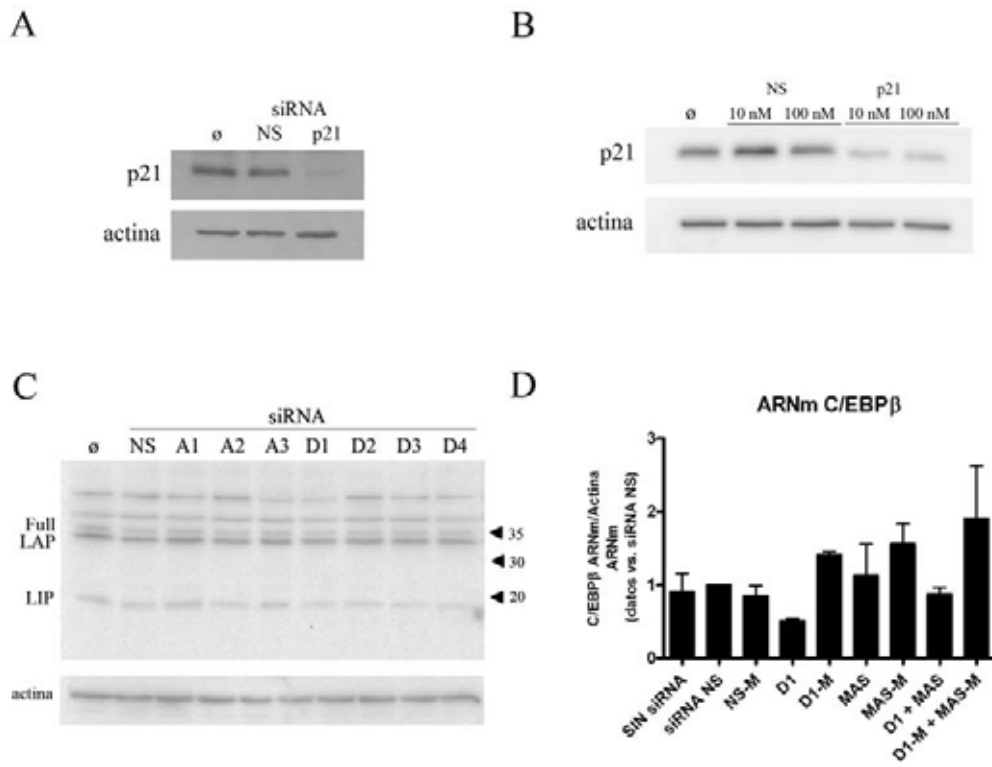


Figura 2.

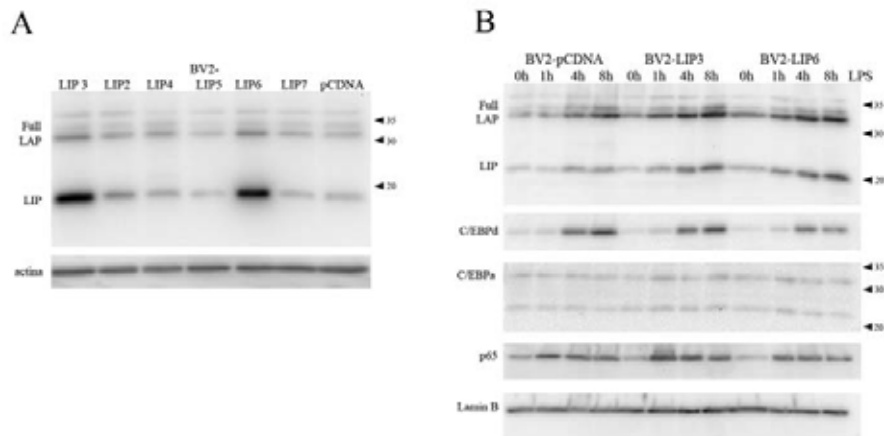


Figura 3.

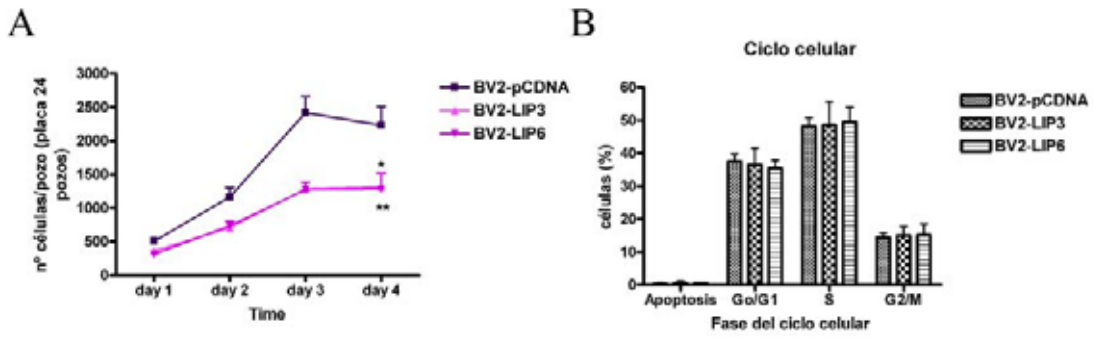


Figura 4.

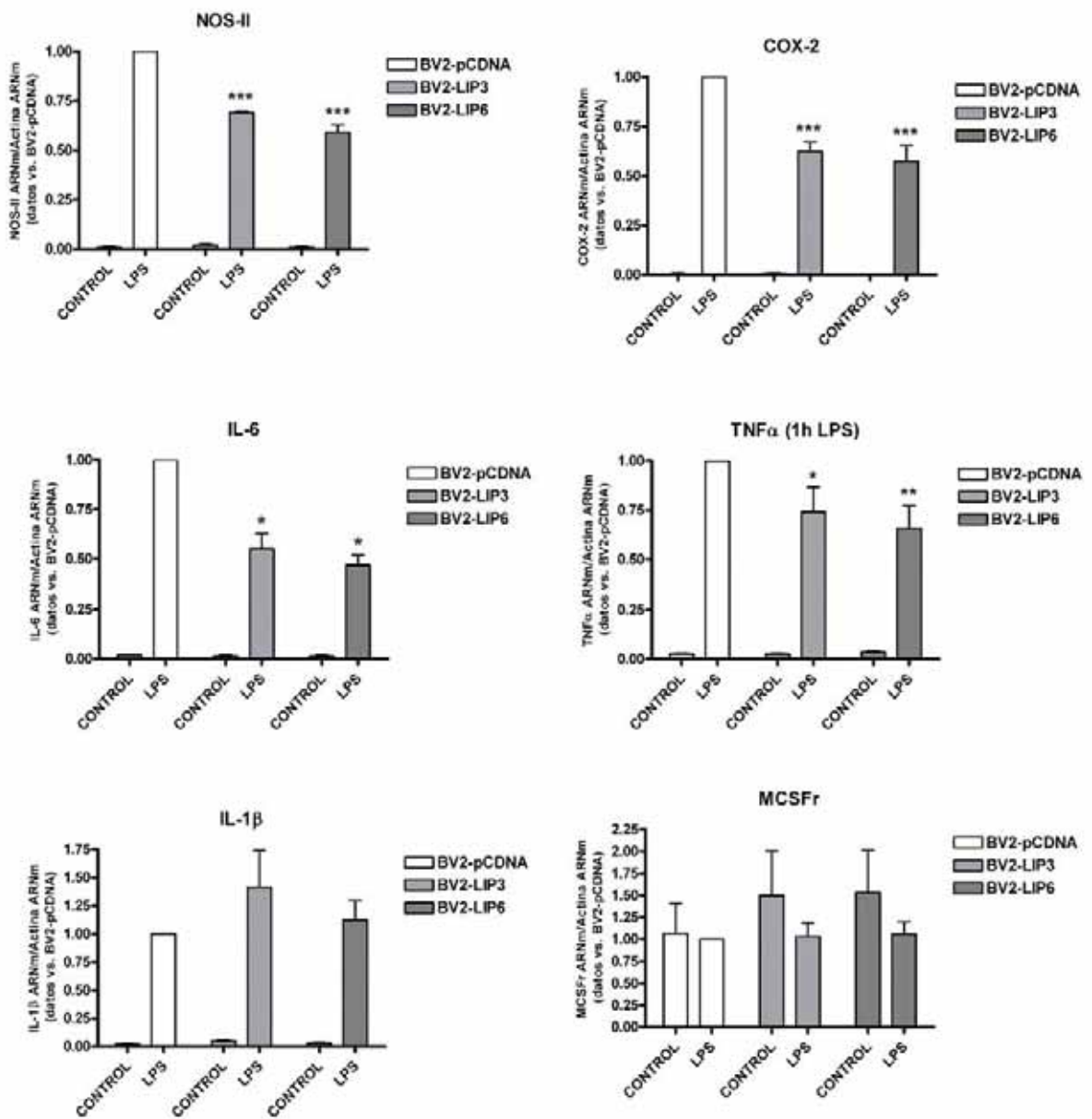


Figura 5.

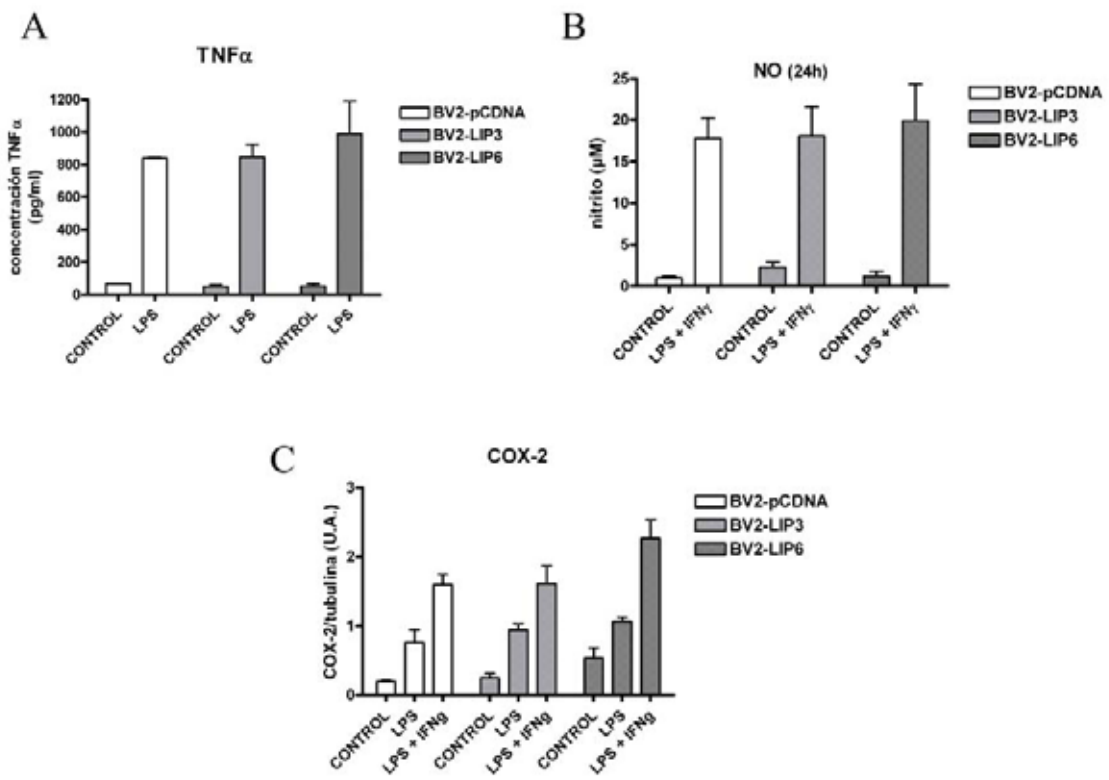


Figura 6.

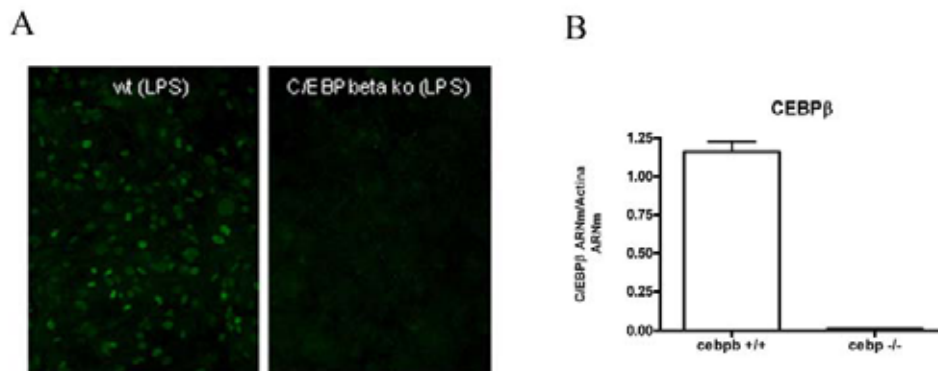


Figura 7.

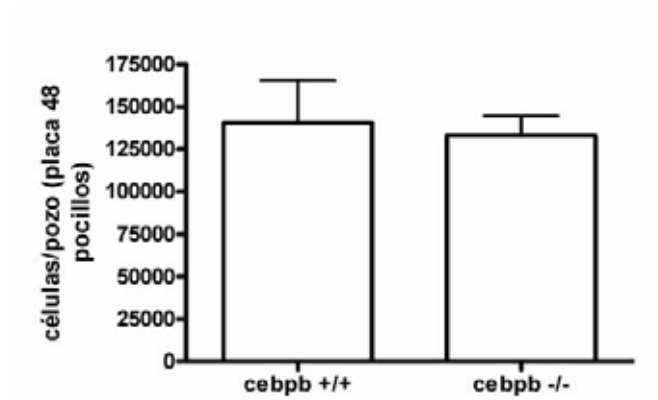


Figura 8.

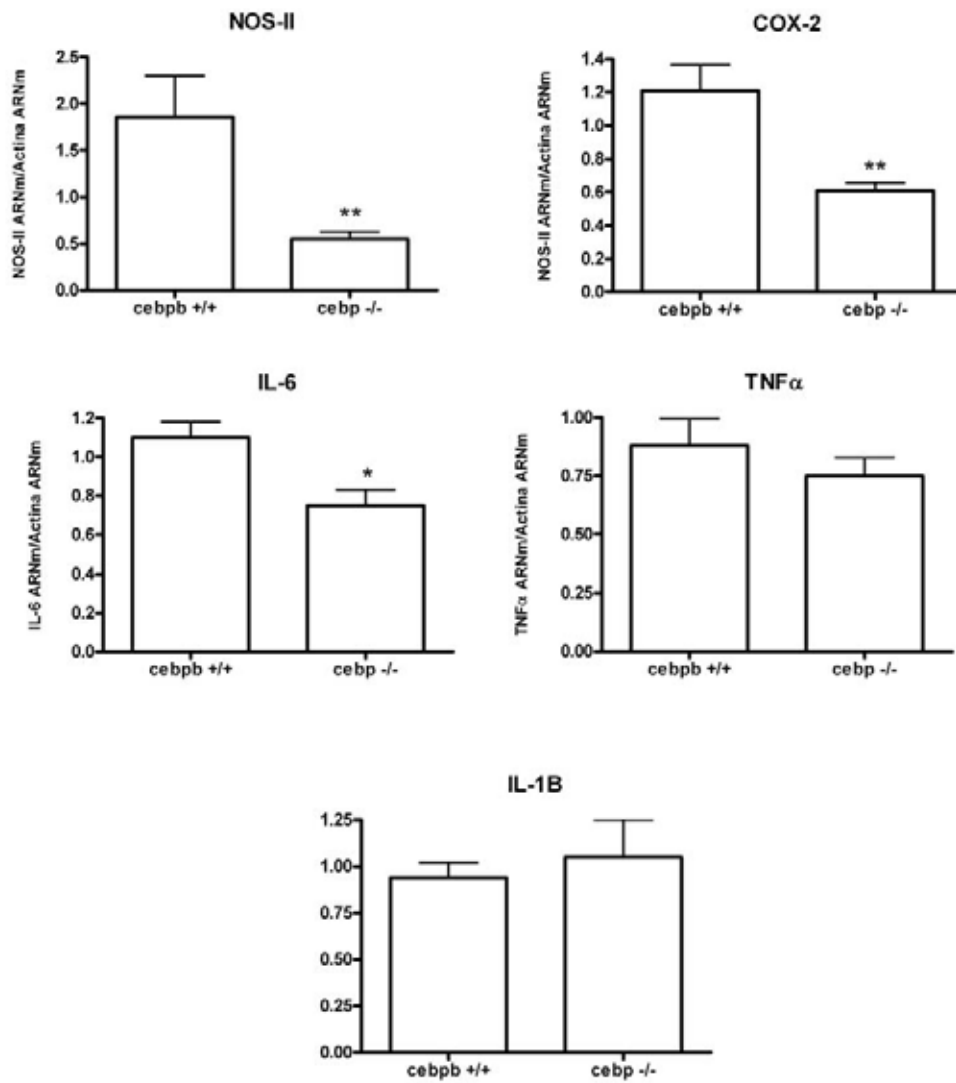
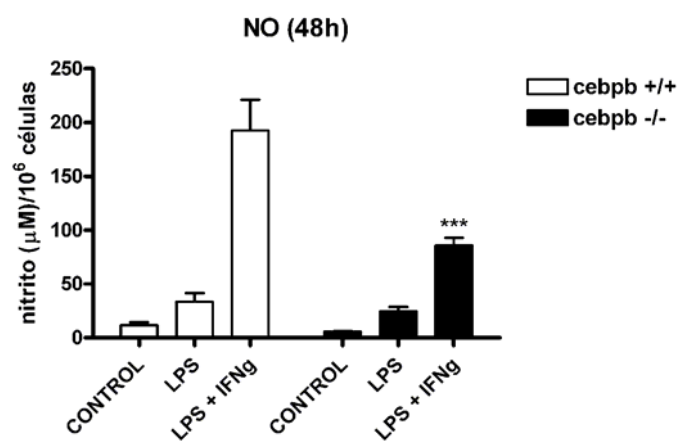


Figura 9.



5 DISCUSIÓN

La activación glial, tal como se ha explicado, es un proceso en el que los astrocitos y la microglía sufren cambios morfológicos, proliferan y producen un amplio abanico de proteínas, que incluyen factores tróficos, citoquinas y quimioquinas pro- y antiinflamatorias, de forma análoga a lo que ocurre en otros procesos inflamatorios. De igual manera, se ha visto cómo diferentes factores de transcripción implicados en la regulación de genes importantes en estos procesos inflamatorios, como NF- κ B o PU. 1, se encuentran también implicados en la activación glial (Walton et al, 2000; O'Neill et al, 1997).

El objetivo del trabajo que presentamos ha sido estudiar el comportamiento de tres miembros de la familia C/EBP, C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ durante la activación glial, debido a la importancia que tienen en la regulación de proteínas implicadas en otros procesos inflamatorios como la respuesta de fase aguda o la activación de los macrófagos. Mediante la utilización de modelos de activación glial *in vitro* e *in vivo* hemos estudiado las variaciones que estos C/EBPs sufren, y hemos visto que los niveles de C/EBP α disminuyen, mientras que hay un incremento de los de C/EBP β y C/EBP δ . Estas variaciones tienen lugar tras la activación de todos los TLRs estudiados (TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9), lo cual sugiere la importancia que estos factores de transcripción pueden tener en la respuesta innata de las células gliales, particularmente de la microglía. No debemos olvidar que los TLRs pueden reconocer, además de elementos extraños, algunos de los depósitos proteicos presentes en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Fassbender et al, 2004; Udan et al, 2008) o el Parkinson (Dauer et al, 2003).

Durante la activación glial, se produce un aumento de C/EBP β y C/EBP δ en ambos tipos celulares gliales, si bien el aumento de C/EBP β es más acusado en las células microgliales. C/EBP α disminuye en las células microgliales, si bien esta proteína no varía en los astrocitos. La existencia de este patrón diferencial de expresión, así como el hecho de que el fenotipo observado en los ratones deficientes en cada uno de estos tres factores sea diferente (revisado por Lekstrom-Himes et al, 1998), parece indicar que no existe una redundancia funcional entre ellos, si bien no se puede descartar que en alguna situación y/o tipo celular, dicha redundancia sí exista.

Aunque aún no se conoce el mecanismo, varias hipótesis pueden explicar cómo la disminución de C/EBP α y el aumento de C/EBP β y C/EBP δ conllevan la transcripción de un grupo de proteínas implicadas en dichos procesos inflamatorios.

Varios trabajos demuestran cómo estos factores se pueden unir de forma diferencial a los promotores de diversos genes, de forma que existen promotores en los que se detecta la unión C/EBP β y C/EBP δ , pero no de C/EBP α (He et al, 2002), otros en los que se une C/EBP β , pero no C/EBP α o C/EBP δ (Li et al, 2007) u otros en los que se une C/EBP α y C/EBP δ , pero no C/EBP β (Elberg et al, 2000). Incluso se ha demostrado la unión diferencial entre las isoformas de C/EBP α (Wang et al, 2007). Así, podríamos pensar que estos factores se unen de forma diferente porque pueden tener diferentes motivos de unión en el promotor de los genes. Sin embargo, un estudio de los motivos de unión de estos tres factores de transcripción realizado en el laboratorio de Imagawa (Osada et al, 1996) demostró que estos C/EBPs presentan preferencias de unión muy similares, aunque con variaciones pequeñas, de tal forma que se identificó la secuencia consenso de unión al ADN, denominado motivo C/EBP (RTTGCGYAAY, R = A o G, Y = C o T). La existencia de este motivo es lógica si pensamos en la elevada homología que presenta el dominio de unión al ADN de estos factores. De hecho, en el trabajo mencionado (Osada et al, 1996) se describe cómo existen más variaciones entre las secuencias a las que se unen C/EBP β y C/EBP δ de forma más específica, que entre las de C/EBP α y C/EBP β , lo cual apoya el hecho de que estos motivos no son el punto determinante para explicar la unión diferencial de estos factores de transcripción, ya que, en ese caso, deberían ser mucho más similares las de C/EBP β y C/EBP δ .

El hecho de que los motivos de unión de los tres C/EBPs coincidan pero que, en cambio, la unión a los promotores de diversos genes sea diferente demuestra que dicha unión no sólo depende del dominio de unión al ADN, sino que también viene determinado por elementos presentes en la parte más divergente de la proteína, que corresponde a la parte N-terminal.

Diversos trabajos han demostrado el papel que estas regiones juegan en la unión de los C/EBPs al ADN. En primer lugar, Elberg (Elberg et al, 2000) demostró cómo la existencia de una región denominada RD2 (dominio de represión 2) en C/EBP β , situada en la parte N-terminal, entre el dominio de transactivación y el de unión al ADN, determina que C/EBP β no se una al promotor PPAR γ 2, mientras que C/EBP α y C/EBP δ sí que lo hacen. Por su parte, un trabajo de Li (Li et al, 2007) demostró cómo, al contrario de lo que ocurre en el promotor PPAR γ 2, una fosforilación en la región RD2 de C/EBP β inducida por IFN γ , conlleva la unión de C/EBP β , pero no de C/EBP α o C/EBP δ , a un elemento de respuesta a IFN llamado GATE. Así, vemos cómo estas regiones pueden tener una repercusión directa sobre la capacidad de unión

de la proteína, de tal forma que alguna modificación en las mismas, tales como una fosforilación, pueden determinar un cambio conformacional importante para la capacidad de unión de los C/EBPs.

Por otra parte, las regiones situadas en la parte variable podrían actuar de forma indirecta, mediante la unión a otras proteínas que finalmente regulen su actividad. Estas proteínas “mediadoras” podrían corresponder a los diferentes coactivadores y correpresores con los que los factores de transcripción interaccionan. Tres coactivadores que podrían estar implicados son SWI/SNF, que pertenece al grupo de coactivadores con actividad ATPasa/helicasa, y p300 y CBP, ambos pertenecientes al grupo de coactivadores con actividad histona acetiltransferasa. Diferentes estudios muestran la interacción de C/EBP α y C/EBP β con los tres coactivadores (Pedersen et al, 2001; Erickson et al, 2001; Mink et al, 1997), y de C/EBP δ con CBP (Kovacs et al, 2003). Sin embargo, no existe ningún trabajo en el que se compare de forma paralela la unión de C/EBP α , C/EBP β o C/EBP δ a estos coactivadores, por lo que profundizar en el estudio de estos y de otros coactivadores sería interesante. Lo que sí parece claro es que la existencia de estas interacciones proteicas es una de las opciones más plausibles para explicar las diferencias en el comportamiento entre C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ .

La manera en la que la unión de estos coactivadores y correpresores a los C/EBPs modificaría su comportamiento, podría ser a través de la estabilización de interacciones con otras proteínas, como correpresores y coactivadores, factores de transcripción e incluso proteínas de la maquinaria transcripcional. La presencia final de unas u otras proteínas en el complejo formado determinaría finalmente tanto la estabilidad de la unión como la actividad transactivadora de las C/EBPs, de tal forma que una proteína unida a C/EBP α pudiera tener efectos contrarios a los producidos cuando esta misma proteína se une a C/EBP β o a C/EBP δ . Un ejemplo de ello, es el efecto de los dímeros de c-jun con C/EBP α y C/EBP β en macrófagos, ya que mientras que la unión de de C/EBP α con c-jun produce una inhibición de la actividad de c-jun, la unión de C/EBP β con c-jun resulta en una sinergia de dicha actividad (Rangatia et al, 2002).

Por otro lado, también existen casos en los que un mismo dímero es capaz de inhibir o de activar la transcripción, como ocurre en el caso de los dímeros formados por C/EBP β -NF- κ B. Existe un gran número de genes en cuyos promotores hay motivos C/EBP adyacentes a los motivos NF κ B, como IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α y COX-2 entre otros (revisado por Chen et al, 2005; Akira et al, 1997). En casos como los de TNF-

α o COX-2 (Papin et al, 2003; Chen et al, 2005), la formación de los dímeros C/EBP β -NF- κ B (Papin et al, 2003) produce una sinergia de la transcripción mediante la unión exclusiva al sitio C/EBP (y no al κ B). Stein (Stein, 1993) describió cómo la unión de los dímeros C/EBP-NF- κ B daba lugar a una sinergia o inhibición de la transcripción dependiendo de la existencia de los sitios C/EBP. Así, cuando se co-transfectaba un C/EBP, NF- κ B y un constructo formado por un motivo de unión C/EBP regulando un gen reportero, se producía una sinergia de la expresión, mientras que si el constructo del gen reportero contenía un motivo de unión κ B tenía lugar una inhibición.

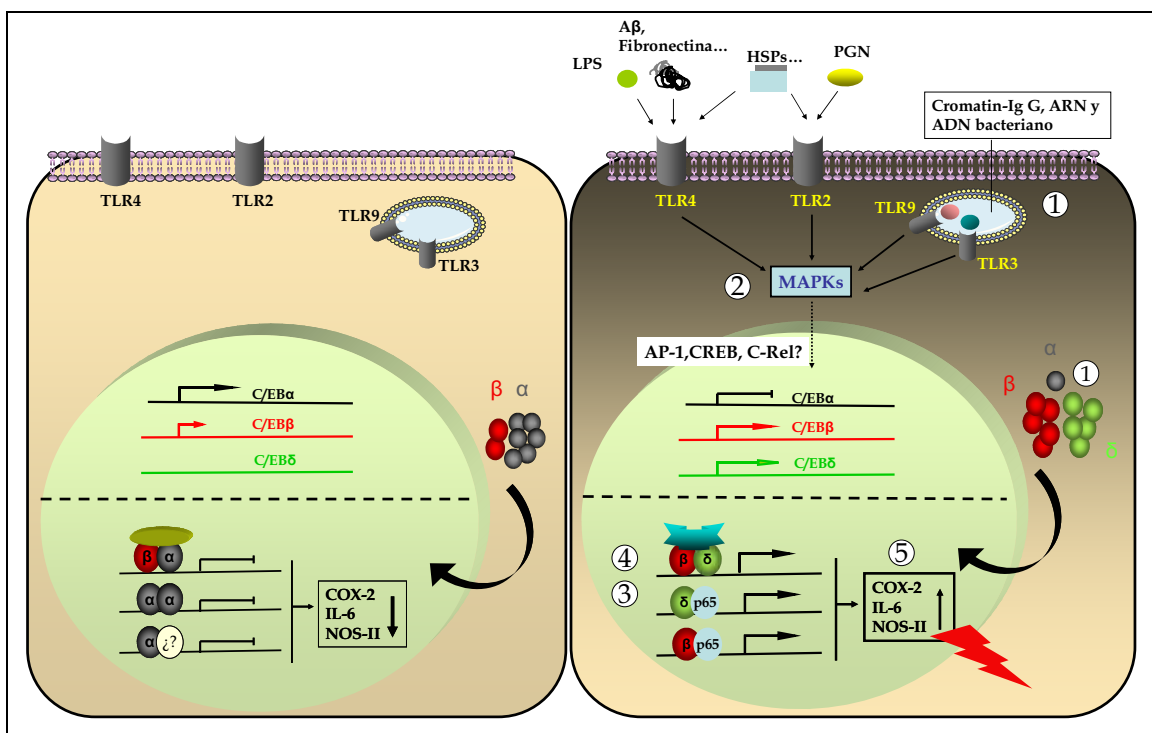
Para entender el efecto transcripcional final de estos dímeros, no debemos olvidar, como ya hemos comentado, que éste depende de las proteínas con la que interaccionan y el contexto del sitio de unión, ya que las proteínas que interaccionan no sólo son los coactivadores y correpresores, sino también otras proteínas cuyos motivos de unión se encuentran cerca, y que por lo tanto varían según el promotor. Por todo ello, la función de C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ variará en función de la situación fisiológica de la célula, y también del tipo celular, ya que de ello dependerá la presencia de unas u otras proteínas que modifiquen la actividad de estos factores de transcripción.

Cada vez más estudios apoyan el potencial neurotóxico de la activación glial crónica en diferentes enfermedades neurodegenerativas. Se postula que esta neurotoxicidad puede ser causada por una presencia continua de niveles elevados de mediadores proinflamatorios como el TNF- α , el NO y los ROS. Así, disminuir su producción en estas situaciones podría suponer una reducción de la muerte neuronal. Dado que C/EBP β regula la transcripción de estos mediadores proinflamatorios en otras células, nos propusimos estudiar el efecto de la depleción de C/EBP β en nuestro modelo de activación glial *in vitro*, para lo cual utilizamos técnicas celulares y moleculares. De esta forma, hemos estudiado la expresión de varias proteínas implicadas en la activación glial, incluyendo citoquinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α), NOS-II y COX-2.

Para dicho estudio, utilizamos cultivos primarios de ratones deficientes en C/EBP β y un modelo de inhibición *in vitro* llevada a cabo mediante la sobreexpresión de LIP, que es un dominante negativo. Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la implicación de C/EBP β en la transcripción de NOS-II, COX-2, IL-6 y TNF- α durante la activación glial, ya que cuando la célula no tiene C/EBP β o éste se encuentra inhibido, se produce una disminución en la transcripción de estas proteínas.

Como ya hemos comentado, estas proteínas proinflamatorias realizan funciones muy importantes, pero unos niveles elevados presentes de forma continua pueden derivar en consecuencias neurotóxicas. Por eso, elucidar los mecanismos reguladores y especialmente la forma de evitar su excesiva presencia en el parénquima cerebral, puede suponer un punto clave en el avance del estudio de las enfermedades neurodegenerativas en las que la activación glial crónica se convierte en una amenaza para la supervivencia neuronal. En este trabajo se muestra la importancia que una inhibición de C/EBP β podría suponer para la disminución de los niveles de varios mediadores proinflamatorios implicados en los efectos más neurotóxicos que la activación glial puede desencadenar.

MODELO PROPUESTO



Con la información proveniente de nuestro trabajo y el encontrado en la literatura, nosotros proponemos un modelo en el que diferentes estímulos tanto exógenos (LPS, PGN, ADN y ARN de bacterias) como endógenos, como restos celulares o proteínas como el péptido β -amiloide, produce la activación de los receptores TLR en las células gliales. Dicha activación conduciría a través de la actuación de las MAPKs, a una disminución de C/EBP α y un aumento de C/EBP β y

C/EBP δ , de tal forma que, una vez en el núcleo, la unión de C/EBP β y C/EBP δ a los promotores de los genes reclutaría otros coactivadores diferentes a los reclutados por los dímeros que contienen C/EBP α en condiciones basales. La actividad de estos coactivadores conllevaría, finalmente, el aumento en la expresión de COX-2, NOS-II e IL-6, los cuales presentan un potencial neurotóxico.

La información aportada por nuestro trabajo a este modelo es:

- 1) La activación de TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9 produce un aumento de los niveles de C/EBP δ y una disminución de los de C/EBP α .
- 2) El aumento de C/EBP β y C/EBP δ viene mediado, al menos en parte, por la actividad de las MAPKs.
- 3) C/EBP δ dimeriza con C/EBP β y la subunidad de NF- κ B p65 durante la activación microglial.
- 4) C/EBP δ se une al promotor de COX-2.
- 5) C/EBP β regula la transcripción de COX-2, IL-6 y NOS-II durante la activación glial.

6 CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que el trabajo realizado nos ha permitido llegar son:

1. C/EBP α se expresa en condiciones basales en la microglía y, de una forma mucho más reducida, en los astrocitos. El tratamiento con LPS actúa directamente sobre las células microgliales, produciendo una disminución de los niveles nucleares de C/EBP α de forma concentración y tiempo-dependiente. Además de la activación de TLR4, cuyo agonista es el LPS, la activación de los receptores TLR2, TLR3 y TLR9, producen el mismo efecto que el LPS, mientras que esta disminución no se observa cuando se tratan las células con varias citoquinas proinflamatorias.
2. C/EBP β se expresa en condiciones basales en los astrocitos y en mayor medida en la microglía. El tratamiento con el LPS provoca el aumento de C/EBP β de forma tiempo- y concentración dependiente a través de la activación de las MAPKs p38, JNK y ERK 1/2. Dicho aumento se produce en ambos tipos celulares in vitro, aunque de una forma mucho más acusada en la microglía. De forma similar, C/EBP β aumenta tras el tratamiento con LPS in vivo en las células microgliales.
3. En condiciones basales, C/EBP δ se expresa tanto en la microglía como en los astrocitos. El LPS promueve un aumento de la expresión de este factor de transcripción en ambos tipos celulares mediante un efecto directo. En la microglía, el LPS produce un aumento concentración y tiempo-dependiente de C/EBP δ , que está mediado por la acción de ERK1/2. Además del LPS, otros agonistas TLRs producen un aumento similar de C/EBP δ en la microglía.
4. C/EBP β juega un papel en la regulación de la expresión de los mediadores proinflamatorios IL-6, NOS-II y COX-2. Así, en modelos en los que este factor de transcripción se inhibe, como la sobreexpresión de LIP en células BV2 o los cultivos gliales primarios de ratones deficientes en C/EBP β , la producción de dichos mediadores inducida por LPS se ve atenuada.

5.

7 ANEXO

P21^{Cip1} In Glial Activation

Tusell J.M., Ejarque-Ortiz A., Solà C., Saura J. and Serratos J.

Submitted to *Glia*.

El inhibidor de cdk's p21^{Cip1} o p21^{Cip1/Waf1} está implicado en la parada del ciclo y la diferenciación celular en muchos tipos celulares. Sin embargo, recientemente diferentes estudios han mostrado que p21^{Cip1} es una proteína multifuncional que puede regular la progresión del ciclo celular a diferentes niveles. En un trabajo reciente de nuestro laboratorio, se comprobó que la ausencia de p21^{Cip1} no afectaba a la proliferación celular de las células gliales. Además, se postuló el posible papel de p21^{Cip1} en la respuesta inflamatoria producida por el lipopolisacárido (LPS). En el presente trabajo hemos profundizado en este aspecto, estudiando las posibles diferencias entre los ratones silvestres y los ratones deficientes en p21^{Cip1} en la activación glial, mediante la utilización de cultivos mixtos gliales, cultivos enriquecidos de microglía y cultivos enriquecidos de astrocitos. Hemos comparado el efecto producido en la activación glial por LPS, interleuquina-1 β , interleuquina-6 y dos formas (oligomérico y fibrilar) del fragmento 1-42 β -amiloide. La activación glial inducida por LPS y la forma fibrilar del fragmento 1-42 β -amiloide induce el aumento de los niveles de p21^{Cip1}. Además, hemos visto una atenuación de la translocación del factor de transcripción NF- κ B en las células de ratones p21^{Cip1}^{-/-} respecto a las células gliales de ratones silvestres. Nuestros trabajos apoyan el papel de p21^{Cip1} en la activación de los astrocitos y particularmente de la microglía. En base a estos resultados, hipotetizamos que esta proteína podría participar en los efectos neurotóxicos asociados a la activación glial

Submitted to Glia

p21^{Cip1} in Glial Activation

Josep Maria Tusell, Aroa Ejarque-Ortíz, Carme Solà, Josep Saura and Joan Serratosa

Department of Cerebral Ischemia and Neurodegeneration, IIBB-CSIC, IDIBAPS,
Rosselló 161, E-08036 Barcelona, Spain

Running title: p21^{Cip1} in Glial Activation

Word count: 6665

9 figures

0 tables

Address for correspondence:

Joan Serratosa

IIBB-CSIC, IDIBAPS

Rosselló 161, planta 6

08036-Barcelona

Spain

Telephone 3493-3638329

E-mail: jssnmc@iibb.csic.es

Key Words: Cip/Kip in inflammation, glial cells, neuroinflammation, astrocytes, glial cell cultures.

Abstract

The cdk inhibitor p21^{Cip1}, also named p21^{Cip1/Waf1}, is intimately involved in coupling growth arrest to cellular differentiation in several cell types. p21^{Cip1} is a multifunctional protein that might regulate cell-cycle progression at different levels. In a recent study we found no differences in the rate of proliferation between glial cells from wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} mice. In the present study we examined differences in glial activation between glial cells from wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} mice, using mixed glial cultures, microglia-enriched cultures and astrocyte-enriched cultures. We compared the effect of

lipopolysaccharide, interleukin 1 β , interleukin 6 and two forms (oligomeric and fibrillar) of the 1-42 β -amyloid peptide on glial activation. We observed an attenuation of nuclear translocation of the nuclear factor kappa-B in p21^{Cip1}^{-/-} glial cells, when compared with glial cells from wild-type mice. In contrast, tumour necrosis factor- α release was enhanced in p21^{Cip1}^{-/-} microglial cells. In addition glial activation induced by lipopolysaccharide and the fibrillar form of the 1-42 β -amyloid peptide upregulated p21^{Cip1}. Our results support a role for p21^{Cip1} in the activation of astrocytes, particularly in microglia. We conclude that this protein participates in the neurotoxic effects associated with glial activation.

Introduction

Glial cells play a key role in the normal function of the CNS. Under physiological conditions, brain glial cells are involved in the production of trophic factors, the maintenance of ionic homeostasis, buffering the action of neurotransmitters, immune surveillance and neural regeneration in the CNS (Kreutzberg, 1996, Anderson and Swanson, 2000). Microglia are the primary immune cells responsible for detecting invading pathogens and neuronal injury (Aloisi, 1999; Streit et al., 1999). Astroglial and microglial cells respond to neuronal damage, lesions, alterations in neuronal function, toxic agents and infectious agents. Their response involves morphological and functional changes, and is known as glial activation. Reactive astroglial and microglial cells upregulate the expression of a variety of factors, including- growth factors, cytokines, chemokines, adhesion molecules, receptors, nitric oxide (NO), etc. These factors have neurotoxic or neuroprotective properties (Chao et al., 1995, Streit et al., 1999, Vitkovic et al., 2000, Herdegen and Waetzig, 2001, Hauwell et al., 2005). Several

transcription factors participate in glial activation, including nuclear factor kappa-B (NF κ -B) (O'Neill and Kaltschmit, 1997), peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (Kielian and Drew, 2003), activated protein-1 (AP-1) (Herdegen and Waetzig, 2001) and some members of the CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) family of transcription factors (Pérez-Capote et al., 2006; Ejarque-Ortíz et al., 2007a and b). The cascade of microglial activation is a fine-tuned process that is also regulated by factors derived from neurons and other glial populations, in particular astrocytes. Astrocytes are local sources of transforming growth factor- β (TGF- β) and other immunomodulatory or neurotrophic factors, and the prominent role of astrocytes in inducing an immunologically silent state in microglial cells has been demonstrated in a number of experiments in vitro. Astrocytes can induce the transformation of amoeboid into ramified microglial cells, and reduce proliferative activity (Wilms et al., 1997; Jones et al., 1998).

In a previous study (Tusell et al., 2005), we examined the role of the cell cycle inhibitor p21^{Cip1} in glial activation, using mixed glial cultures (approximately 75% astrocytes and 25% microglia). This protein, also called WAF1, CAP20 or Sd1, is the founding member of the Cip/Kip family of CdKIs, which also includes p27 (Toyoshima and Hunter, 1994) and p57 (Lee et al., 1995). p21^{Cip1} plays an essential role in growth arrest after DNA damage (Brugarolas et al., 1995), and its overexpression leads to G1 and G2 (Niculescu et al., 1998) or S-phase arrest (Ogryzko et al., 1997). In addition, a variety of transcription factors (including STATs, C/EBP α and C/EBP β) that are induced by different stimuli activate p21^{Cip1} transcription.

Here we examined whether p21^{Cip1} is involved in the modulation of glial activation produced by LPS, interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and fibrillar or oligomeric 1-42 β -amyloid (A β) peptide. We analysed the release of tumour necrosis factor- α (TNF- α), and the nuclear translocation of NF- κ B. We also studied the expression of p21^{Cip1} after inducing glial activation. Taking into account all the results presented here, we conclude that p21^{Cip1} participates in the neurotoxic effects of glial activation.

Material and Methods

Cell cultures and treatments

Experiments were carried out in accordance with the Guidelines of the European Union Council (86/609/EU), and the Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) for the use of laboratory animals. The study was approved by the Ethics and Scientific Committees of the Hospital Clínic de Barcelona. Mixed glial cultures were prepared from 1- or 2-day-old neonatal C57BL/6 mice (Charles River, Lyon, France). The cerebral cortices were dissected, carefully stripped of their meninges and digested with 0.25% trypsin for 25 min at 37°C. Trypsinization was stopped by adding an equal volume of culture medium (Dulbecco's modified Eagle medium-F-12 nutrient mixture, fetal bovine serum 10%, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL and amphotericin B (Fungizone®), 0.5 µg/mL) to which 0.02% deoxyribonuclease I was added. The solution was pelleted (5 min, 200 × g), resuspended in culture medium and brought to a single cell suspension by repeated pipetting followed by passage through a 105 µm pore mesh. Cells were seeded at a density of 250,000 cells/ml (=62,500 cells/cm²) and cultured at 37°C in humidified 5% CO₂-95% air. The medium was replaced every 5-7 days. Cultures reached confluence after 7-10 days *in vitro* and were used between 12 and 15 days *in vitro*. At this point, they typically consisted of 75% type-I astrocytes and 25% microglia.

Mouse microglial cultures were prepared by mild trypsinization as described (Saura et al, 2003b). Briefly, confluent mixed glial cultures were treated for 30 min with 0.06% trypsin in the presence of 0.25 mM EDTA and 0.5 mM Ca²⁺. This resulted in the detachment of an intact layer of cells containing virtually all the astrocytes, leaving a population of firmly attached cells identified as >98% microglia. The microglial cultures were used twenty-four hours after isolation by this procedure.

Mouse astroglial cultures were prepared by seeding cortical cells prepared as for mixed glial cultures on laminin (20 µg/mL)-coated plates. Laminin-coating favours astroglial growth and inhibits microglial growth (Milner and Campbell 2002). When confluent, cultures were treated with 10 µM cytosine arabinoside for 4 days. Cultures were used one day after the end of cytosine arabinoside treatment. The vast majority of cells were type-I astrocytes. Less than 2% were microglia.

Cell treatments: control cells were treated with culture medium. LPS was treated at a 1µg/mL. IL-1β and IL-6 were used at 20 ng/mL and 100 ng/mL, respectively. The oligomeric and fibrillar Aβ forms were treated at a final concentration of 5 µM.

Isolation of nuclear proteins

For the isolation of nuclear proteins from glial cultures, three, five or six 950-mm² wells of mixed glial, astroglial or microglial cultures, respectively, were used per condition. Cells were scrapped in cold PBS, and centrifuged for 4 min at 7000 x g, and the resulting pellet was resuspended in 400 µL of buffer A: 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol and 0.1 mM EGTA. Cells were then swollen on ice for 15 min. After the addition of 25 µL of 10% Nonidet-40 (buffer B), cells were vigorously vortexed for 10 s. After 10 min incubation on ice, the broken cells were successively spun for 10 min at 3000 x g and for 5 min at 14,000 x g. The pellet was resuspended in 50 µL of buffer C consisting of 20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride and 1 mM dithiothreitol. Solutions A, B, C and PBS were supplemented with the protease inhibitor cocktail Complete®. After a 90-min of gentle shaking at 4°C, the nuclei were pelleted by a 5 min spin at 2000 x g. The supernatant containing nuclear proteins was collected and the protein amount was determined by the Lowry assay.

TNF-α release determination

The amount of TNF-α released into the culture medium was determined with an ELISA kit specific for mouse TNF-α (Diacclone, Besançon, France). The ELISA assay was performed using the standard, following the instructions supplied by the manufacturer.

Western blot

15-20 µg of protein of denatured (5 min, 100°C) nuclear extracts were subjected to SDS-PAGE on a 15% polyacrylamide gel and transferred to a PVDF membrane. The membranes were processed as follows: 1) 5 min in Tris-buffered saline (TBS, 20 mM Tris, 0.15M NaCl, pH=7.5); 2) 10 s in methanol; 3) air dry; 4) overnight incubation at 4°C on primary antibody (rabbit anti- NFκ-B 1:500 or mouse anti p21 1:2000 or rabbit anti-p36 1:5000) diluted in immunoblot buffer (TBS containing 0.05% Tween-20 and 5% nonfat dry milk); 5) 2x 15 s in TBS 0.05% Tween-20; 6) 1 hour in HRP-labelled anti mouse or anti-rabbit antibody diluted 1:5000 in immunoblot buffer; 7) extensive washes in TBS-0.05% Tween-20; 8) 5 min in ECL-Plus. Membranes were exposed to the

camera of a VersaDoc system and chemiluminescence was quantified using Quantity One 5.4.1 software.

Immunocytochemistry

For immunocytochemistry, cultured cells were fixed with 4 % paraformaldehyde for 20 min at room temperature. When immunocytochemistry was revealed with diaminobenzidine, the protocol was: 7 min in 0.3% H₂O₂ in methanol, 2 x 15 min in PBS, overnight in primary rabbit anti NFκ-B antibody (1:500) or mouse anti p21 antibody (1:500), 2 x 15 min in PBS, 1 h in biotinylated anti-rabbit or biotinylated anti mouse antibody (1:200), 2 x 15 min in PBS, 1 h in ExtrAvidin-HRP (1:500), 5-10 min in diaminobenzidine (1 mg/ml)- 0.15% H₂O₂ in PBS. All steps were performed at room temperature except the primary antibody incubation (4°C). All antibodies were diluted in PBS containing 10% normal goat serum.

The cellular localization of p21^{Cip1} expression after treatment with Aβ peptides was determined by double immunocytochemistry, immunofluorescence labelling was carried out in cells where p21^{Cip1} immunoperoxidase labelling had been performed. A rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) polyclonal antibody (1:2000) was used to label astroglial cells and an anti-CD11b monoclonal antibody (1:500) was used to label microglial cells. Cells were incubated with the primary antibodies in 1% goat serum overnight at 4°C, and with goat anti-rabbit ALEXA 488 and goat anti-mouse ALEXA 546 secondary antibodies (1/500) in 1% goat serum for 1 h at room temperature. After extensive washing in PBS, cells were stored at 4°C. All samples were photographed on an Olympus fluorescence microscope equipped with a digital camera Color View 12 powered by a HBO 100 lamp.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was isolated with Absolutely RNA Miniprep kit and reverse transcribed with random primers using Sensiscript-RT. The primers used to amplify mouse the toll-like receptor 4, TLR4 mRNA were 5'-CCTCTGCCTTCACTACAGAGACTTT-3' (forward) and 5'-TGTGGAAGCCTTCCTGGATG-3' (reverse). To normalise of Ct values to an endogenous control the following mouse actin mRNA primers were used: 5'-CAACGAGCGGTTCGGATG-3' (forward) and 5'-GCCACAGGATTCCATACCCA-3' (reverse). Real time PCR was carried out with IQ SYBRGREEN SuperMix and iCycler IQ equipment. Primer efficiency was estimated from standard curves generated

by dilution of a cDNA pool. Samples were run for 40 cycles (30 sec 95°C, 1 min 55°C, 30 sec 72 °C). Two samples per condition were analyzed in triplicate in each experiment and 3 independent experiments were performed.

Preparation of fibrillar and oligomeric A β peptides

A β peptide was prepared according to the protocol described by (Dahlgren et al, 2002). Briefly, A β was dissolved in hexafluoroisopropanol, desiccated and dissolved in dimethyl sulfoxide to 5 mM. This solution was brought to 100 μ M by dilution in 10 mM HCl, aged for 24 hours at 37°C (Fibrillar) or diluted in Ham-phenol free and aged for 24 hours at 4°C (Oligomeric). After 24 h of aging, the two A β forms were immediately applied to the cells at the required concentration.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test (TLR4 mRNA determination) or Student's t-test (Western blot quantification and TNF- α release determination). Differences were considered significant if $p < 0.05$.

Results

TNF- α expression is dependent on p21^{Cip1} in microglial cells

Figure 1A shows the results obtained in microglia enriched cultures. The increase in TNF- α released by microglia in the culture medium 24 h after LPS treatment was higher ($p < 0.05$, Student's t test) in p21^{Cip1}^{-/-} than in wild-type cultures (13.2 pg/mL in wild-type mice microglia and 26.3 pg/mL in p21^{Cip1}^{-/-} mice microglia). However, in astrocyte-enriched cultures, there were no significant differences between wild-type astrocytes and p21^{Cip1}^{-/-} astrocytes (Figure 1B). These results suggest that, microglial cells are responsible for the higher increase in TNF- α release in glial cells from p21^{Cip1}^{-/-} mice.

The increase in the NF- κ B expression is reduced in p21^{Cip1}^{-/-} glial cells

Figure 2A shows a representative Western blot from nuclear extracts of mixed glial cultures. NF- κ B nuclear translocation was reduced in p21^{Cip1}^{-/-} mice glia 24 h after LPS,

IL-1 β or IL-6 treatments. The quantification of Western blot shows that p65 increased 2.3 fold ($p < 0.01$ Student's t test) after LPS treatment in wild-type cultures and 1.2 fold (not significant, n.s.) in p21^{Cip1}^{-/-} cultures. After IL-1 β , p65 increased 1.7 fold ($p < 0.01$) in wild-type cultures and no differences in p21^{Cip1}^{-/-}. Finally, IL-6 treatment produced a 1.9 ($p < 0.01$) fold increase in wild-type mice glia, whilst there was no increase in p21^{Cip1}^{-/-} mice glia. Similar results were also given by immunocytochemistry (Figure 2B). The same effect was observed for the different treatments: the increase in NF- κ B nuclear translocation was lower in p21^{Cip1}^{-/-} glia than in wild-type glia.

In microglia-enriched cultures, a strong increase in NF- κ B nuclear translocation was observed in wild-type cultures after treatment with proinflammatory factors. This was revealed by both Western blot and immunocytochemistry (Figure 3A). The increase in NF- κ B nuclear translocation was lower in p21^{Cip1}^{-/-} microglia. The increase was 1.9 ($p < 0.05$) times the control value in wild-type microglia and 1.4 (n.s) times in p21^{Cip1}^{-/-} microglia after 24 h of LPS treatment. IL-1 β and IL-6, treatment did not induce any increase. Figure 3B show p65 nuclear translocation in the different experimental conditions, as revealed by immunocytochemistry. The effect was similar to that shown by Western blot.

In astrocyte-enriched cultures, the increase in NF- κ B nuclear translocation after LPS was lower in astrocytes from p21^{Cip1}^{-/-} mice than in astrocytes from wild-type mice (Figure 4A and 4B). Quantification of Western blot after LPS treatment (Figure 3A) showed 1.7 ($p < 0.05$) fold increase in the control value in wild-type astrocytes, while there was no detectable increase in p21^{Cip1}^{-/-} astrocytes. IL-1 β and IL-6 treatments did not produce any detectable increase in either wild-type astrocytes or in p21^{Cip1}^{-/-} astrocytes. The same effect was observed by immunocytochemistry (Figure 4B).

The study of both cell types together (mixed cultures) or the study of each cell type individually (either astrocytes or microglia) showed that, either way, p21^{Cip1}^{-/-} glial cells had a reduced capacity to translocate NF- κ B into the nucleus.

TLR4 expression

The toll-like receptor 4 (TLR4) is the receptor for LPS-dependent signalling (Heine et al., 1999). For this reason, we studied whether the LPS treatment produced different expression of TLR4 in glial cells from wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} mice. Figure 5 shows the results obtained by quantitative real time PCR. LPS treatment caused a similar decrease in TLR4 mRNA expression in wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} glial cells. We did not observe

any differences in TLR4 protein expression by immunocytochemistry (data not shown). These results suggest that TLR4 expression is not modified in p21^{Cip1}^{-/-} glial cells.

p21^{Cip1} expression increases during glial activation

We studied the effect of LPS, IL-1 β and IL-6 on p21^{Cip1} protein expression 24 h after treatment. Figure 6A shows the results obtained in mixed glial cultures. Western blots show that LPS treatment caused an increase of 2.6 (p<0.05) times the control value. The increase was less marked after IL-1 β treatment (1.6 times, n.s.) and even milder after IL-6 treatment (1.3 times, n.s.). Figure 6D a, d,g, and j panels show the results obtained by immunocytochemistry: a strong increase in p21^{Cip1} immunolabeling after LPS treatment and no increase after IL-1 β or IL-6 treatment.

In microglia-enriched cultures, the increase of p21^{Cip1} produced by LPS treatment was also very clear. LPS treatment resulted in an increase that was 2.6 (p<0.001) times the control value (Figure 6B). After IL-1 β treatment, this increase was 2.2 (p<0.05) times the control value. This increase was lower after IL-6 treatment (1.6 times, p<0.01). The values obtained by immunocytochemistry were consistent (figure 6D, panels b, e, h and k) with those obtained by Western blot.

In astrocyte-enriched cultures, there was an increase of p21^{Cip1} protein only after LPS treatment (1.5 times, p<0.05 the control value, Figure 6C). The values obtained by immunocytochemistry (figure 6D c, f, i, and l) are consistent with those obtained by Western blot.

Treatment with A β increases p21^{Cip1} expression in glial cultures

In addition to the treatments with the proinflammatory agents studied up to this point, we also examined the effect of A β treatment on p21^{Cip1} expression in glial cells. Both oligomeric and fibrillar A β were used. LPS was used as a positive control of glial activation.

Figure 7A shows the results obtained by Western blot on NF- κ B translocation after treatment with LPS or the two types of A β . LPS treatment of wild-type glial cell cultures produced a strong increase in NF- κ B (5.1, p<0.01, times the control value) in the cell nucleus. Fibrillar A β produced more moderate increases (around 3.6, p<0.05). Oligomeric A β did not produce any effect. In glial cultures from p21^{Cip1}^{-/-} mice, LPS produced a lower increase (2.0 p<0.05). After treatment with A β forms, the results were the same as the control values.

Figure 7B shows a mixed culture by phase contrast microscopy 24 h after the different treatments. Panels a, and b correspond to control cells from wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} mice, respectively. These images are very similar to those from cultures 24 h after treatment with oligomeric A β (Figure 7B, c and d). However, treatment with fibrillar A β (Figure 7B, e and f) induced a change in the morphology of the cultures. The smaller refringent cells corresponding to microglial cells, had disappeared. This effect was observed both in wild-type and in p21^{Cip1}^{-/-} cultures. After LPS treatment, the two cultures (figure 7B, g and h) had the same appearance as the control cells or the cells treated with oligomeric A β .

We also analysed the effect of LPS and A β peptide treatments on TNF- α release into the culture medium. There were no significant differences between the control and treatment values either type of mixed glial cultures (wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} mice). LPS induced a TNF- α release in wild-type which was significantly higher in p21^{Cip1}^{-/-} glial cultures. A β did not induce TNF- α release in wild-type or p21^{Cip1}^{-/-} (results not shown). Figure 8 shows the p21^{Cip1} protein expression after treatment with the two types of A β or LPS. Figure 8A shows a Western blot obtained after the different treatments. The quantification of Western blots showed that fibrillar A β treatment resulted in 4.2 (p<0.05) times more p21^{Cip1}^{-/-} protein expression than in control. There were no differences between treated cultures and the control after A β oligomeric treatment. LPS treatment resulted in an increase of 2.1(p<0.05) times more than the control value. The Western blots obtained from p21^{Cip1}^{-/-} mixed glial cultures did not present the p21^{Cip1} band. This negative control was used to verify antibody specificity. Figure 8B shows the results of immunocytochemistry. A strong increase in p21^{Cip1} expression was observed after fibrillar A β (Figure 8B, e) or LPS treatment (Figure 8B, g). Oligomeric A β treatment (Figure 8B, c) produces a weaker increase. Panels b, d, f and h in Figure 8B correspond to treatments carried out with cultures from p21^{Cip1}^{-/-} mice. No immunoreactivity indicating the specificity of the p21^{Cip1} antibody was observed.

Figure 9 shows a double immunostaining, carried out to find out whether p21^{Cip1} increases after fibrillar A β treatment in the two cell types contained in the mixed culture (microglia and astrocytes). The results show that there was a p21^{Cip1} increase in both microglia (Figure 9, a,b) and astrocytes (Figure 8, c and).

Discussion

In a preliminary study (Tusell et al., 2005), we examined possible differences in the process of glial activation between mixed glial cultures (microglia and astrocytes) from

wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} mice. We compared the effect of serum mitogenic stimulation on proliferation rate and on the total number of glial cells. No differences between wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} were observed. We also compared the effect of LPS on NO and TNF- α release and nuclear NF- κ B translocation as indicators of glial activation. We observed an attenuation of NO release and NF- κ B activation in p21^{Cip1}^{-/-} glial cells when compared with glial cells from wild-type mice. In contrast TNF- α was enhanced in p21^{Cip1}^{-/-}. These results suggest that the role of p21^{Cip1} in the glial inflammatory response does not depend on its function as an inhibitor of cell proliferation. In the present study, we further examined the role of p21^{Cip1} in glial activation to determine whether it differentially contributes to astroglial and microglial activation. Thus, we studied p21^{Cip1} in mixed, microglial-enriched and astroglial-enriched glial cultures (with above 95% purity for each cell type). In the aforementioned study, we evaluated the effect of LPS, an agent widely used to induce glial activation. In the present study, we extended this work by using two proinflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) and two forms of the peptide A β . Finally, we also examined the way in which the different treatments affected p21^{Cip1} protein expression. As glial activation indicators, we measured TNF- α release into the culture medium and NF- κ B nuclear translocation. The results confirm that mixed glial cells from p21^{Cip1}^{-/-} mice had a higher increase of TNF- α release in response to LPS. However we demonstrated that this effect was basically caused by microglial cells (Figure 1A, B) rather than astrocytes.

Glial cells from wild-type mice increased NF- κ B translocation after treatments with LPS, IL-1 β and IL-6. Such increases were significant in both mixed cultures and microglia-enriched cultures. However, astrocytes from wild-type mice only showed a significant increase in NF- κ B translocation after LPS treatment. As regards nuclear NF- κ B translocation, we showed that glial cells from p21^{Cip1}^{-/-} mice had a reduced capacity to activate NF- κ B. In contrast, TNF- α release was increased in LPS-treated p21^{Cip1}^{-/-} glial cells compared with glial cells from wild-type mice. Similarly, Ledebor et al. (2000) used primary co-cultures of astroglial and microglial cells, to show that TGF- β 1/ β 2 selectively suppresses the production of NO, but not the induction of IL-1 β , IL-6 or TNF- α by LPS treated cells. In LPS-activated co-cultures of microglia and astrocytes it has been suggested that TNF- α and IL-6 are produced primarily by microglial cells (Lee et al., 1993; Sebire et al., 1993). However production of these cytokines by astrocytes cannot be ruled out (Benveniste et al., 1990; Sawada et al., 1992).

Experimental evidence points to a relationship between NF- κ B activation, p21^{Cip1} expression and TNF- α expression. Basile et al. (2003) showed that the ability of TNF- α to induce cytostasis in primary human epithelial cells was due to NF- κ B-mediated induction of p21^{Cip1}. Moreover, TNF- α triggered a pronounced anti apoptotic response, induced by an NF- κ B-mediated increase of p21^{Cip1} in primary human keratinocytes. Although we observed that p21^{Cip1} glial cells, particularly microglia, reduced NF- κ B activation, they also showed increased TNF- α production. Other molecules may compensate for the lack of protein p21^{Cip1}. Thus, the relationship between this protein and the other two (NF- κ B and TNF- α) could be modified.

These results show that p21^{Cip1} is involved in glial activation after LPS treatment. They are in agreement with the results obtained by Ring et al. (2003) in an in vivo study that used LPS as a model for acute inflammation. These authors reported that p21^{Cip1} is induced in the mouse CNS as part of the acute response to inflammation, suggesting that this induction is a cytokine signalling event, involving TLR4. This receptor is required for the transduction of LPS signals in monocytes and macrophages (Qureshi et al., 1999). Microglia is the most important cell type in the resting CNS that expresses TLR4 (Lenhardt et al., 2003). Our results show that no differences are observed in TLR4 expression between glial cells from wild-type or p21^{Cip1} mice. Microglia from TLR4-deficient mice have been used to demonstrate that this receptor is responsible, in part, for microglial activation in response to LPS (Kitamura et al., 2001; Qin et al., 2005). Systemic LPS administration to rats and mice induces a robust increase in TLR2 expression in the CNS, whereas TLR4 is reduced (Laflamme et al., 2001, 2003). We also detected a decrease in TLR4 expression after LPS treatment in mixed glial cultures, in glial cells from wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} mice. Numerous studies using co-culture paradigms have documented that LPS activated microglia induce neuron and oligodendrocyte cytotoxicity (Qin et al., 2004; Shie et al., 2005). However, whether this effect is mediated by TLR4 has not yet been demonstrated (Kielian, 2006). In vivo evidence of the role of TLR4 in LPS-dependent CNS injury was found in an experimental model of neurodegeneration using systemic administration of LPS (Lehnardt et al., 2003).

Finally, we observed that none of the oligomeric and fibrillar A β forms, modified TNF- α release in mixed glial cultures of wild-type or p21^{Cip1}^{-/-} mice. Although a moderate increase in NF- κ B translocation was observed in wild-type cultures treated with both A β forms, no effect was observed in p21^{Cip1}^{-/-} cultures. However, we did observe a

change in the appearance of the culture treated with fibrillar A β . This was seen in wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} glia. Similarly, we observed an increase in p21^{Cip1} expression in glial cells treated with the fibrillar form, but not in those treated with the oligomeric form. In a previous study, we showed that the effect of A β on microglial activation depended on the aggregation state of the peptides (Casal et al., 2002). It is unclear how the difference in the aggregation of peptides accounts for the difference in bioactivity. However, particular conformations of peptides could determine the receptor activation potential, due to secondary and tertiary peptide conformations. In some cases, these conformations might be incapable of efficient binding and activate glial receptors that induce immune activation and inflammatory cascades.

In summary, the present results implicate p21^{Cip1} protein in glial activation. The mechanisms involved in the expression of this protein and TNF- α activation or NF- κ B activation need to be studied further. There are probably other molecules involved. Preliminary studies that are underway in our laboratory suggest that some transcription factors from the C/EBPs family require p21^{Cip1} to be activated during glial activation. Moreover, the increases in p21^{Cip1} after treatment with fibrillar A β peptide suggest that p21^{Cip1} may be involved in the chronic glial response in Alzheimer's disease.

Acknowledgements

The authors thank Professor Oriol Bachs (Faculty of Medicine, University of Barcelona, Spain) for the gift of p21^{Cip1}^{-/-} mice with the authorization of Dr. Manuel Serrano from the Spanish National Cancer Center (CNIO). This work was supported by grants PI 050658 and PI040778 from the Instituto de Salud Carlos III of the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs.

REFERENCES

- Aloisi F. 1999. The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. *Adv Exp Med Biol* 468:123-133.
- Anderson CM, Swanson RA. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions. *Glia* 32:1-14.

Basile JR, Eichten A, Zacny V, Münger K. 2003. NF- κ B-mediated induction of p21^{Cip1/waf1} by tumour necrosis factor α induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. *Mol Cancer Res* 1:262-270.

Benveniste EN, Sparacio SM, Norris JG, Grenett HE, Fuller GM. 1990. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol* 30:210-222.

Brugarolas J, Chadrasekaran C, Gordon J, Beach D, Jacks T, Hannon G. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377:552-557.

Casal C, Serratosa J, Tusell JM. 2002. Relationship between β -AP peptide aggregation and microglial activation. *Brain Res* 928:76-84.

Chao CC, Hu S, Peterson PK. 1995. Glia, Cytokines and Neurotoxicity. *Crit Rev Neurobiol* 9:189-205.

Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Jr, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. 2002. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277:32046-32053.

Ejarque-Ortíz A, Medina MG, Tusell JM, Pérez-González AP, Serratosa J, Saura J. 2007a. Upregulation of CCAAT/Enhancer Binding Protein β in Activated Astrocytes and Microglia. *Glia* 55:178-188.

Ejarque-Ortíz A, Tusell JM, Serratosa J, Saura J. 2007b. CCAAT/Enhancer binding protein- α is down-regulated by toll-like receptor agonists in microglial cells. *J Neurosci Res* 85:985-993.

Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P. 2005. Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Res Brain Res Rev* 48:220-233.

Heine H, Kirschning CJ, Lien E, Monks BG, Rothe M, Golenbock DT. 1999. Cutting edge: cells that carry a null allele for Toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol* 162:6971-6975.

Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G. 1998. Transforming growth factor betas 1, 2 and 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer. *Brain Res* 795: 301-306.

Herdegen T, Waetzig V. 2001. AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration. *Oncogene* 20:2424-2437.

Kielian T, Drew PD. 2003. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J Neurosci Res* 71:315-325.

Kielian T. 2006. Toll-like receptors in central nervous system. Glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 83:711-730.

Kitamura Y, Kakimura J, Koike H, Umeki M, Gebicke-Haerter PJ, Nomura Y, Taniguchi T. 2001. Effects of 15-deoxy-delta(12,14) prostaglandin J and interleukin-4 in toll-like receptor-4-mutant glial cells. *Eur J Pharmacol* 411:223-230.

Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.

Laflamme N, Soucy G, Rivest S. 2001. Circulating cell wall components derived from gram-negative, not gram-positive, bacteria cause a profound induction of the gene encoding Toll-like receptor 2 in the CNS. *J Neurochem* 79:648-657.

Laflamme N, Echchannaoui H, Landmann R, Rivest S. 2003. Cooperation between Toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *Eur J Immunol* 33:1127-1138.

Ledeboer A, Brevé JJ, Poole S, Tlders FJ, Van Dam AM. 2000. Interleukin-10, interleukin-4 and transforming growth factor- β differentially regulate

lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia* 30:134-142.

Lee MH, Reynisdottir I, Massagué J. 1995. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9:639-649.

Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. 1993. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 β . *J Immunol* 150:2659-2667.

Lenhardt S, Massillon L, Follet P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA. 2003. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8514-8519.

Milner R, Campbell IL. 2002. Cytokines regulate microglial adhesion to laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the α 6 β 1 integrin. *J Neurosci* 22:1562-1572.

Niculescu AR, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. 1998. Effects of p21 (Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18:629-643.

Ogryzko VV, Wong P, Howard BH. 1997. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 17:4877-4882.

O'Neill LA, Kaltschmidt C. 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20:252-258.

Pérez-Capote K, Saura J, Serratosa J, Solà C. 2006. Expression of C/EBP α and C/EBP β in glial cells in vitro after inducing glial activation by different stimuli. *Neurosci Lett* 410:25-30.

Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, Liu B, Hong JS. 2004. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem* 279:1415-1421.

Qin L, Li G, Qian X, Liu Y, Wu X, Liu B, Hong JS, Block ML. 2005. Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia* 52:78-84.

Qureshi ST, Lariviere I, Leveque G, Clermont S, Moore K, Gros P, Malo D. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189:615-625.

Ring RH, Valo Z, Gao C, Barish ME, Singer-Sam J. 2003. The cdkn 1a gene (p21^{Waf1/Cip1}) is an inflammatory response gene in the mouse central nervous system. *Neurosci Lett* 350:73-76.

Saura J, Tusell JM, Serratosa J. 2003b. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44:183-189.

Sawada M, Suzunura A, Marunouchi T. 1992. TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but no microglia. *Brain Res* 583:296-299.

Sebire G, Emilie D, Wallon C, Hery C, Devergne O, Delfraissy JF, Galanaud P, Tardieu M. 1993. In vitro production of IL-6, IL1 beta, and tumour necrosis alpha by human embryonic microglial and neural cells. *J Immunol* 150:1517-1523.

Shie FS, Montine KS, Breyer RM, Montine TJ. 2005. Microglial EP2 is critical to neurotoxicity from activated cerebral innate immunity. *Glia* 52:70-77.

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-581.

Toyoshima H, Hunter T. 1994. p27 a novel inhibitor of G1 cyclin/cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78:67-74.

Tusell JM, Saura J, Serratosa J. 2005. Absence of the cell cycle inhibitor p21^{Cip1} reduces LPS-induced NO release and activation of the transcription factor NF- κ B in mixed glial cultures. *Glia* 49:52-58.

Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C. 2000. "Inflammatory" Cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74:457-471.

Wilms H, Hartmann D, Sievers J. 1997. Ramification of microglia, monocytes and macrophages in vitro: influences of various epithelial and mesenchymal cells and their conditioned media. *Cell Tiss Res* 287:447-458.

Figure Legends

Figure 1. TNF- α release in microglia-enriched cultures (A) and in astrocyte-enriched cultures (B) from wild-type (WT) and p21^{Cip1}^{-/-} (KO) mice 24 h after LPS treatment. In both graphs, the data show the mean \pm SD of five independent experiments. Data were expressed as a quotient between LPS treated cells versus their control value. *p<0.05, Student's t test.

Figure 2. Nuclear translocation of NF- κ B in mixed glial cultures from WT and KO mice using an anti-p65 subunit antibody. (A) Western blot from nuclear extracts of mixed glial cultures after 24 h of LPS, IL-1 β and IL-6 treatments. p36 was used as a loading control. This western blot is representative of three independent experiments. (B) Immunocytochemistry of the mixed glial cultures using the anti-p65 subunit antibody; a and b control glial cells from wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} mice, respectively; c and d glial cells after 24h of LPS treatment; e and f glial cells after 24h of IL-1 β treatment; g and h glial cells after 24h of IL-6 treatment. Images are representative of at least three independent experiments. Bar= 50 μ m.

Figure 3. Nuclear translocation of NF- κ B in microglial-enriched cultures from WT and KO mice using the anti-p65 subunit antibody. (A) Western blot from nuclear extracts of microglial cells after 24 h of all treatments. p36 was used as a loading control. This Western blot is representative of three independent experiments. (B) Immunocytochemistry of the microglial cultures using the anti-p65 subunit antibody; a and b control microglial cells from wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} mice, respectively; c and d microglial cells after 24h of LPS treatment; e and f microglial cells after 24h of IL-1 β treatment; g and h microglial cells after 24h of IL-6 treatment. Images are representative of at least three independent experiments. Bar= 50 μ m.

Figure 4. Nuclear translocation of NF- κ B in astroglial-enriched cultures from WT and KO mice using the anti-p65 subunit antibody. (A) Western blot from nuclear extracts of astrocytic cells after 24 h of all treatments. p36 was used as a loading control. This western blot is representative of three independent experiments. (B) Immunocytochemistry of the astrocyte cultures using the anti-p65 subunit antibody; a and b control astroglial cells from wild-type and p21^{Cip1}^{-/-} mice, respectively; c and d astroglial cells after 24h of LPS treatment; e and f astroglial cells after 24h of IL-1 β treatment; g and h astroglial cells after 24h of IL-6 treatment. Images are representative of at least three independent experiments. Bar= 50 μ m.

Figure 5. TLR4 mRNA expression in mixed glial cells. After 6h of LPS treatment no differences between WT and P21^{Cip1} KO were observed. Data shown the mean \pm SD of three independent experiments. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. * $p < 0.05$ versus their control value.

Figure 6. Expression of p21^{Cip1} in glial cells after the different treatments. A, B and C show the Western blots from mixed glial cultures (A), microglial-enriched cultures (B), and astroglial-enriched cultures (C) from wild-type mice using an anti-p21^{Cip1} specific antibody. Results were obtained after 24h of LPS, IL-1 β and IL-6 treatments. Actin was used as a marker of protein loading. The Western blots are representative of three independent experiments. (D) shows the results obtained by immunocytochemistry using the anti-p21^{Cip1} antibody; a, b, and c control cells from mixed glial cultures, microglial-enriched cultures and astroglial-enriched cultures respectively; d, e and f show the images from each cell culture type obtained after 24h of LPS treatment; g, h and i show the results after 24h of L-1 β treatment; j, k and l show the results after 24h of IL-6 treatment. Images are representative of at least three independent experiments. Bar=50 μ m.

Figure 7. Effect of A β peptide forms in glial cells. (A) shows the western blot of nuclear extracts from mixed glial cultures from WT and KO mice using the p-65 subunit antibody after 24h of treatment with the oligomeric A β form (OLG) and with fibrillar A β (FIB). LPS was used as a positive control of glial activation after 24h of the treatment. p36 was used as a loading control. This Western blot is representative of three different experiments. (B) shows the appearance by phase contrast microscopy of the mixed glial cells 24h after the diverse treatments; a and b show the control mixed glial cells from wild-type and p21^{Cip1} mice respectively; c and d show the glial cells after treatment with the OLG; e and f show the changes in cell appearance after treatment with FIB; g and h show the aspect of the glial cells after LPS treatment. Images are representative of at least three independent experiments. Bar= 50 μ m.

Figure 8. Effect of A β peptide forms on p21^{Cip1} expression in mixed glial cultures. (A) shows the western blot from nuclear cell extracts using the ant-p21^{Cip1} antibody. Mixed glial cultures from KO were used as a negative control to verify the specificity of the p21^{Cip1} antibody. In WT glial cells, LPS and FIB produce an increase of nuclear p21^{Cip1}

protein. p36 was used as a loading control. This Western blot is representative of three independent experiments. (B) shows the immunocytochemistry after 24h of all treatments. p21^{Cip1}^{-/-} mixed glial cells (b, d, f, h) were used to verify the antibody specificity. As in the case of Western blot, only the treatments with FIB (e) and LPS (g) produced an increase in p21^{Cip1} in the nuclei of glial cells; a and b show control cells from WT and KO respectively; c and d show glial cells after treatment with OLG; e and f are glial cells after FIB treatment; g and h are glial cells after LPS treatment. Images are representative of at least three independent experiments. Bar= 50µm.

Figure 9. Expression of p21^{Cip1} in mixed glial cultures after 24h of FIB treatment. The p21^{Cip1} expressing cells in mixed glial cultures were detected by double immunocytochemistry. Images show p21^{Cip1} immunolabelling (left column, a and c) and CD11b or GFAP immunofluorescence respectively (right column, b and d). After 24h of treatment with FIB, nuclear expression of p21^{Cip1} was observed in CD11b positive cells (microglia, arrowheads in a, b) and in GFAP positive cells (astrocytes, arrowheads in c, d); a, and b are in the same microscopic field; c and d are in the same microscopic field. Bar=50µm.

Figure 1.

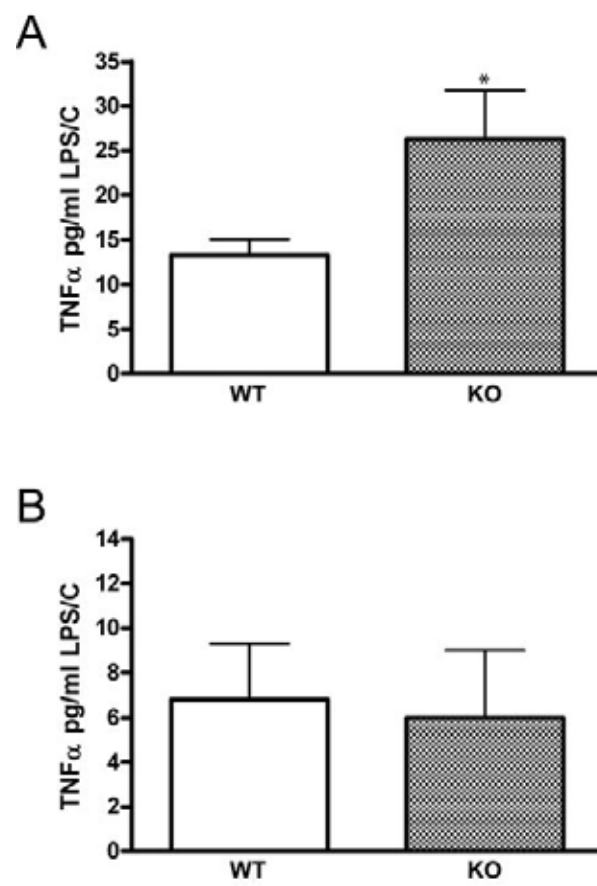


Figure 2.

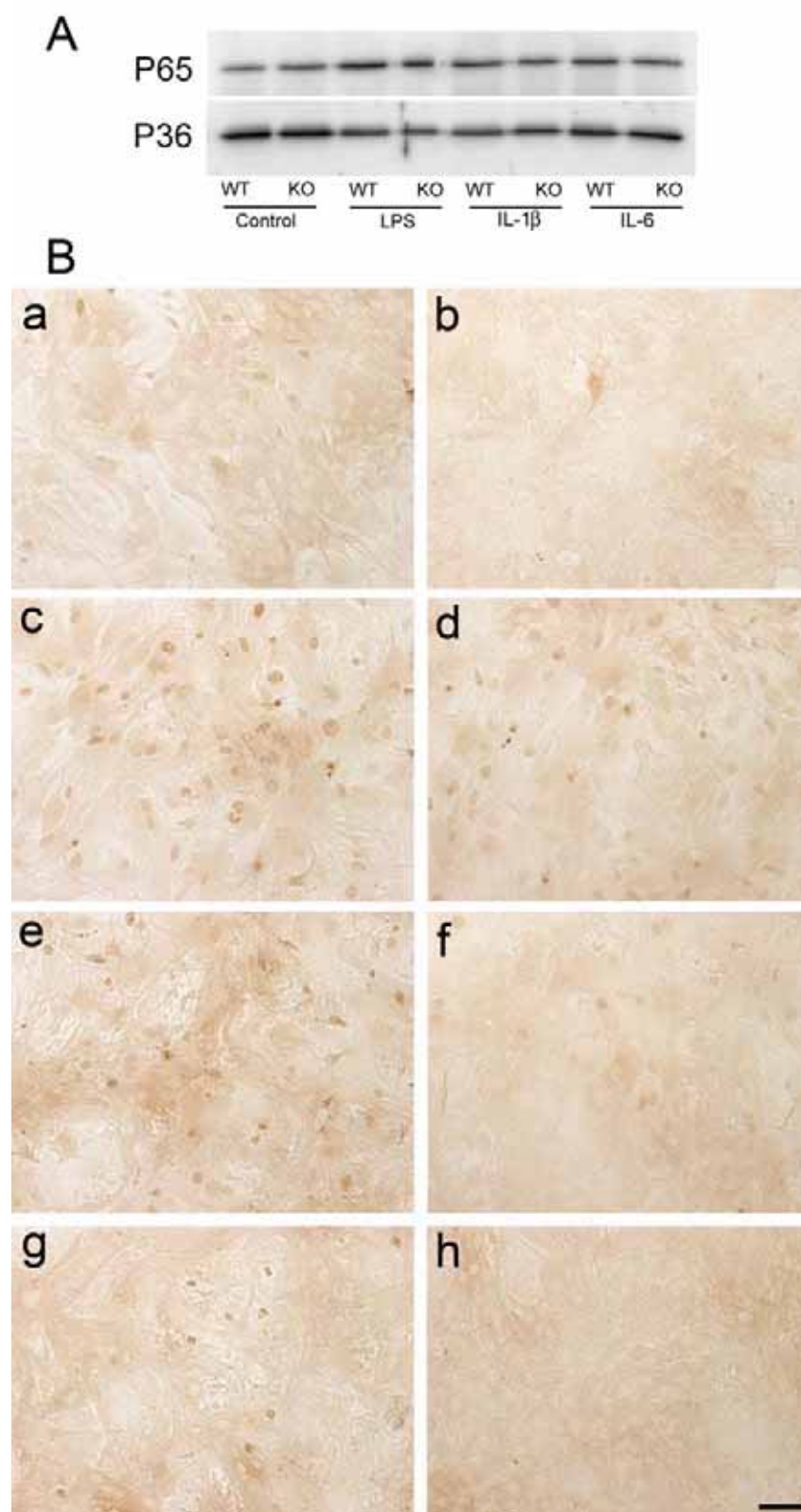


Figure 3.

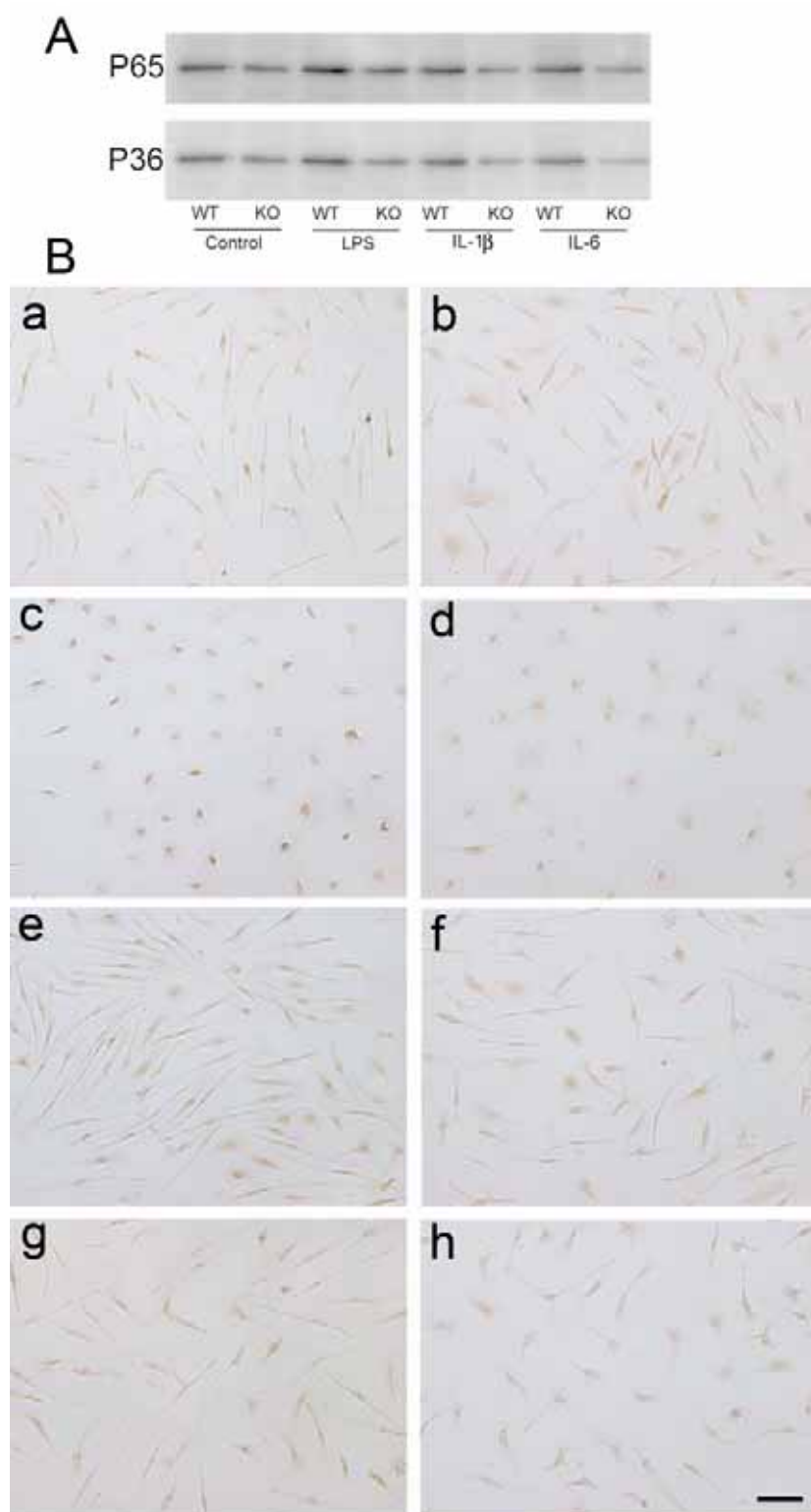


Figure 4.

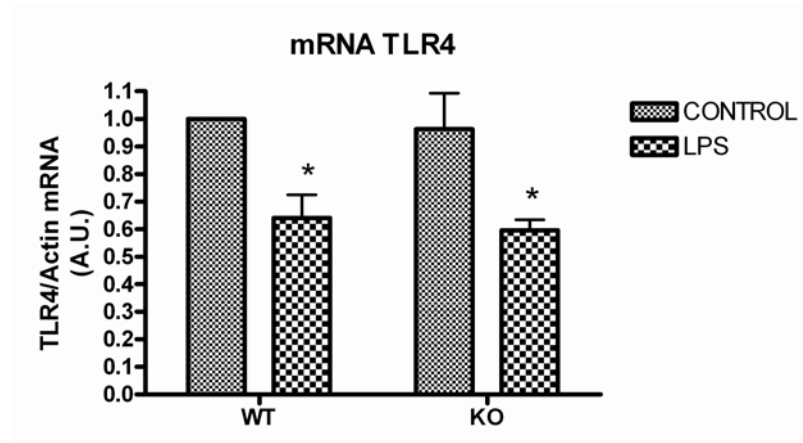


Figure 5.

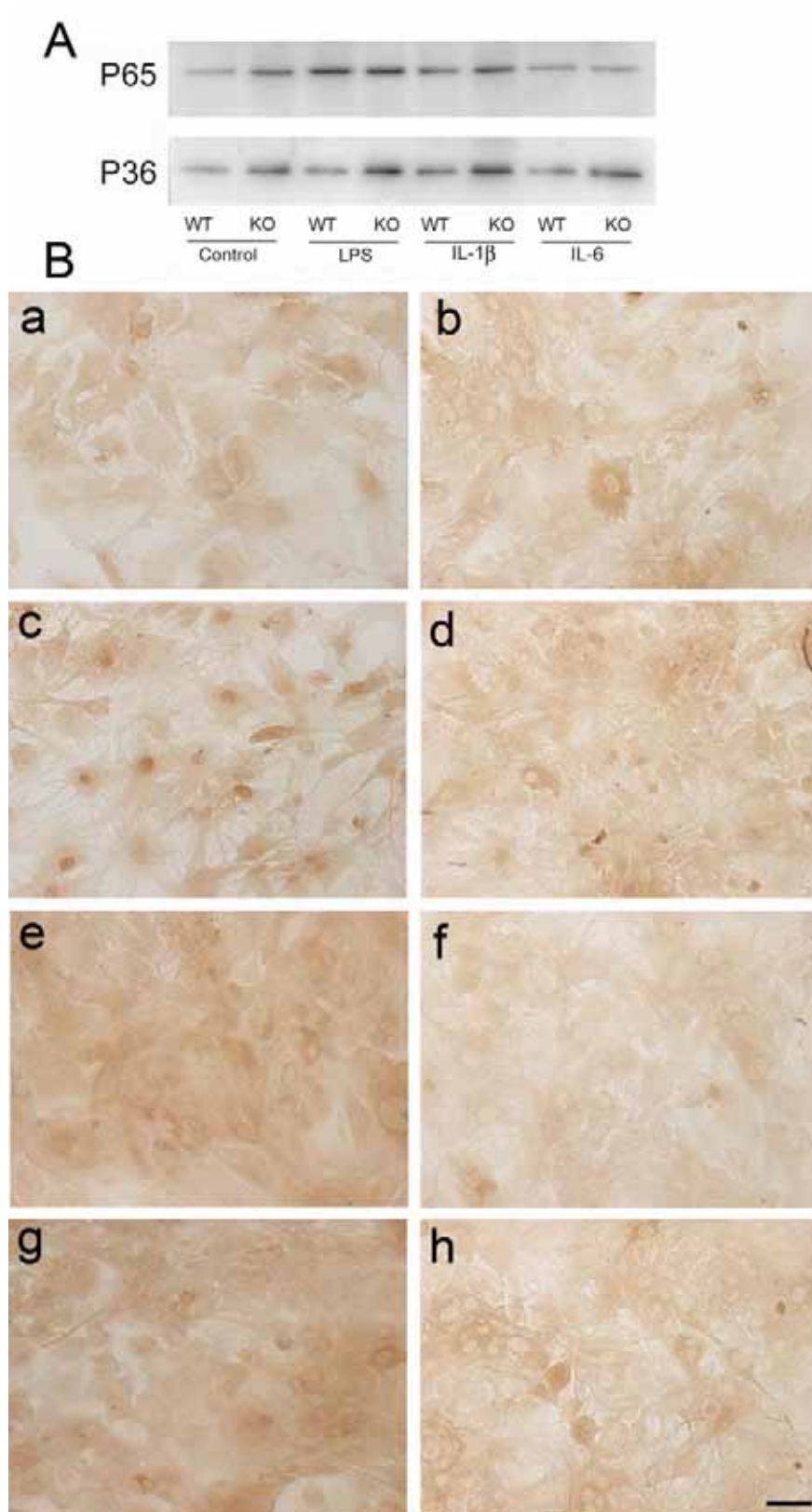


Figure 6.

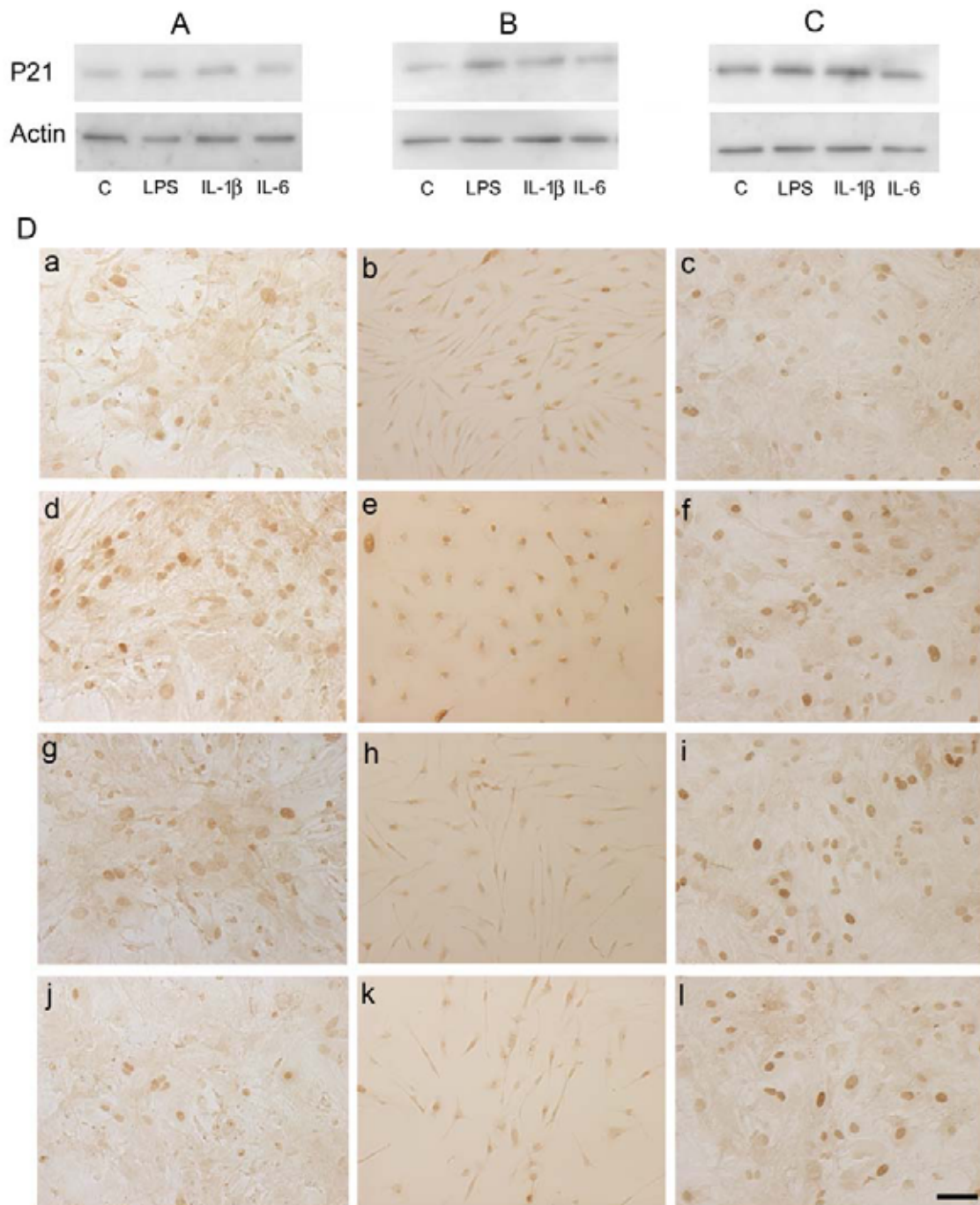


Figure 7.

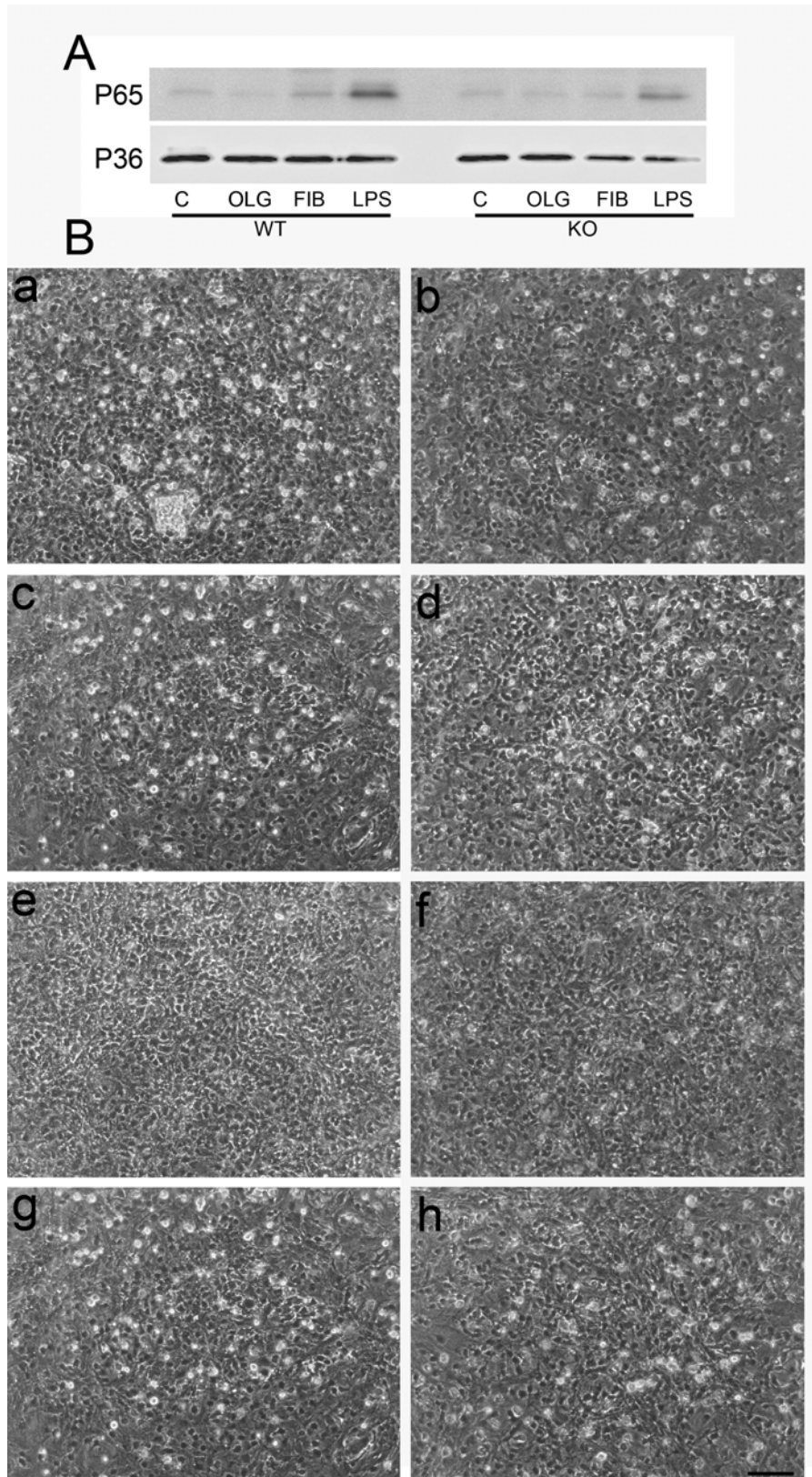


Figure 8.

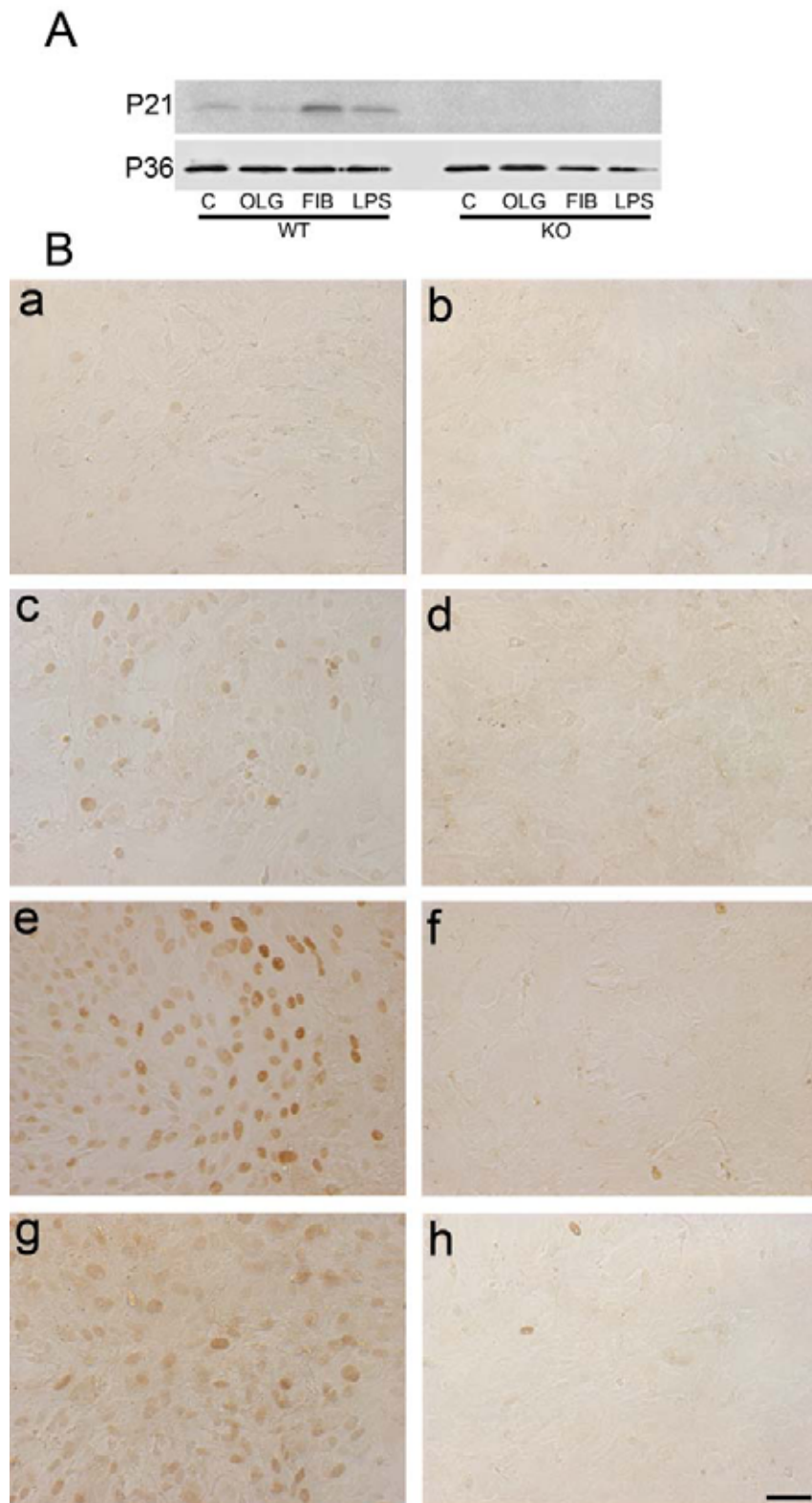
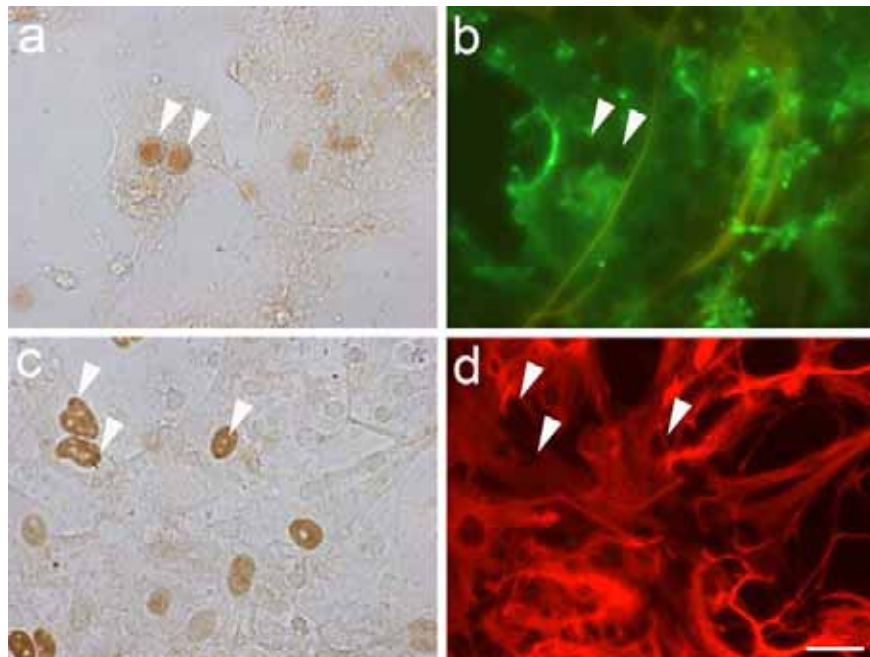


Figure 9.



8 BIBLIOGRAFÍA

A

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nat Rev Neurosci** 2006: **7**:41-53.
- Abraham S, Sweet T, Sawaya BE, Rappaport J, Khalili K, Amini S Cooperative interaction of C/EBP beta and Tat modulates MCP-1 gene transcription in astrocytes. **J Neuroimmunol** 2005: **160**:219-227.
- Acarin L, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. **J Histochem Cytochem** 1994: **42**:1033-1041.
- Adayev T, Estephan R, Meserole S, Mazza B, Yurkow EJ, Banerjee P Externalization of phosphatidylserine may not be an early signal of apoptosis in neuronal cells, but only the phosphatidylserine-displaying apoptotic cells are phagocytosed by microglia. **J Neurochem** 1998: **71**:1854-1864.
- Aderem A Phagocytosis and the inflammatory response. **J Infect Dis** 2003: **187 Suppl 2**:S340-S345.
- Agrawal S, Hofmann WK, Tidow N, Ehrich M, van den BD, Koschmieder S *et al.* The C/EBPdelta tumor suppressor is silenced by hypermethylation in acute myeloid leukemia. **Blood** 2007a: **109**:3895-3905.
- Agrawal SM, Yong VW Immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Int Rev Neurobiol** 2007b: **79**:99-126.
- Ahmed Z, Baker D, Cuzner ML Interleukin-12 induces mild experimental allergic encephalomyelitis following local central nervous system injury in the Lewis rat. **J Neuroimmunol** 2003: **140**:109-117.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. **Nat Neurosci** 2007: **10**:1538-1543.
- Akira S IL-6-regulated transcription factors. **Int J Biochem Cell Biol** 1997: **29**:1401-1418.
- Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y *et al.* A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. **EMBO J** 1990: **9**:1897-1906.
- Akira S, Kishimoto T NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. **Adv Immunol** 1997: **65**:1-46.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM *et al.* Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 2000: **21**:383-421.

- Alam T, An MR, Mifflin RC, Hsieh CC, Ge X, Papaconstantinou J trans-activation of the alpha 1-acid glycoprotein gene acute phase responsive element by multiple isoforms of C/EBP and glucocorticoid receptor. **J Biol Chem** 1993; **268**:15681-15688.
- Alam T, An MR, Papaconstantinou J Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. **J Biol Chem** 1992b; **267**:5021-5024.
- Aloisi F Immune function of microglia. **Glia** 2001; **36**:165-179.
- Aloisi F, Ria F, Adorini L Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. **Immunol Today** 2000; **21**:141-147.
- Ambrosini E, Aloisi F Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. **Neurochem Res** 2004; **29**:1017-1038.
- Anderson CM, Swanson RA Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia** 2000; **32**:1-14.
- Auch CJ, Saha RN, Sheikh FG, Liu X, Jacobs BL, Pahan K Role of protein kinase R in double-stranded RNA-induced expression of nitric oxide synthase in human astroglia. **FEBS Lett** 2004; **563**:223-228.

B

- Baeuerle PA, Baltimore D NF-kappa B: ten years after. **Cell** 1996; **87**:13-20.
- Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Schettini G Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. **J Neurochem** 2002; **82**:1311-1329.
- Balabanov R, Beaumont T, Dore-Duffy P Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. **J Neurosci Res** 1999; **55**:578-587.
- Bannister, LH, Berry, MM, Collins, P, Dyson, M, Dussek, JE, Ferguson M.W.J. Anatomía de Gray. 38th edition. Harcourt Brace. 1998.
- Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Eur J Neurosci** 2006; **23**:83-93.
- Bechmann I, Priller J, Kovac A, Bontert M, Wehner T, Klett FF *et al.* Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. **Eur J Neurosci** 2001; **14**:1651-1658.

- Beg AA Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. **Trends Immunol** 2002; **23**:509-512.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E *et al.* CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. **Nat Neurosci** 2001; **4**:702-710.
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. **Trends Neurosci** 2007; **30**:596-602.
- Blalock EM, Chen KC, Stromberg AJ, Norris CM, Kadish I, Kraner SD *et al.* Harnessing the power of gene microarrays for the study of brain aging and Alzheimer's disease: statistical reliability and functional correlation. **Ageing Res Rev** 2005; **4**:481-512.
- Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. **J Neuroimmunol** 1990a; **27**:229-237.
- Block ML, Zecca L, Hong JS Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci** 2007; **8**:57-69.
- Boillee S, Vande VC, Cleveland DW ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. **Neuron** 2006; **52**:39-59.
- Bradley MN, Zhou L, Smale ST C/EBPbeta regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Mol Cell Biol** 2003; **23**:4841-4858.
- Brenneman DE, Schultzberg M, Bartfai T, Gozes I Cytokine regulation of neuronal survival. **J Neurochem** 1992; **58**:454-460.
- Brosnan CF, Raine CS Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. **Brain Pathol** 1996; **6**:243-257.
- Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu M *et al.* Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. **Mol Biol Cell** 2004; **15**:1089-1100.
- Brown GC, Bal-Price A Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. **Mol Neurobiol** 2003; **27**:325-355.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E *et al.* Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. **Science** 1998; **281**:1851-1854.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. **Annu Rev Neurosci** 2004; **27**:723-749.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol** 2002; **61**:1013-1021.

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. **J Neurosci** 2002; **22**:183-192.

Butt,AM Structure and function of oligodendrocytes. In: Kettenmann,H, Ramsom,B, eds. Neuroglia. Oxford: Oxford University Press; 2005. 36-47.

C

Caivano M, Gorgoni B, Cohen P, Poli V The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) and C/EBP delta transcription factors. **J Biol Chem** 2001a: **276**:48693-48701.

Callejas NA, Bosca L, Williams CS, DuBOIS RN, Martin-Sanz P Regulation of cyclooxygenase 2 expression in hepatocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins. **Gastroenterology** 2000; **119**:493-501.

Cao Z, Umek RM, McKnight SL Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. **Genes Dev** 1991; **5**:1538-1552.

Cardinaux JR, Allaman I, Magistretti PJ Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. **Glia** 2000b: **29**:91-97.

Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM *et al.* Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. **Nat Neurosci** 2006; **9**:917-924.

Carpentier PA, Duncan DS, Miller SD Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. **Brain Behav Immun** 2008a: **22**:140-147.

Carson MJ, Bilousova TV, Puntambekar SS, Melchior B, Doose JM, Ethell IM A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. **Neurotherapeutics** 2007; **4**:571-579.

Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. **Brain Res Brain Res Rev** 2005; **48**:16-42.

Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P The origin and cell lineage of microglia: new concepts. **Brain Res Rev** 2007; **53**:344-354.

Chang CJ, Shen BJ, Lee SC Autoregulated induction of the acute-phase response transcription factor gene, agp/ebp. **DNA Cell Biol** 1995; **14**:529-537.

Chao CC, Hu S, Peterson PK Glia: the not so innocent bystanders. **J Neurovirol** 1996; **2**:234-239.

- Charo IF, Ransohoff RM The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med** 2006; **354**:610-621.
- Chen CJ, Raung SL, Liao SL, Chen SY Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by baicalein in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. **Biochem Pharmacol** 2004; **67**:957-965.
- Chen HM, Liao WS Differential acute-phase response of rat kininogen genes involves type I and type II interleukin-6 response elements. **J Biol Chem** 1993b; **268**:25311-25319.
- Chen J, Zhao M, Rao R, Inoue H, Hao CM C/EBP β and its binding element are required for NF κ B-induced COX2 expression following hypertonic stress. **J Biol Chem** 2005; **280**:16354-16359.
- Chen Y, Swanson RA Astrocytes and brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab** 2003; **23**:137-149.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M *et al.* Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. **Science** 2003; **302**:113-117.
- Cleveland DW, Rothstein JD From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. **Nat Rev Neurosci** 2001; **2**:806-819.
- Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. **J Neurosci Res** 2002; **70**:462-473.
- Cortes-Canteli M, Pignatelli M, Santos A, Perez-Castillo A CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. **J Biol Chem** 2002; **277**:5460-5467.
- Cristiano L, Cimini A, Moreno S, Ragnelli AM, Paola CM Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and related transcription factors in differentiating astrocyte cultures. **Neuroscience** 2005; **131**:577-587.

D

- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Jr., Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. **J Biol Chem** 2002; **277**:32046-32053.
- Dasgupta S, Jana M, Liu X, Pahan K Role of very-late antigen-4 (VLA-4) in myelin basic protein-primed T cell contact-induced expression of proinflammatory cytokines in microglial cells. **J Biol Chem** 2003; **278**:22424-22431.

- Dasgupta S, Jana M, Liu X, Pahan K Myelin basic protein-primed T cells of female but not male mice induce nitric-oxide synthase and proinflammatory cytokines in microglia: implications for gender bias in multiple sclerosis. **J Biol Chem** 2005; **280**:32609-32617.
- Dauer W, Przedborski S Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron** 2003; **39**:889-909.
- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? **J Neurosci Res** 2000; **61**:471-479.
- Denecker G, Vercammen D, Steemans M, Vanden Berghe T, Brouckaert G, Van Loo G *et al.* Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. **Cell Death Differ** 2001; **8**:829-840.
- Descombes P, Schibler U A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. **Cell** 1991; **67**:569-579.
- Du Y, Dreyfus CF Oligodendrocytes as providers of growth factors. **J Neurosci Res** 2002; **68**:647-654.

E

- Eikelenboom P, Stam FC Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. **Acta Neuropathol** 1982; **57**:239-242.
- Ejarque-Ortiz A, Medina MG, Tusell JM, Perez-Gonzalez AP, Serratos J, Saura J Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. **Glia** 2007a; **55**:178-188.
- Ejarque-Ortiz A, Tusell JM, Serratos J, Saura J CCAAT/enhancer binding protein-alpha is down-regulated by toll-like receptor agonists in microglial cells. **J Neurosci Res** 2007b; **85**:985-993.
- Elberg G, Gimble JM, Tsai SY Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins. **J Biol Chem** 2000; **275**:27815-27822.
- Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. **J Neurosci** 1996; **16**:2508-2521.
- Erickson RL, Hemati N, Ross SE, MacDougald OA p300 coactivates the adipogenic transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha. **J Biol Chem** 2001; **276**:16348-16355.

Evert BO, Schelhaas J, Fleischer H, de Vos RA, Brunt ER, Stenzel W *et al.* Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. **Clin Neuropathol** 2006; **25**:272-281.

F

Farina C, Aloisi F, Meinl E Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends Immunol** 2007; **28**:138-145.

Fassbender K, Walter S, Kuhl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T *et al.* The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. **FASEB J** 2004; **18**:203-205.

Fearon DT Seeking wisdom in innate immunity. **Nature** 1997; **388**:323-324.

G

Gartel AL, Radhakrishnan SK Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. **Cancer Res** 2005; **65**:3980-3985.

Gartel AL, Tyner AL Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. **Exp Cell Res** 1999; **246**:280-289.

Giri S, Jatana M, Rattan R, Won JS, Singh I, Singh AK Galactosylsphingosine (psychosine)-induced expression of cytokine-mediated inducible nitric oxide synthases via AP-1 and C/EBP: implications for Krabbe disease. **FASEB J** 2002; **16**:661-672.

Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, Singh I 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. **J Neurosci** 2004; **24**:479-487.

Godambe SA, Chaplin DD, Takova T, Bellone CJ Upstream NFIL-6-like site located within a DNase I hypersensitivity region mediates LPS-induced transcription of the murine interleukin-1 beta gene. **J Immunol** 1994; **153**:143-152.

Gordon MN Microglia and immune activation in Alzheimer's disease. **J Fla Med Assoc** 1993; **80**:267-270.

Gosselin D, Rivest S Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system. **Brain Behav Immun** 2007; **21**:281-289.

Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. **Cell** 1993; **72**:551-560.

Granger RL, Hughes TR, Ramji DP Stimulus- and cell-type-specific regulation of CCAAT-enhancer binding protein isoforms in glomerular mesangial cells by lipopolysaccharide and cytokines. **Biochim Biophys Acta** 2000; **1501**:171-179.

Guillemin GJ, Brew BJ Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. **J Leukoc Biol** 2004; **75**:388-397.

H

Hailer NP Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: It is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. **Prog Neurobiol** 2007.

Hanisch UK Microglia as a source and target of cytokines. **Glia** 2002; **40**:140-155.

Hanisch UK, Kettenmann H Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci** 2007; **10**:1387-1394.

Hannon GJ RNA interference. **Nature** 2002; **418**:244-251.

Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. **Brain Res Brain Res Rev** 2005; **48**:220-233.

Haydon PG GLIA: listening and talking to the synapse. **Nat Rev Neurosci** 2001; **2**:185-193.

He Y, Crouch E Surfactant protein D gene regulation. Interactions among the conserved CCAAT/enhancer-binding protein elements. **J Biol Chem** 2002; **277**:19530-19537.

Heneka MT, O'Banion MK Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **J Neuroimmunol** 2007; **184**:69-91.

Hickey WF, Kimura H Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. **Science** 1988; **239**:290-292.

Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord** 2005; **11 Suppl 1**:S9-S15.

Hou DX, Masuzaki S, Hashimoto F, Uto T, Tanigawa S, Fujii M *et al.* Green tea proanthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-activated mouse macrophages: molecular mechanisms and structure-activity relationship. **Arch Biochem Biophys** 2007; **460**:67-74.

Hu HM, Baer M, Williams SC, Johnson PF, Schwartz RC Redundancy of C/EBP alpha, -beta, and -delta in supporting the lipopolysaccharide-induced transcription of

IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. **J Immunol** 1998; **160**:2334-2342.

Huang JH, Liao WS Induction of the mouse serum amyloid A3 gene by cytokines requires both C/EBP family proteins and a novel constitutive nuclear factor. **Mol Cell Biol** 1994; **14**:4475-4484.

Huang YC, Chang WC, Su JG, Cai JL, Chen CC, Hung JJ *et al.* Peptidoglycan enhances transcriptional expression of CCAAT/enhancer-binding protein delta gene in mouse macrophages. **J Biomed Sci** 2007; **14**:407-418.

I

Ihrig RA, Alvarez-Buylla A Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. **Cell Tissue Res** 2007.

Itoh T, Satou T, Nishida S, Hashimoto S, Ito H Cultured rat astrocytes give rise to neural stem cells. **Neurochem Res** 2006; **31**:1381-1387.

J

Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E *et al.* TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. **J Immunol** 2005; **175**:4320-4330.

Jana M, Anderson JA, Saha RN, Liu X, Pahan K Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. **Free Radic Biol Med** 2005; **38**:655-664.

Jana M, Dasgupta S, Liu X, Pahan K Regulation of tumor necrosis factor-alpha expression by CD40 ligation in BV-2 microglial cells. **J Neurochem** 2002; **80**:197-206.

Jana M, Dasgupta S, Saha RN, Liu X, Pahan K Induction of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by interleukin-12 p40 monomer and homodimer in microglia and macrophages. **J Neurochem** 2003; **86**:519-528.

Jana M, Liu X, Koka S, Ghosh S, Petro TM, Pahan K Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells. **J Biol Chem** 2001; **276**:44527-44533.

John GR, Lee SC, Brosnan CF Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. **Neuroscientist** 2003; **9**:10-22.

Juan TS, Wilson DR, Wilde MD, Darlington GJ Participation of the transcription factor C/EBP delta in the acute-phase regulation of the human gene for complement component C3. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; **90**:2584-2588.

Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. **Mol Ther** 2006; **13**:494-505.

K

Kalai M, Van Loo G, Vanden Berghe T, Meeus A, Burm W, Saelens X *et al.* Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. **Cell Death Differ** 2002; **9**:981-994.

Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, Kalluri H, Johnson PF, Vemuganti R Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. **J Neurochem** 2006; **98**:1718-1731.

Kawai T, Akira S TLR signaling. **Semin Immunol** 2007; **19**:24-32.

Kelicen P, Tindberg N Lipopolysaccharide induces CYP2E1 in astrocytes through MAP kinase kinase-3 and C/EBPbeta and -delta. **J Biol Chem** 2004; **279**:15734-15742.

Kim MO, Suh HS, Brosnan CF, Lee SC Regulation of RANTES/CCL5 expression in human astrocytes by interleukin-1 and interferon-beta. **J Neurochem** 2004; **90**:297-308.

Kinoshita S, Akira S, Kishimoto T A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; **89**:1473-1476.

Kitami Y, Fukuoka T, Hiwada K, Inagami T A high level of CCAAT-enhancer binding protein-delta expression is a major determinant for markedly elevated differential gene expression of the platelet-derived growth factor-alpha receptor in vascular smooth muscle cells of genetically hypertensive rats. **Circ Res** 1999; **84**:64-73.

Kitanaka C, Kuchino Y Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. **Cell Death Differ** 1999; **6**:508-515.

Koike T, Yamagishi H, Hatanaka Y, Fukushima A, Chang JW, Xia Y *et al.* A novel ERK-dependent signaling process that regulates interleukin-2 expression in a late phase of T cell activation. **J Biol Chem** 2003; **278**:15685-15692.

Kovacs KA, Steinmann M, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux JR CCAAT/enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation. **J Biol Chem** 2003; **278**:36959-36965.

Kreutzberg GW Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci** 1996; **19**:312-318.

L

- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I *et al*. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. **Brain Res Brain Res Rev** 2005; **48**:196-206.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience** 1990; **39**:151-170.
- Ledeboer A, Hutchinson MR, Watkins LR, Johnson KW Ibudilast (AV-411). A new class therapeutic candidate for neuropathic pain and opioid withdrawal syndromes. **Expert Opin Investig Drugs** 2007a; **16**:935-950.
- Ledeboer A, Jekich BM, Sloane EM, Mahoney JH, Langer SJ, Milligan ED *et al*. Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. **Brain Behav Immun** 2007b; **21**:686-698.
- Lee SJ, Hou J, Benveniste EN Transcriptional regulation of intercellular adhesion molecule-1 in astrocytes involves NF-kappaB and C/EBP isoforms. **J Neuroimmunol** 1998d; **92**:196-207.
- Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. **J Biol Chem** 1998; **273**:28545-28548.
- Levine JM, Card JP Light and electron microscopic localization of a cell surface antigen (NG2) in the rat cerebellum: association with smooth protoplasmic astrocytes. **J Neurosci** 1987; **7**:2711-2720.
- Li H, Gade P, Xiao W, Kalvakolanu DV The interferon signaling network and transcription factor C/EBP-beta. **Cell Mol Immunol** 2007; **4**:407-418.
- Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F *et al*. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. **J Immunol** 2001; **166**:7128-7135.
- Li MO, Sarkisian MR, Mehal WZ, Rakic P, Flavell RA Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. **Science** 2003; **302**:1560-1563.
- Li R, Strohmeyer R, Liang Z, Lue LF, Rogers J CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta) expression and elevation in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 2004f; **25**:991-999.
- Ling EA Transformation of monocytes into amoeboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles. **J Anat** 1979; **128**:847-858.
- Ling EA, Wong WC The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. **Glia** 1993; **7**:9-18.

- Liou HC, Baltimore D Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. **Curr Opin Cell Biol** 1993; **5**:477-487.
- Liu YW, Chen CC, Wang JM, Chang WC, Huang YC, Chung SY *et al.* Role of transcriptional factors Sp1, c-Rel, and c-Jun in LPS-induced C/EBPdelta gene expression of mouse macrophages. **Cell Mol Life Sci** 2007; **64**:3282-3294.
- Lobsiger CS, Cleveland DW Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. **Nat Neurosci** 2007; **10**:1355-1360.
- Lund S, Christensen KV, Hedtjarn M, Mortensen AL, Hagberg H, Falsig J *et al.* The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. **J Neuroimmunol** 2006; **180**:71-87.
- Lyons A, Downer EJ, Crotty S, Nolan YM, Mills KH, Lynch MA CD200 ligand receptor interaction modulates microglial activation in vivo and in vitro: a role for IL-4. **J Neurosci** 2007; **27**:8309-8313.

M

- Magistretti PJ Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. **J Exp Biol** 2006; **209**:2304-2311.
- Marques JT, Williams BR Activation of the mammalian immune system by siRNAs. **Nat Biotechnol** 2005; **23**:1399-1405.
- Marshall J, Dolan BM, Garcia EP, Sathe S, Tang X, Mao Z *et al.* Calcium channel and NMDA receptor activities differentially regulate nuclear C/EBPbeta levels to control neuronal survival. **Neuron** 2003; **39**:625-639.
- Martin S, Levine AK, Chen ZJ, Ughrin Y, Levine JM Deposition of the NG2 proteoglycan at nodes of Ranvier in the peripheral nervous system. **J Neurosci** 2001; **21**:8119-8128.
- Matyszak MK, Perry VH The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. **Neuroscience** 1996; **74**:599-608.
- McGeer EG, McGeer PL Innate immunity in Alzheimer's disease: a model for local inflammatory reactions. **Mol Interv** 2001; **1**:22-29.
- McMahon EJ, Bailey SL, Miller SD CNS dendritic cells: critical participants in CNS inflammation? **Neurochem Int** 2006; **49**:195-203.
- McManus MT, Sharp PA Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. **Nat Rev Genet** 2002; **3**:737-747.

- Menard C, Hein P, Paquin A, Savelson A, Yang XM, Lederfein D *et al.* An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. **Neuron** 2002: **36**:597-610.
- Miller RH Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. **Prog Neurobiol** 2002: **67**:451-467.
- Milner R, Campbell IL Cytokines regulate microglial adhesion to laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the alpha6beta1 integrin. **J Neurosci** 2002: **22**:1562-1572.
- Minghetti L, Levi G Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. **Prog Neurobiol** 1998: **54**:99-125.
- Minghetti L, Pocchiari M Cyclooxygenase-2, prostaglandin E2, and microglial activation in prion diseases. **Int Rev Neurobiol** 2007: **82**:265-275.
- Mink S, Haenig B, Klempnauer KH Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. **Mol Cell Biol** 1997: **17**:6609-6617.
- Mitrovic B, Parkinson J, Merrill JE An in Vitro Model of Oligodendrocyte Destruction by Nitric Oxide and Its Relevance to Multiple Sclerosis. **Methods** 1996: **10**:501-513.
- Moalem G, Tracey DJ Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Res Rev** 2006: **51**:240-264.
- Mott RT, Ait-Ghezala G, Town T, Mori T, Vendrame M, Zeng J *et al.* Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. **Glia** 2004: **46**:369-379.
- Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R *et al.* Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. **J Neurosci** 2007: **27**:3328-3337.

N

- Nagatsu T, Sawada M Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines. **Cell Mol Neurobiol** 2006: **26**:781-802.
- Nagulapalli S, Pongubala JM, Atchison ML Multiple proteins physically interact with PU.1. Transcriptional synergy with NF-IL6 beta (C/EBP delta, CRP3). **J Immunol** 1995: **155**:4330-4338.
- Nataf S, Stahel PF, Davoust N, Barnum SR Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? **Trends Neurosci** 1999: **22**:397-402.

- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trends Neurosci** 2003; **26**:523-530.
- Nerlov C, Ziff EB Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter. **Genes Dev** 1994; **8**:350-362.
- Newman EA Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. **J Neurosci** 2003a; **23**:1659-1666.
- Newman EA New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. **Trends Neurosci** 2003b; **26**:536-542.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science** 2005; **308**:1314-1318.

O

- O'Neill LA, Kaltschmidt C NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends Neurosci** 1997; **20**:252-258.
- O'Rourke JP, Newbound GC, Hutt JA, DeWille J CCAAT/enhancer-binding protein delta regulates mammary epithelial cell G0 growth arrest and apoptosis. **J Biol Chem** 1999; **274**:16582-16589.
- Oelgeschlager M, Nuchprayoon I, Luscher B, Friedman AD C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. **Mol Cell Biol** 1996; **16**:4717-4725.
- Ogata K, Kosaka T Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. **Neuroscience** 2002; **113**:221-233.
- Olson JK, Miller SD Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. **J Immunol** 2004; **173**:3916-3924.
- Osada S, Yamamoto H, Nishihara T, Imagawa M DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. **J Biol Chem** 1996; **271**:3891-3896.

P

- Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S *et al.* Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. **Nat Genet** 2001; **27**:263-270.

- Paglinawan R, Malipiero U, Schlapbach R, Frei K, Reith W, Fontana A TGFbeta directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. **Glia** 2003c: **44**:219-231.
- Papadimitraki ED, Bertias GK, Boumpas DT Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal. **J Autoimmun** 2007: **29**:310-318.
- Papin S, Cazeneuve C, Duquesnoy P, Jeru I, Sahali D, Amselem S The tumor necrosis factor alpha-dependent activation of the human mediterranean fever (MEFV) promoter is mediated by a synergistic interaction between C/EBP beta and NF kappaB p65. **J Biol Chem** 2003: **278**:48839-48847.
- Paquin A, Barnabe-Heider F, Kageyama R, Miller FD CCAAT/enhancer-binding protein phosphorylation biases cortical precursors to generate neurons rather than astrocytes in vivo. **J Neurosci** 2005: **25**:10747-10758.
- Pasinelli P, Brown RH Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. **Nat Rev Neurosci** 2006: **7**:710-723.
- Pedersen TA, Kowenz-Leutz E, Leutz A, Nerlov C Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. **Genes Dev** 2001: **15**:3208-3216.
- Pennini ME, Liu Y, Yang J, Croniger CM, Boom WH, Harding CV CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta binding to CIITA promoters is associated with the inhibition of CIITA expression in response to Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein. **J Immunol** 2007: **179**:6910-6918.
- Perez-Capote K, Saura J, Serratos J, Sola C Expression of C/EBPalpha and C/EBPbeta in glial cells in vitro after inducing glial activation by different stimuli. **Neurosci Lett** 2006: **410**:25-30.
- Pfriegeer FW Role of glia in synapse development. **Curr Opin Neurobiol** 2002: **12**:486-490.
- Pizzi M, Spano P Distinct roles of diverse nuclear factor-kappaB complexes in neuropathological mechanisms. **Eur J Pharmacol** 2006: **545**:22-28.
- Pocock JM, Kettenmann H Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends Neurosci** 2007: **30**:527-535.
- Poli V The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. **J Biol Chem** 1998: **273**:29279-29282.
- Pope R, Mungre S, Liu H, Thimmapaya B Regulation of TNF-alpha expression in normal macrophages: the role of C/EBPbeta. **Cytokine** 2000: **12**:1171-1181.

Q

Qing Y, Stark GR Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. **J Biol Chem** 2004; **279**:41679-41685.

R

Rahman SM, Schroeder-Gloeckler JM, Janssen RC, Jiang H, Qadri I, Maclean KN *et al.* CCAAT/enhancing binding protein beta deletion in mice attenuates inflammation, endoplasmic reticulum stress, and lipid accumulation in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology** 2007; **45**:1108-1117.

Raivich G, Banati R Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. **Brain Res Brain Res Rev** 2004a; **46**:261-281.

Ramirez-Exposito MJ, Martinez-Martos JM [Structure and functions of the macroglia in the central nervous system. Response to degenerative disorders]. **Rev Neurol** 1998; **26**:600-611.

Ramji DP, Foka P CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. **Biochem J** 2002; **365**:561-575.

Ramji DP, Vitelli A, Tronche F, Cortese R, Ciliberto G The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP delta/NF-IL6 beta, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. **Nucleic Acids Res** 1993; **21**:289-294.

Rangatia J, Vangala RK, Treiber N, Zhang P, Radomska H, Tenen DG *et al.* Downregulation of c-Jun expression by transcription factor C/EBPalpha is critical for granulocytic lineage commitment. **Mol Cell Biol** 2002; **22**:8681-8694.

Ray A, Hannink M, Ray BK Concerted participation of NF-kappa B and C/EBP heteromer in lipopolysaccharide induction of serum amyloid A gene expression in liver. **J Biol Chem** 1995; **270**:7365-7374.

Ray A, Ray BK Serum amyloid A gene expression under acute-phase conditions involves participation of inducible C/EBP-beta and C/EBP-delta and their activation by phosphorylation. **Mol Cell Biol** 1994a; **14**:4324-4332.

Ray BK, Ray A Expression of the gene encoding alpha 1-acid glycoprotein in rabbit liver under acute-phase conditions involves induction and activation of beta and delta CCAAT-enhancer-binding proteins. **Eur J Biochem** 1994b; **222**:891-900.

Reddy KV, Serio KJ, Hodulik CR, Bigby TD 5-lipoxygenase-activating protein gene expression. Key role of CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) in

- constitutive and tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced expression in THP-1 cells. **J Biol Chem** 2003; **278**:13810-13818.
- Reichenbach,A, Wolburg,H Astrocytes and ependymal glia. In: Kettenmann,H, Ramsom,B, eds. Neuroglia. Oxford: Oxford University Press; 2005. 19-36.
- Rickmann M, Wolff JR S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. **Neuroscience** 1995; **67**:977-991.
- Rogers AT, Harrison R, Lunt GG, Case CP, Barraclough C Neurotrophic activities of normal and motor neurone disease patient skeletal muscle extract on cultured rat spinal neurones. **Neurosci Lett** 1990; **117**:194-199.
- Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD *et al.* Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; **89**:10016-10020.
- Rostene W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM Chemokines: a new class of neuromodulator? **Nat Rev Neurosci** 2007; **8**:895-903.
- Rothwell NJ, Relton JK Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. **Neurosci Biobehav Rev** 1993; **17**:217-227.
- Rowland LP, Sherman WH, Latov N, Lange DJ, McDonald TD, Younger DS *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and lymphoma: bone marrow examination and other diagnostic tests. **Neurology** 1992; **42**:1101-1102.
- Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL *et al.* Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. **J Biol Chem** 2004; **279**:2559-2567.
- Ruocco MR, Chen X, Ambrosino C, Dragonetti E, Liu W, Mallardo M *et al.* Regulation of HIV-1 long terminal repeats by interaction of C/EBP(NF-IL6) and NF-kappaB/Rel transcription factors. **J Biol Chem** 1996; **271**:22479-22486.

S

- Saha RN, Pahan K Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. **Antioxid Redox Signal** 2006; **8**:929-947.
- Saito H, Shultz LD, Sinha M, Papaconstantinou J Induction of the alpha(1)-antichymotrypsin gene in the brain associated with TGF-beta1 deficiency or systemic administration of endotoxin. **Biochem Biophys Res Commun** 1999; **263**:270-275.
- Saura J, Tusell JM, Serratos J High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. **Glia** 2003b; **44**:183-189.

- Savill J, Fadok V Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature** 2000: **407**:784-788.
- Schrem H, Klempnauer J, Borlak J Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. **Pharmacol Rev** 2004: **56**:291-330.
- Schroder K, Sweet MJ, Hume DA Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. **Immunobiology** 2006: **211**:511-524.
- Schwartz M, Butovsky O, Bruck W, Hanisch UK Microglial phenotype: is the commitment reversible? **Trends Neurosci** 2006: **29**:68-74.
- Screpanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D *et al.* Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. **EMBO J** 1995: **14**:1932-1941.
- Stein B, Cogswell PC, Baldwin AS, Jr. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. **Mol Cell Biol** 1993: **13**:3964-3974.
- Sterneck E, Johnson PF CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. **J Neurochem** 1998a: **70**:2424-2433.
- Streit WJ Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. **Glia** 2002: **40**:133-139.
- Streit,WJ Microglial cells. In: Kettenmann,H, Ramsom,B, eds. Neuroglia. Oxford: Oxford University Press; 2005. 60-84.
- Streit WJ, Conde JR, Fendrick SE, Flanary BE, Mariani CL Role of microglia in the central nervous system's immune response. **Neurol Res** 2005: **27**:685-691.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA Reactive microgliosis. **Prog Neurobiol** 1999: **57**:563-581.
- Svotelis A, Doyon G, Bernatchez G, Desilets A, Rivard N, Asselin C IL-1 beta-dependent regulation of C/EBP delta transcriptional activity. **Biochem Biophys Res Commun** 2005: **328**:461-470.

T

- Takahashi K, Rochford CD, Neumann H Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. **J Exp Med** 2005: **201**:647-657.

- Talbot PJ, Arnold D, Antel JP Virus-induced autoimmune reactions in the CNS. **Curr Top Microbiol Immunol** 2001: **253**:247-271.
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. **Nat Neurosci** 2001a: **4**:813-818.
- Taubenfeld SM, Wiig KA, Monti B, Dolan B, Pollonini G, Alberini CM Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. **J Neurosci** 2001b: **21**:84-91.
- Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Ranki H, Cryer A, Ramji DP Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines. **Cytokine** 2000: **12**:1430-1436.
- Thomas WE Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. **Brain Res Brain Res Rev** 1999: **31**:42-57.
- Town T, Nikolic V, Tan J The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. **J Neuroinflammation** 2005: **2**:24.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ Metabolic coupling between glia and neurons. **J Neurosci** 1996: **16**:877-885.
- Tsan MF, Gao B Endogenous ligands of Toll-like receptors. **J Leukoc Biol** 2004: **76**:514-519.
- Tusell JM, Saura J, Serratosa J Absence of the cell cycle inhibitor p21Cip1 reduces LPS-induced NO release and activation of the transcription factor NF-kappaB in mixed glial cultures. **Glia** 2005: **49**:52-58.

U

- Udan ML, Ajit D, Crouse NR, Nichols MR Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. **J Neurochem** 2008: **104**:524-533.
- Underhill DM, Ozinsky A Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol** 2002: **20**:825-852.
- Uto T, Fujii M, Hou DX Effects of 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate on cyclooxygenase-2 expression induced by lipopolysaccharide, interferon-gamma and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Oncol Rep** 2007: **17**:233-238.

V

- van de WM, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D *et al.* Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. **EMBO Rep** 2003; **4**:609-615.
- van Rossum D, Hanisch UK Microglia. **Metab Brain Dis** 2004; **19**:393-411.
- Verkhatsky A, Toescu EC Neuronal-glia networks as substrate for CNS integration. **J Cell Mol Med** 2006; **10**:826-836.
- Volterra A, Meldolesi J Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat Rev Neurosci** 2005; **6**:626-640.
- von Gertten C, Flores MA, Holmin S, Mathiesen T, Nordqvist AC Genomic responses in rat cerebral cortex after traumatic brain injury. **BMC Neurosci** 2005; **6**:69.

W

- Wadleigh DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S, Herschman HR Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. **J Biol Chem** 2000; **275**:6259-6266.
- Wahner AD, Bronstein JM, Bordelon YM, Ritz B Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may protect against Parkinson disease. **Neurology** 2007; **69**:1836-1842.
- Walton M, Saura J, Young D, MacGibbon G, Hansen W, Lawlor P *et al.* CCAAT-enhancer binding protein alpha is expressed in activated microglial cells after brain injury. **Brain Res Mol Brain Res** 1998; **61**:11-22.
- Walton MR, Gibbons H, MacGibbon GA, Sirimanne E, Saura J, Gluckman PD *et al.* PU.1 expression in microglia. **J Neuroimmunol** 2000; **104**:109-115.
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP *et al.* Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. **Glia** 2006; **54**:815-825.
- Walz W Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. **Glia** 2000; **31**:95-103.
- Wang C, Chen X, Wang Y, Gong J, Hu G C/EBPalphap30 plays transcriptional regulatory roles distinct from C/EBPalphap42. **Cell Res** 2007; **17**:374-383.
- Wigley R, Hamilton N, Nishiyama A, Kirchhoff F, Butt AM Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons. **J Anat** 2007; **210**:661-670.
- Williams K, Alvarez X, Lackner AA Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. **Glia** 2001; **36**:156-164.
- Witting A, Muller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of

- lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. **J Neurochem** 2000; **75**:1060-1070.
- Wolfson C, Talbot P Bacterial infection as a cause of multiple sclerosis. **Lancet** 2002; **360**:352-353.
- Won JS, Im YB, Key L, Singh I, Singh AK The involvement of glucose metabolism in the regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in glial cells: possible role of glucose-6-phosphate dehydrogenase and CCAAT/enhancing binding protein. **J Neurosci** 2003; **23**:7470-7478.
- Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, Park JW, Kwon TK Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. **FEBS Lett** 2005; **579**:705-711.
- Woo KJ, Lim JH, Suh SI, Kwon YK, Shin SW, Kim SC *et al.* Differential inhibitory effects of baicalein and baicalin on LPS-induced cyclooxygenase-2 expression through inhibition of C/EBPbeta DNA-binding activity. **Immunobiology** 2006; **211**:359-368.
- Wu DC, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Vila M, Jackson-Lewis V *et al.* Glial cell response: A pathogenic factor in Parkinson's disease. **J Neurovirol** 2002; **8**:551-558.
- Wu KK Analysis of protein-DNA binding by streptavidin-agarose pulldown. **Methods Mol Biol** 2006 **338**:281-290.
- Wu KK, Liou JY, Cieslik K Transcriptional Control of COX-2 via C/EBPbeta. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2005; **25**:679-685.
- Wu Y, Tibrewal N, Birge RB Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. **Trends Cell Biol** 2006; **16**:189-197.
- Wyss-Coray T Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? **Nat Med** 2006; **12**:1005-1015.

X

- Xanthopoulos KG, Prezioso VR, Chen WS, Sladek FM, Cortese R, Darnell JE, Jr. The different tissue transcription patterns of genes for HNF-1, C/EBP, HNF-3, and HNF-4, protein factors that govern liver-specific transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; **88**:3807-3811.
- Xiao BG, Link H Immune regulation within the central nervous system. **J Neurol Sci** 1998; **157**:1-12.

Y

- Yan SD, Stern D, Schmidt AM What's the RAGE? The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the dark side of glucose. **Eur J Clin Invest** 1997; **27**:179-181.
- Yankner BA Amyloid and Alzheimer's disease--cause or effect? **Neurobiol Aging** 1989; **10**:470-471.
- Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. **Science** 1989; **245**:417-420.
- Yano S, Fukunaga K, Takiguchi M, Ushio Y, Mori M, Miyamoto E Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein family members by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes. **J Biol Chem** 1996; **271**:23520-23527.
- Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM The promise of minocycline in neurology. **Lancet Neurol** 2004; **3**:744-751.
- Yukawa K, Tanaka T, Tsuji S, Akira S Expressions of CCAAT/Enhancer-binding proteins beta and delta and their activities are intensified by cAMP signaling as well as Ca²⁺/calmodulin kinases activation in hippocampal neurons. **J Biol Chem** 1998; **273**:31345-31351.

Z

- Zak DE, Hao H, Vadigepalli R, Miller GM, Ogunnaike BA, Schwaber JS Systems analysis of circadian time-dependent neuronal epidermal growth factor receptor signaling. **Genome Biol** 2006; **7**:R48.
- Zhang ET, Richards HK, Kida S, Weller RO Directional and compartmentalised drainage of interstitial fluid and cerebrospinal fluid from the rat brain. **Acta Neuropathol** 1992; **83**:233-239.
- Zhou J, Gurates B, Yang S, Sebastian S, Bulun SE Malignant breast epithelial cells stimulate aromatase expression via promoter II in human adipose fibroblasts: an epithelial-stromal interaction in breast tumors mediated by CCAAT/enhancer binding protein beta. **Cancer Res** 2001; **61**:2328-2334.
- Zhu S, Yoon K, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; **99**:207-212.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N *et al.* Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. **Nat Neurosci** 2006; **9**:268-275.

Zou X, Ray D, Aziyu A, Christov K, Boiko AD, Gudkov AV *et al.* Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. **Genes Dev** 2002; **16**:2923-2934.