



# El procés inflamatori desencadenat per l'activació del receptor de immunitat innata TLR-4, i mecanismes naturals d'autorregulació en astròcits

Míriam Aurora Font Nieves de la Vega

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Programa de Doctorat en Biomedicina.

Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració

Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

EL PROCÉS INFLAMATORI DESENCADENAT PER  
L'ACTIVACIÓ DEL RECEPTOR DE IMMUNITAT INNATA  
TLR-4, I MECANISMES NATURALS D'AUTORREGULACIÓ  
EN ASTRÒCITS

Treball presentat per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona.

Tesi Doctoral presentada per:

Míriam Aurora Font Nieves de la Vega

Barcelona, Juliol 2011



Vist i plau dels directors:

Dra. Anna Maria Planas Obradors

Investigadora científica del Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB)-CSIC-IDIBAPS.

Dra. Valérie Petegnief

Investigadora científica del Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB)-CSIC-IDIBAPS.

Signat: Míriam Aurora Font Nieves de la Vega

Barcelona, Juny 2011



Aquest treball ha estat realitzat en el Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions de Barcelona (IIBB-CSIC), dins del projecte SAF2005-05793-C02-01 titulat "Inflamación y respuesta inmune innata como dianas terapéuticas en la isquemia cerebral", amb el suport econòmic d'una beca de Formació de Personal Investigador (FPI), BES-2006-12809, del Ministeri de Ciència i Tecnologia.



*A la meva família*

*Al Santi*





## *Agraïments*

Tot va començar amb unes pràctiques de laboratori mentre estava finalitzant la llicenciatura en Bioquímica. Des d'aleshores he après moltíssim, em sento còmode en un laboratori i gaudeixo de la feina que faig. Part important de que estigui tant satisfeta amb el resultat del treball realitzat es deu a l'ajuda, consells, recolzament, ànims i amistat que m'han aportat diverses persones durant aquests anys.

En primer lloc m'agradaria agrair a les meves directores de tesi. A la Dra. Anna M. Planes, per acollir-me en el seu laboratori i donar-me la oportunitat dur a terme la tesi doctoral. Per introduir-me en el món de la investigació, admiro la seva dedicació i qualitat científica, la seva capacitat per a tenir tantíssimes idees i portar tants temes diferents alhora. Gràcies també per ser tant propera i estar allà sempre que ho he necessitat. A la Dra. Valérie Petegnief, per ensenyar-me a treballar i organitzar-me en el laboratori, per la seva paciència i pel seu afecte durant tot aquest temps.

Gràcies també als membres de la comissió de seguiment, l'Antonio, el Pep i la Laia, que durant la última etapa d'aquesta tesi han aportat idees noves i m'han ofert bons consells.

També vull agrair als membres del grup la seva important aportació en aquesta tesi. Al Tomàs, per aturar qualsevol cosa que estigués fent en aquell moment i dedicar-me tota la seva atenció quan ho he necessitat. Al Carles, pel seu humor anglès, que tant m'agrada, i pel recolzament i bons consells que m'ha anat donant durant tot aquest temps. A l'Ester Pozas, per la seva amistat, pel seu esperit crític, pels seus consells, i per escoltar les meves presentacions els cops que ha fet falta. A l'Ester Verdaguer, per la seva espontaneïtat i per tenir sempre un somriure per tothom. Al Fernando, per ser un bon company de laboratori, per la guia turística per València i per la seva hospitalitat. Als investigadors *sènior* del grup, la M<sup>a</sup> Lluïsa, l'Emili i la Núria de Vera, que són la veu de l'experiència del laboratori.

Gràcies als companys del laboratori que em van acollir quan vaig arribar i als que s'han anat sumant al llarg d'aquests anys. Al Santi i a l'Abraham, pel seu bon humor i per ensenyar-me a no preocupar-me en excés per tonteries, i al Rubén, per tots els "truquillos" de molecular. Totes les bromes, converses, maquinacions i cervesetes que he compartit amb ells feien que quedar-se fins tard al laboratori es convertís en una necessitat. A la Xeli, per ser tant dolça. Al Fèlix, per cuidar-me tant i per ser tant bona

persona, t'aprecio moltíssim. A la Roser, que em va veure començar i de qui he pres exemple moltes vegades. A l' Anna Serra, perquè vam començar alhora, per totes les alegries que em compartit i totes les penes que hem anat superant juntes. A la Isabel, per la seva amistat, per tots els anys de facultat, els viatges a l'estranger i per estar al meu costat durant tot aquest temps. Al Xevi, per haver-me fet riure tant, per introduir-me en el club Macintosh i molt especialment per llegir-me les instruccions de la màquina de fer arròs que es va comprar, mai no ho oblidaré. A la Lupe, per lo molt que m'ha ensenyat i pel seu bon caràcter. A la Glòria, per tota la feina i coneixements que ha aportat, moltes gràcies. A l'Angèlica, per la seva alegria i els detalls que ha tingut sempre amb la gent del laboratori. Al Ester Bonfill, pel seu bon humor, la seva proximitat i per totes les caixetes que m'ha regalat i que m'ha d'ensenyar a fer. Al Leo, per ser tant treballador, pel seu domini en l'art de l'ELISA i el *western-blot*, per totes les bromes que m'han fet riure tant. A la Paqui, per la seva proximitat i el seu bon humor. Per la seva paciència i per tenir tanta cura dels ratolinets. Als dos, per saber escoltar i donar bons consells. A l'Albert, per tots els *buffers* i solucions, i per ajudar-me sempre que ho he necessitat. Al Cèdric, per fer que en el laboratori regnés la pau i el bon ambient en molts moments. I a la Noèlia, per la seva experiència i els seus consells en el laboratori. I a la resta de companys que han estat fent pràctiques o estades curtes en el laboratori però que també han deixat un bon record.

A l'Amanda i la Montse Roig, per ser tant properes, per lo molt que s'han esforçat en ajudar-me sempre amb qualsevol dubte, o problema burocràtic que hagi tingut i per ser tant eficients en la seva feina.

Gràcies a la Unitat d'Isquèmia de l'Hospital Clínic, als Drs. Chamorro, Obach, Amaro, Cervera i Urra, que ens ofereixen nous punts de vista i un enfocament diferent sobre les preguntes a plantejar.

A la resta de membres de l'ala de Casanovas. Al Joan, la Carme, en Jou, la Coral, la Rosa i en Pablo, caps de grup i investigadors "sèniors" que m'han ajudat sempre que ho he necessitat, m'han aportat nous punts de vista en els meus experiments i m'han donat molt bons consells. A l'Aroa, per la seva simpatia. Al Marco, Romà encantador i futur gran científic. Al Guido, que des de el primer dia es va fer estimar. Al Yoelvis, per lo moltíssim que m'he rigut amb ell i per la seva forma de ser. Al Jero, per ser tant autèntic i per tots els e-mails descrivint l'experiència americana. A la Laura, per ser tant positiva

i animar-me tantes vegades. A la Begoña, per tenir tant bon caràcter amb tothom. A l'Anhara, per ser tant divertida i bona persona.

A les meves "compis" de cultius, que han fet que tantes hores passessin en uns pocs minuts. A la Núria, una de les millors persones que conec i una amiga. A la Susana, per la seva bondat, el seu afecte i la seva energia inesgotable. A la Sabrina, per ser tant dolça i tant bona persona, i per la millor paella que he tastat mai. A la Joana, sempre tant alegre i tant simpàtica. I a la Mireia, per les xerrades i bons moments.

A la resta de membres del centre, tant els sèniors, Lupe, Paco, l'Albert, Sebastià, Pep, Anna, Dani, Montse, etc. per ser tant propers amb mi.

Als meus companys de comissions, Víctor, Cristina i Emily, i als companys de l'IIBB, Jordi, Mercè, Raquel, Gemma, Sara, Nacho, etc. per animar-me, i estar allà tot aquest temps.

Al personal administratiu, Manel, Maria, etc. I al informàtic, Júlio i Edu, per la seva ajuda i bon humor.

Gràcies també a la Dra. Rosa Gasa i la Dra. Caty Casas, per la seva ajuda i el seu suport durant aquesta tesi. M'han ensenyat molt i sense elles hauria perdut part important de la meva formació.

Al Benjamín, per la seva amistat. Als companys de facultat, Marta, Ramón, Meritxell, Cristina, Edu, Borja, i especialment al Xavi, que em va portar a l'IIBB, i a l'Aleix, que tant s'esforça per no perdre el contacte, perquè són tant bons amics i pel suport que sempre m'han donat.

I want to thank the Laboratory voon Neurobiologie en Gentherapie, Katholieke Universiteit Leuven, especially Jaan, Chris, Mideia and Verlee, for their help during my collaborative research exchange and for making my stay in Leuven a pleasant one.

I also need to thank Regina for all the English classes, which have been very important in my work.

Al Santi, que no és conscient de lo important que és per mi. Per haver estat al meu costat tot aquest temps. Pel seu suport, la seva ajuda, els ànims, la seva paciència infinita, sobretot en aquesta última etapa. Sense ell no me n'hauria sortit. T'estimo.

Per últim vull donar les gràcies a la meva família. Pel seu suport incondicional, per oferir-me tantes facilitats, per animar-me tantes vegades a seguir el camí que em feia feliç. Perquè som una pinya i per lo molt que m'estimen.

# *Abreviatures*



## Abreviatures

---

AA:	Àcid Araquidònic, de l'anglès <i>Arachidonic Acid</i>
ADP:	Adenosina difosfat
AIF:	Factor inductor d'apoptosi, de l'anglès <i>Apoptosi- inducing factor</i>
AINE:	Antiinflamatori no esteroïdal
AMPA:	Àcid $\alpha$ -amino-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropioníc
AMPc:	Adenosina monofosfat cíclic
AP-1:	Proteïna activadora 1, de l'anglès <i>activator protein 1</i>
APC:	Cèl·lula presentadora d'antigens, de l'anglès <i>Antigen-presenting cell</i>
ARN:	Àcid ribonucleic
ARNm:	ARN missatger
ATP:	Adenosina 5'-trifosfat
BHE:	Barrera hematoencefàlica
BID:	de l'anglès <i>Bcl-2 interacting domain</i>
BSA:	Albúmina de sèrum boví, de l'anglès <i>Bovine serum albumin</i>
C/EBP:	potenciador CCAAT vinculat a proteïna de l'anglès <i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
CAD:	de l'anglès <i>Caspase-activated DNase</i>
cDNA:	ADN complementari, de l'anglès <i>Complementary DNA</i>
COX:	Ciclooxigenasa
DAMP:	Patrons moleculars associats a dany, de l'anglès <i>danger-associated molecular patterns</i>
DD:	Domini de mort, de l'anglès <i>death domain</i>
DMSO:	Dimetilsulfòxid
dNTP:	de l'anglès <i>deoxyribonucleotide</i>
dsRNA:	ARN de doble hèlix, de l'anglès <i>double-stranded RNA</i>
DTT:	Ditiotreitòl
EDTA:	Àcid etilendiaminotetraacètic
EET:	Àcid epoxieicosatrienoic
eNOS:	Sintasa d'Òxid Nítric endotelial, de l'anglès <i>endothelial NOS</i>
EPOX:	Epoxigenasa
EPSC:	Potencials excitatoris postsinàptics evocat, de l'anglès <i>excitatory postsynaptic current</i>
ERK1/2:	de l'anglès <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
FADD:	Domini de mort associat a Fas, de l'anglès <i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FBS:	Sèrum boví fetal, de l'anglès <i>fetal bovine serum</i>

---



## Abreviatures

---

FSC:	Fluid sanguini cerebral
GAPH:	Gliceraldehid -3- fosfat deshidrogenasa, de l'anglès <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFAP:	de l'anglès <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GSH:	Glutatió
GSHPx:	Glutatió peroxidasa
HETE:	Àcid hidroecosatetraenoic
HEPES:	Àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazona-etanosulfònic
HPETE:	Àcid hidroperoxieicosatetraenoic
HSP:	Proteïna de xoc tèrmic, de l'anglès <i>heat shock protein</i>
ICAM:	molècula d'adhesió intercel·lular, de l'anglès <i>intracellular adhesion molecule</i>
IFN:	Interferó
IκB:	Inhibidor del factor Kappa-B, de l'anglès <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
IκB-NS:	Senyal nuclear de IκB, de l'anglès <i>IκB-nuclear localization signals</i>
IKK:	Cinasa de IκB, de l'anglès <i>IκB kinase</i>
IL:	Interleucina
iNOS	Sintasa d'Òxid Nítric induïble, de l'anglès <i>inducible NOS</i>
IP-10:	Lligand 10 de les quimiocines, de l'anglès <i>chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
IRAK:	Cinasa associada al receptor de la IL-1, de l'anglès <i>IL-1 receptor associated kinase</i>
IRF:	Factor regulador de interferó, de l'anglès <i>Interferon regulatory factor</i>
IRSE:	de l'anglès <i>Interferon responsive sequence element</i>
JNK:	de l'anglès <i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LBP:	Proteïna d'unió al LPS, de l'anglès <i>LPS-Binding Protein</i>
LCT:	Leucotriè
LOX:	Lipooxigenasa
LPS:	Lipopolisacàrid bacterià
LRR:	Repeticions riques en Leucina, de l'anglès <i>Leucine rich repeats</i>
MadCAM-1:	Molècula d'adhesió cel·lular de la mucosa vascular 1, de l'anglès <i>mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1</i>
MAL:	Adaptador de la proteïna MyD88, de l'anglès <i>MyD88 adapter-like protein</i>
MAPK:	Cinases associades a l'activació de mitògens, de l'anglès <i>Mitogen-activated protein (MAP) kinases</i>
MCP-1:	Proteïna quimioattractant de monòcits, de l'anglès <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>

---

## Abreviatures

---

MD-2:	Proteïna de diferenciació mieloide, de l'anglès <i>myeloid differentiation protein2</i>
MHC:	Complex major d'histocompatibilitat, de l'anglès <i>major histocompatibility complex</i>
MIP-1 $\alpha$ :	Proteïna inflamatòria de macròfags 1, de l'anglès <i>macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
MMP:	Metal·loproteïnasa de la matriu, de l'anglès <i>Matrix metalloproteinase</i>
MPTP:	Porus de transició mitocondrials, de l'anglès <i>Mitochondrial permeability transition</i>
MyD88:	Gen de resposta primària a la diferenciació mieloide 88, de l'anglès <i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NAP1:	Proteïna associada cinasa activadora de NF $\kappa$ B, de l'anglès <i>NF<math>\kappa</math>B-activating kinase-associated protein 1</i>
NEMO:	Modulador essencial de NF $\kappa$ B, de l'anglès <i>NF<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
NF $\kappa$ B:	Factor nuclear Kappa-B, de l'anglès <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK:	de l'anglès <i>natural killer cell</i>
NMDA:	N-metil-D-aspartat
NO:	Òxid nítric
nNOS:	Sintasa d'Òxid Nítric neuronal, neuronal NOS
NOS:	Sintasa d'Òxid Nítric, de l'anglès <i>Nitric oxide synthase</i>
SDS-PAGE:	de l'anglès <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAMP:	Patró molecular associat a patògens, de l'anglès <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PARP:	proteïna poli (-ADP-ribosa) polimerasa , de l'anglès <i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PECAM-1:	Molècula d'adhesió a plaquetes/cèl·lules endotelials, de l'anglès <i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PFA:	Paraformaldeid
PG:	Prostaglandina
PGD <sub>2</sub> :	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGDS:	Sintasa de prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub> :	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub> S:	Sintasa de prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> :	Prostaglandina PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub>
PGFS:	Sintasa de prostaglandina D <sub>2</sub>
PGI:	Prostaciclina

---

## Abreviatures

---

PGI <sub>2</sub> S:	Sintasa de prostaciclina
PLA <sub>2</sub> :	Fosfolipasa A <sub>2</sub> , de l'anglès <i>Phospholipase A<sub>2</sub></i>
PRR:	Receptor de reconeixement de patògens, de l'anglès <i>pattern recognition receptors</i>
PSGL-1:	Lligand de P-selectina 1, <i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> :	Fosfatidil inositol-(4,5)-bifosfat
PVDF:	Polímer de fluorur de vinilidè, de l'anglès <i>polymer of vinylidene fluoride</i>
RANTES:	Quimiocina CCL5, de l'anglès <i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
RIP1:	de l'anglès <i>receptor-interacting protein</i>
RNS:	Espècies reactives de nitrogen, de l'anglès <i>reactive nitrogen species</i>
ROS:	Espècies reactives d'oxigen, de l'anglès <i>reactive oxygen species</i>
SDS:	Sodi dodecil sulfat
SINTBAD:	Adaptador a TBK-1 similar a NAP-1, de l'anglès <i>similar to NAP-1 TBK-1 adaptor</i>
siRNA:	ARN d'interferència, de l'anglès <i>small interfering RNA</i>
SNC:	Sistema Nerviós Central
SNP:	Sistema Nerviós Perifèric
SOCS:	Supressor de la senyalització de citocines, de l'anglès <i>suppressor of cytokine signaling-1</i>
SOD:	Superòxid dismutasa
ssRNA:	ARN de cadena simple, de l'anglès <i>single-stranded RNA</i>
STAT-1:	De l'anglès <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAK-1:	Cinasa activada per TGF- $\beta$ , de l'anglès <i>TGF-beta activated kinase 1</i>
TBK-1:	Cinasa vinculada a TANK-1, de l'anglès <i>TANK-binding kinase</i>
TBP	De l'anglès <i>TATA box binding protein</i>
TGF- $\beta$ :	Factor de creixement transformant $\beta$ , de l'anglès <i>Transforming growth factor<math>\beta</math></i>
TIR:	De l'anglès <i>toll-interleukin 1 receptor domain</i>
TIRAP:	Proteïna associada a TIR, de l'anglès <i>TIR domain containing adaptor protein</i>
TLR:	De l'anglès <i>Toll/IL-1 receptor (TIR) domain</i>
TNF- $\alpha$ :	Factor de necrosi tumoral $\alpha$ , de l'anglès <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TNFR:	Receptor del factor de necrosi tumoral, de l'anglès <i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRAF:	Factor associat al receptor de TNF, de l'anglès <i>TNF receptor associated factors</i>
TRAM:	Molècula adaptadora relacionada amb TRIF, de l'anglès <i>TRIF-related adaptor molecule</i>

---

## Abreviatures

---

TRIF:	Adaptador inductor de IFN amb domini TIR, de l'anglès <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
Tx:	Tromboxà
TxA <sub>2</sub> :	Tromboxà A2
TxS:	Sintasa de tromboxà
UbcE3:	Enzim conjugador a ubiquitina E3, de l'anglès <i>ubiquitin-conjugating enzyme E3 variant1</i>
Uev1A:	Enzim conjugador a ubiquitina E2, variant 1, de l'anglès <i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant1</i>
VCAM-1:	Molècula vascular d'adhesió cel·lular-1, de l'anglès <i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
WB:	De l'anglès <i>Western Blot</i>

---



# *Índex*



## **INTRODUCCIÓ**

### **1. LA ISQUÈMIA CEREBRAL**

1.1. El procés isquèmic	3
1.2. Concepte de penombra isquèmica	4
1.3. La cascada isquèmica	5
1.3.1. La Fallida energètica	5
1.3.2. L'Excitotoxicitat	7
1.3.3. L'Estrès oxidatiu	8
1.3.4. Mort cel·lular: necrosi i apoptosi	9
1.4. Dany secundari	10
1.4.1. Resposta inflamatòria cel·lular	10
1.4.2. Dany en la barrera hematoencefàlica	11

### **2. PAPER DE LA INFLAMACIÓ EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL**

2.1. Reacció glial	14
2.1.1. Activació microglial	14
2.1.2. Activació astrogial	16
2.2. Migració Leucocitària	17
2.2.1. Citocines com a mediadors inflamatoris	18
2.2.1.1. Interleucines	19
2.2.1.2. Quimiocines	21
2.2.2. Molècules d'adhesió	22
2.2.2.1. Les selectines	22
2.2.2.2. La superfamília de les immunoglobulines	23
2.2.2.3. Les Integrines	24
2.3. La immunitat innata en la Isquèmia/Reperfusió	24



<b>3. ELS RECEPTORS <i>TOLL-LIKE</i></b>	
3.1. Receptors <i>Toll-Like</i>	27
3.2. Receptor TLR4 i vies de senyalització	29
3.2.1. Via dependent de la proteïna adaptadora MyD88	30
3.2.2. Via dependent de la proteïna adaptadora TRIF	32
3.3. Paper dels TLRs en la isquèmia/reperfusió	34
3.4. Lligands endògens dels receptors TLRs	35
3.5. TLR4 en la isquèmia cerebral	37
<b>4. PAPER DELS ASTRÒCITS EN EL SNC</b>	
4.1. Estructura i funció de l'astroglia en el SNC	39
4.2. Paper dels astròcits en la BHE i la Unitat Cerebrovascular	41
4.3. Paper dels astròcits en el procés isquèmic	43
4.4. Paper dels astròcits en la resposta inflamatòria	45
<b>5. LA CICLOOXIGENASA-2 EN LA ISQUÈMIA I LA INFLAMACIÓ</b>	
5.1. L'enzim Prostaglandina H sintasa i el metabolisme de l' àcid Araquidònic	48
5.2. La COX-2 i els prostanoids en la isquèmia cerebral i en la inflamació	53
5.3. Paper dual de la prostaglandina PGE2 en la isquèmia cerebral i la inflamació	55
<b>OBJECTIUS</b>	57

## ***MATERIALS I MÈTODES***

1. Animals utilitzats	61
2. Cultius cel·lulars	63
2.1. Cultiu enriquit d' astròcits de rata	66
2.2. Cultiu enriquit d' astròcits de ratolí	67
2.3. Cultiu de microglia	67
3. Tractaments	69
4. Injecció de LPS en rosegadors	71
5. Anàlisi de l'expressió i fosforilació de proteïnes	72
5.1. Western – Blot	72
5.2. Immunocitoquímica	79
5.3. Immunohistoquímica	80
6. Zimografia en gelatina	85
7. Silenciament gènic: RNAs d'interferència	88
8. Anàlisi de l'Expressió gènica: RT-PCR	90
9. Anàlisi de l' activitat transcripcional de NFκB	94
10. Anàlisi de l' alliberació de molècules en el medi de cultiu per ELISA	97
10.1. Mesura de la concentració dels prostanoids PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> i TxB <sub>2</sub>	97
10.2. Mesura de la concentració de LTC <sub>4</sub>	98
10.3. Mesura de la concentració de les citocines INF-β, TNF-α i IL-6	99
11. Assaig de l'activitat histona acetiltransferasa de p300/CBP per immunoprecipitació	100
12. Determinació del grau de fosforilació dels residus de serina S468 i S536 de NFκB	100
13. Anàlisi estadístic	102

## **RESULTATS**

*Treball 1: Estudi de les diferents vies de senyalització iniciades pel receptor TLR-4 en resposta al LPS en cèl·lules astrocitàries* 105

*Treball 2: Efecte de la COX-2 en la producció de prostanoids i en la resposta inflamatòria que es genera en astròcits per activació del receptor TLR-4* 131

**DISCUSSIÓ** 163

**CONCLUSIONS** 175

**BIBLIOGRAFIA** 179

**ANNEXES** 209

*Annex 1: Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways* 211

*Annex 2: Autophagy, and BiP level decrease are early key events in retrograde degeneration of motoneurons* 227

*Annex 3: Nitric oxide mediates NMDA-induced persistent inhibition of protein synthesis through dephosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and eukaryotic initiation factor 4G proteolysis.* 241

# *Introducció*



---

# La isquèmia cerebral

---

---

## El procés isquèmic

---

L'ictus és una malaltia neurològica causada per una disminució o interrupció sobtada del flux sanguini en una regió del cervell. El flux sanguini cerebral (FSC) es troba normalment al voltant dels 50 ml/100g de teixit/minut, i quan cau per sota dels 10ml/100g de teixit/minut es pot produir una lesió isquèmica irreversible. Aquesta alteració comporta una disminució en l'arribada d'oxigen i glucosa al teixit cerebral, que són els substrats principals que necessita el cervell de forma constant per a mantenir l'homeòstasi metabòlica i les funcions cerebrals.

L'ictus és una malaltia molt freqüent, en països desenvolupats la taxa de mortalitat deguda a l'ictus isquèmic és elevada, a més de ser una de les causes principals d'invalidesa i demència, cosa que implica un cost important, tant econòmic com social. Els ictus poden ser de tipus isquèmic (obstrucció arterial) o hemorràgics (hemorràgia cerebral). En aquesta tesi tractarem més el tema dels ictus isquèmics que són els més freqüents (80% aproximadament).

Les causes que provoquen una disminució del FSC en un episodi isquèmic poden ser diverses, les més freqüents solen ser degudes a: l'oclusió arterial per una complicació trombòtica sobre la placa d'ateroma (oclusió *in situ*), o a la migració d'un trombus format sobre la placa d'ateroma cap a les artèries distals (embòlia arterio-arterial).

Si l'artèria obstruïda és una artèria principal, com l'artèria Caròtida o la Cerebral Mitja, es tracta d'una isquèmia anomenada de gran vas, en aquets cas la regió afectada serà extensa perquè englobarà una regió ample d'irrigació al cervell. Si l'artèria obstruïda és una arteriola, aleshores estem parlant d'una isquèmia anomenada de petit vas, i la regió afectada serà més petita.

El dany isquèmic depèn de diferents factors: el grau d'oclusió arterial, la durada de l'episodi isquèmic i la irrigació col·lateral present en aquella zona del cervell.

## Concepte de penombra isquèmica

L'infart cerebral és l'àrea de teixit cerebral danyat com a conseqüència d'una isquèmia cerebral. En les primeres hores després de l'inici de la isquèmia, dins de l'àrea afectada podem distingir dos compartiments: el Nucli i la Penombra Isquèmica.

La regió del cervell on la caiguda del FSC és més important (fins valors  $\leq 10$  ml/100 g/min) rep el nom de Nucli Isquèmic. En aquesta regió el teixit quedarà danyat de forma irreversible i les cèl·lules de la zona moriran ràpidament per necrosi, caracteritzada per una ràpida fallida energètica, lipòlisi, proteòlisi, disgregació de microtúbuls, i finalment mort cel·lular.

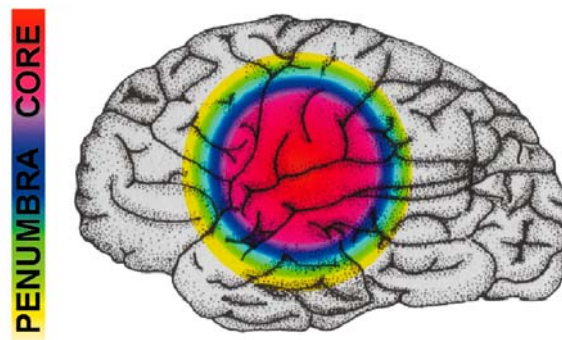


Figura II. Penombra isquèmica (adaptat Dirnagl et al., 1999).

Envoltant el Nucli Isquèmic existeix una altra regió anomenada Penombra Isquèmica. En aquesta regió la disminució del FSC és menor a mida que ens anem allunyant del Nucli Isquèmic (10 - 22 ml/100 g/min) però encara insuficient per a mantenir la homeòstasi metabòlica. Les neurones en aquesta regió no són capaces de generar potencials d'acció però tenen prou energia per a mantenir el potencial de membrana, és a dir, no són neurones funcionals però sí que són cèl·lules viables. El dany en aquesta regió vindrà determinat per diversos factors com la durada de l'episodi isquèmic i alteracions secundàries, entre les que es considera la inflamació.

Una part important de la recerca es centra en l'estudi de la recuperació de la zona de Penombra amb fàrmacs neuroprotectors, ja que està considerada com a l'àrea de teixit cerebral potencialment salvable de la mort després d'un insult isquèmic.

### **La cascada isquèmica**

---

El teixit cerebral requereix d'elevades quantitats d'energia per al seu correcte funcionament. Tot i que el cervell representa un 2% del pes corporal, és responsable del 20% del consum total d'oxigen del cos i d'un 25% del consum total de glucosa.

Aquest elevat consum d'energia fa possible la regulació de connexions sinàptiques, el funcionament de canals iònics dependents de voltatge, i la síntesi, transport emmagatzematge i alliberació de diverses substàncies (neurotransmissors, pèptids, etc.).

Malgrat l'elevat requeriment energètic del teixit cerebral, els dipòsits de substrats generadors d'energia com el glicogen són molt escassos, de fet un ritme normal del procés de producció d'ATP esgotaria aquests reservoris en pocs minuts. Per tant, l'impediment sostingut de l'aport d'aquests substrats és fatal per la viabilitat del teixit nerviós.

---

### **La Fallida energètica**

---

La disminució del FSC provoca una reducció en l'aport de glucosa i oxigen al teixit. Aquests són substrats essencials per a la síntesi d'ATP, a través de la glucòlisi i la fosforilació oxidativa. Per tant, la disminució d'aquests substrats energètics es tradueix, a nivell cel·lular, en un ràpid esgotament de l'ATP que sosté gran part dels processos necessaris pel correcte funcionament cel·lular (Sweeney et al., 1995; Sykova et al., 1994).



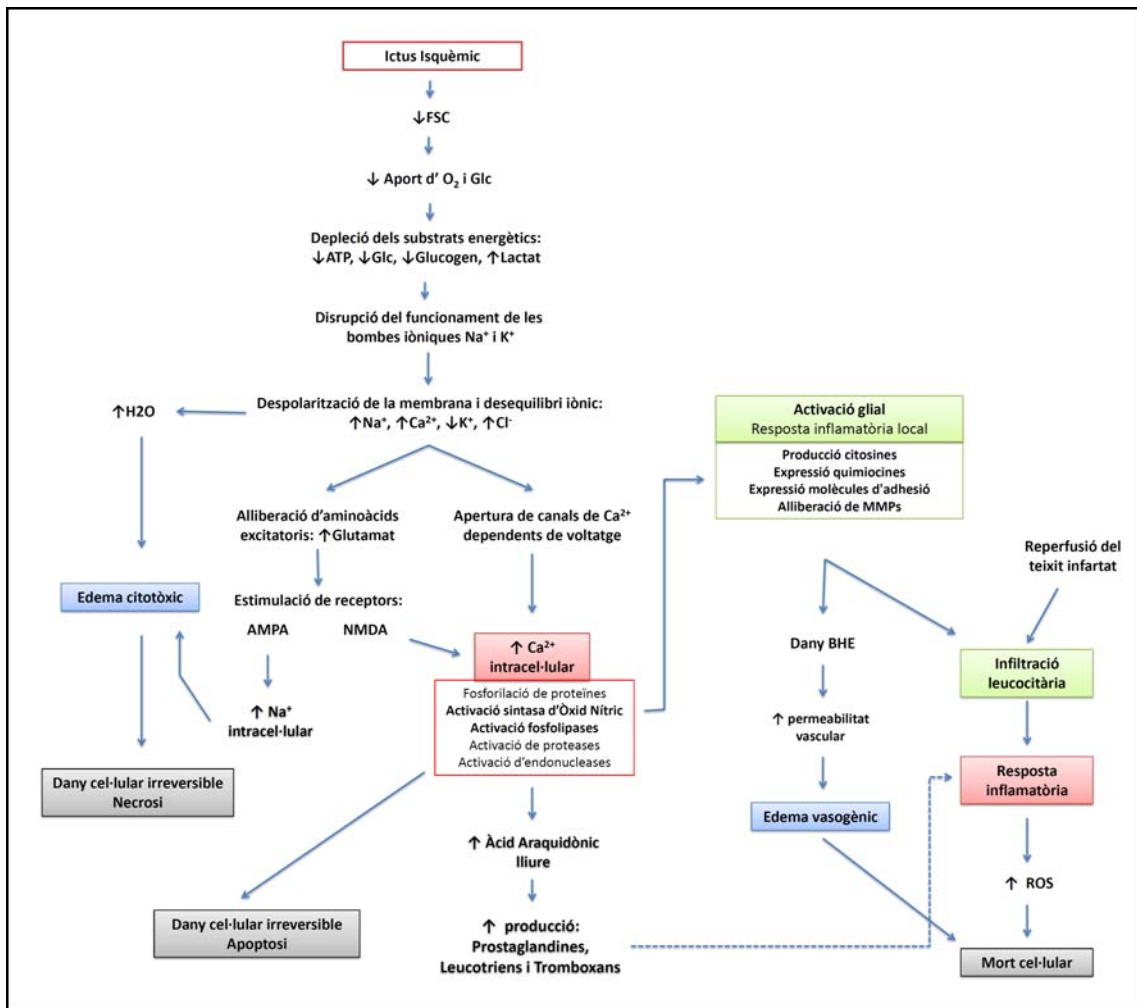


Figura 12. La cascada isquèmica.

Un dels primers mecanismes que es veuen afectats degut a la falta d' ATP és el mecanisme de transport iònic de la membrana cel·lular. Les bombes i canals iònics que permeten el transport actiu dels ions Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> i dels ions Ca<sup>2+</sup> entre l'exterior i interior cel·lular, i que necessiten una despesa continua d' ATP, deixen de funcionar o ho fan de forma incorrecta. Això provoca la desregulació del transport iònic i una entrada massiva de ions Na<sup>+</sup>, que al seu torn provoquen també l'entrada de ions Cl<sup>-</sup>. L'increment de l'osmolaritat cel·lular que es produeix com a conseqüència dels esdeveniments abans esmentats, provoca l'entrada massiva d' aigua a l'interior de la cèl·lula. Aquest procés rep el nom d'edema citotòxic, i pot provocar la mort cel·lular per necrosi.

El desequilibri iònic provocarà també la sortida descontrolada de ions K<sup>+</sup> a favor de gradient i per tant la despolarització de neurones i cèl·lules glials (Martin et al., 1994;

Katsura et al, 1994), provocant l'activació de canals de  $\text{Ca}^{2+}$  dependents de voltatge, l'augment dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lulars, i l'alliberació d' aminoàcids excitatoris com el glutamat, a l'espai extracel·lular.

Altres processos dependents d'energia com la recaptació presinàptica d'aminoàcids excitatoris de l'espai intersticial també es veuen perjudicats, augmentant així l'acumulació de glutamat a l'espai extracel·lular (Nicholls i Attwell, 1990).

La reducció de la disponibilitat d'oxigen fa que la cèl·lula metabolitzi la glucosa de forma anaeròbia, produint-se una acumulació d'àcid làctic que provoca la disminució del pH intracel·lular, potencia l'entrada de ions, empitjora la situació d'edema citotòxic (Nicoli et al., 2003; Schneweis et al, 2001; Brouns et al., 2008), i contribueix a la formació de dany secundari i expansió de l'infart cerebral (Dohmen et al, 2007).

---

## L'Excitotoxicitat

---

El terme Excitotoxicitat fa referència al dany causat per l'estimulació excessiva dels receptors de Glutamat. En el cas de la isquèmia cerebral, es produeix una l'alliberació anormal de neurotransmissors excitatoris i una disfunció en la seva recaptació que contribueixen a aquest procés (Choi et al, 1988).

L' acumulació de glutamat en l'espai extracel·lular provoca l'estimulació dels receptors  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA), kainat i N-metil-D-aspàrtic (NMDA), en neurones postsinàptiques. Aquesta activació provoca l'entrada de ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , i  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canals activats per aquests receptors (Dirnagl et al, 1999) que al seu torn, provocaran la despolarització d'aquestes neurones causant una nova entrada de calci intracel·lular i l' alliberació de més glutamat, amplificant de manera local la lesió isquèmica inicial.

El ió calci pot actuar com a segon missatger en situacions fisiològiques, a més també serveix com a cofactor per a l'activació de diferents sistemes enzimàtics. No obstant, l'augment desmesurat dels nivells de calci intracel·lular inicien l'activació de diferents processos cel·lulars que contribueixen de forma important al dany isquèmic. Així, nivells elevats de calci intracel·lular provoquen l'activació d'enzims dependents de calci com enzims proteolítics, fosfolipases, ciclooxigenases, endonucleases,

adenosintrifosfatases, calpaïnes, i sintases d'òxid nítric. Aquests enzims, degraden proteïnes del citoesquelet i de la matriu extracel·lular, provoquen la formació de radicals lliures d'oxigen (Love et al., 1999; Chan et al., 2001; Kelly et al., 2008), i a més poden condicionar l'expressió de diversos gens de resposta immediata (Castillo, 1999).

---

### L'Estrès oxidatiu

---

L'estrès oxidatiu està implicat en una gran varietat de malalties, incloent-hi la isquèmia cerebral (Mattson et al., 2001). L'estrès oxidatiu és un mecanisme de dany secundari tissular important després d'un episodi isquèmic i és més patent en aquell territori infartat on hi ha reperfusió. El cervell és altament susceptible a l'estrès oxidatiu i a l'elevada generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) per diverses raons: el seu elevat contingut lipídic, una taxa de consum d'oxigen molt elevada, un nivell baix d'antioxidants endògens, i a les diverses reaccions químiques que involucren l'oxidació de la dopamina i del glutamat (Mattson et al., 2001; Heiss, 2002).

Els mitocondris són els principals responsables de la síntesi d'ATP a través de la fosforilació oxidativa. Aquest procés genera espècies reactives d'oxigen, que són molècules de petit tamany, produïdes en condicions fisiològiques. Existeix tota una bateria d'enzims antioxidants encarregats d'eliminar les ROS que es van formant a conseqüència del funcionament normal de la cèl·lula. Aquests enzims són d'una banda la glutatió peroxidasa (GSHPx) i la catalasa, que catalitzen la conversió de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ ; i de l'altra, les superòxid dismutases (SOD), que converteixen  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ . L'estrès oxidatiu es desencadena quan la formació de ROS supera la capacitat antioxidant de la cèl·lula i aquesta no pot contrarestar els seus efectes nocius.

A part de les ROS, també es generen espècies reactives de nitrogen (RNS). L'òxid nítric és un radical lliure que es genera per l'acció d'enzims específics anomenats sintases d'òxid nítric (NOS). Existeixen tres isoformes de l'enzim: la sintasa d'òxid nítric neuronal (nNOS), la isoforma induïble (iNOS) i la isoforma endotelial (eNOS), que metabolitzen la L-arginina a L-citrulina. L'òxid nítric és una molècula soluble capaç de difondre a través de la membrana plasmàtica i en condicions fisiològiques actua com a missatger intercel·lular. S'ha descrit la seva participació en la senyalització neuronal, la regulació de la pressió sanguínia, la relaxació de la musculatura llisa i la resposta

immune. No obstant això, nivells patològics de RNS poden actuar sobre les proteïnes cel·lulars, provocant la seva nitrosilació i alterant la seva estructura i funcionalitat de forma permanent (Coyle, 1993).

---

### Mort cel·lular: necrosi i apoptosi

---

La isquèmia cerebral provoca una mort neuronal ràpida per necrosi en aquelles regions del cervell on la disminució del FSC ha estat més important a conseqüència de la disrupció de les membranes cel·lulars i l'edema citotòxic. Les cèl·lules que moren per necrosi alliberen el seu contingut cel·lular al medi, com el glutamat, calci, etc., i també senyals anomenades DAMP (de l'anglès *danger associated molecular patterns*). Aquestes substàncies poden actuar com a inductors de respostes d'immunitat innata i provocar inflamació o mort en les cèl·lules veïnes.

La mort apoptòtica també és present en el nucli isquèmic, però guanya importància en la zona de penombra. Existeixen dues vies de mort apoptòtica principals la intrínseca i la extrínseca. La via proapoptòtica intrínseca està causada per les elevades concentracions de calci intracel·lulars que esdevenen com a resultat de la activació desmesurada de receptors de NMDA i AMPA. Aquests nivells de calci provoquen l'activació de calpaïnes que amb la seva activitat proteolítica activaran la proteïna *Bcl-2 interacting domain* (tBID). tBID translocarà a la mitocòndria on provocarà canvis en l'obertura dels *Mitochondrial permeability transition pores* (MPTP) (Webster et al., 2006). L'obertura dels MPTPs permet l'alliberació de dos grups de proteïnes proapoptòtiques des de l'espai intermembranós mitocondrial. Així doncs, el factor inductor d'apoptosi (AIF) translocarà al nucli activant la mort cel·lular programada, i el citocrom c, que s'unirà a les proteïnes caspasa-9 (Sugawara et al., 2002) i Apaf-1, formant l'apoptosoma i activant a la caspasa-3 (Asahi et al., 1997). La caspasa-3 transloca al nucli cel·lular i actua sobre la proteïna poli (-ADP-ribosa) polimerasa (PARP) tallant-la i inactivant-la, i sobre la proteïna *caspase-activated DNase* (CAD), provocant danys en el DNA que contribuiran a provocar la mort cel·lular (Endres et al., 1997; Namura et al., 1998). La via apoptòtica intrínseca s'ha descrit com un component de mort cel·lular important en models d'isquèmia cerebral focal i global (Cao et al., 2004).

La via proapoptòtica extrínseca, s'inicia per l'activació de receptors de membrana pertanyents a la família de receptors del factor de necrosi tumoral (TNFR): TNFR-1, Fas, i p75<sup>NTR</sup>. L'activació d'aquests receptors, a través de la interacció amb citocines com el lligand Fas (FasL) i TNF, comporta l'activació de caspasa-8, la formació de MPTPs, la formació de l'apoptosoma, l'activació de la caspasa-3, i finalment la fragmentació de l'ADN i la mort cel·lular. L'activació de la via apoptòtica extrínseca també contribueix a la mort apoptòtica en la isquèmia cerebral. Diversos estudis han detectat un augment en la expressió d'aquests receptors en models d'isquèmia cerebral en rata a partir de 12 hores i fins a 48 hores després de l'insult isquèmic. A més, també han observat que l'impediment en l'activació d'aquests receptors per mitjà de la utilització d'animals *knock-out*, o l'administració d'anticossos neutralitzants de determinades citocines, té efectes neuroprotectors (Martin-Villalba et al., 1999; Rosenbaum et al., 2000)

## Dany secundari

---

### Resposta inflamatòria cel·lular

---

La resposta inflamatòria que es dona després d'una isquèmia cerebral focal es pensa que juga un paper important en l'evolució del dany isquèmic. Aquesta resposta presenta diferents processos com l'activació glial, l'aparició d'edema vasogènic, l'expressió del complex major d'histocompatibilitat II (MHCII), l'activació del sistema del complement, l'acumulació de citocines i quimiocines inflamatòries, l'activació de metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular (MMPs), l'augment de l'expressió de molècules d'adhesió, i la producció de ROS, prostaglandines i leucotriens.

Diversos tipus cel·lulars contribueixen a la inflamació postisquèmica. En primer lloc, la micròglia i els astròcits poden ser activats, entre d'altres, per les espècies reactives d'oxigen presents en el territori infartat. Ambdós tipus cel·lulars són capaços de secretar factors inflamatoris com citocines i quimiocines, i d'augmentar l'expressió de la iNOS,

incrementant la resposta inflamatòria inicial i fomentant la infiltració leucocitària en el teixit infartat. D'altra banda, les cèl·lules de la micròglia adquireixen funcions fagocítiques i presentadores d'antigen. Així doncs, actuen com a macròfags residents del cervell i tenen un paper fonamental com a cèl·lules fagocítiques en el sistema nerviós central. No obstant això, els astròcits també tenen un paper en la infiltració leucocitària postisquèmica, ja que són inductors de l'expressió de quimiocines i molècules d'adhesió prop dels vasos sanguinis als que envolten (Farina et al., 2007).

Els leucòcits circulants s'adhereixen a les parets dels vasos sanguinis i migren cap al cervell afectat amb el posterior alliberament de diversos mediadors proinflamatoris, que provoquen lesions secundàries en el teixit potencialment viable que es troba proper al nucli isquèmic, i dany en la BHE, amb la generació d'espècies reactives d'oxigen i la producció de MMPs. Les molècules d'adhesió tenen un paper fonamental per la posterior infiltració de leucòcits al parènquima cerebral. La interacció entre els leucòcits i l'endoteli vascular es dona per l'acció de tres grans grups de molècules d'adhesió cel·lular: les selectines, la superfamília de les immunoglobulines i les integrines. La cascada inflamatòria també inclou la regulació de l'activitat de diversos enzims com l'activació de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que hidrolitza glicerofosfolípids de la membrana cel·lular alliberant àcid araquidònic (AA). Aquest és metabolitzat a prostaglandines i leucotriens, per l'acció dels enzims ciclooxigenases (COX) o lipooxigenases (LOX), respectivament. Els nivells d'expressió de l'enzim ciclooxigenasa tipus 2 (COX-2) augmenten en la isquèmia i exerceix efectes deleteris. Per la seva banda, els leucotriens són potents quimiotàctics i estan implicats en el dany de la barrera hematoencefàlica (BHE), en la formació de l'edema citotòxic i en la mort neuronal.

---

### **Dany en la barrera hematoencefàlica**

---

Després de l'ictus, es produeixen alteracions de la BHE. Aquesta està formada per les cèl·lules endotelials de la microvasculatura cerebral, la seva làmina basal, els peus del astròcits que envolten els vasos, pericits i altres cèl·lules perivasculars com els macròfags perivasculars. En comparació amb l'endoteli perifèric, les cèl·lules endotelials que estan formant la barrera hematoencefàlica estan preparades per a actuar com una barrera física altament selectiva entre el parènquima cerebral i la sang. Les

cèl·lules endotelials que formen la BHE estan fortament unides entre elles a través de les *tight junctions* o unions estretes, de forma que el pas paracel·lular (entre cèl·lules) de molècules és pràcticament impossible. El pas de molècules només pot ser transcel·lular, es permet el pas per difusió de molècules gasoses petites com l'O<sub>2</sub> i el CO<sub>2</sub>, o bé de molècules lipofíliques petites com alguns barbitúrics o etanol. La resta de molècules lipofíliques més grans o molècules hidrofíliques de qualsevol tamany requereixen la interacció amb transportadors específics. També existeix el transport de molècules per transcitosi, ja sigui mitjançant un receptor o per adsorció, però aquest tipus de transport és minoritari en comparació amb l'endoteli perifèric. Així doncs, la BHE s'encarrega de permetre el pas selectiu dels nutrients necessaris per al correcte funcionament de les cèl·lules que conformen el teixit nerviós, així com d'alliberar al torrent sanguini aquells productes de rebuig resultat del metabolisme cel·lular. A més també s'encarrega de mantenir una concentració iònica adient en el fluid intersticial per al correcte funcionament cel·lular i sinàptic, així com de regular el pas de neurotransmissors i agents neuroactius entre el SNC i la sang.

El grau de disrupció de la BHE en l'ictus isquèmic agut varia considerablement depenent de la gravetat de l'accident cerebrovascular. En general, s'observa dany inicial en la làmina basal de l'endoteli vascular, que pot detectar-se poques hores després de l'inici de la isquèmia (Hamann et al., 1995) acompanyat per un augment de la permeabilitat de la BHE (Belayev et al., 1996). Diversos mediadors contribueixen al dany isquèmic de la BHE, com l'acumulació de bradicinina (Kamiya et al., 1993), el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) (Abumiya et al., 1999), i la trombina (Okada et al., 1999). A més, aquests mediadors tenen un paper clau en l'activació de les MMPs i altres proteases.

L'expressió de les MMP en el cervell adult és molt baixa en condicions normals. Diferents estudis clínics i experimentals han demostrat que diverses MMPs com la MMP-2, la MMP-3, la MMP-7, o la MMP-9 augmenten la seva expressió en la isquèmia cerebral (Rosell et al. 2006; Suzuki et al., 2007; Sole et al., 2004). L'estrès oxidatiu pot desencadenar l'alliberament de MMP-9 per part de les neurones, les cèl·lules gials i les cèl·lules endotelials. La seva acció comporta el dany de la BHE a través de la digestió de la làmina basal de l'endoteli (Gasche et al., 2001; Clark et al., 1997).

Existeix una segona fase de dany de la BHE associada a la reperfusió del teixit isquèmic, provocada principalment per l'activitat dels neutròfils adherits a la paret dels vasos o infiltrants en el territori infartat. Aquests neutròfils incrementen l'alliberació de metal·loproteïnases com la MMP-9 durant les primeres 24 hores després de la isquèmia (Jin et al., 2010; Justícia et al., 2003; Gidday et al., 2005; McColl et al., 2008). Tot i que l'expressió de MMPs té un paper deleteri en la fase inicial de l'infart cerebral, diferents estudis suggereixen que també podrien jugar un paper beneficiós en fases posteriors durant la recuperació de l'accident cerebrovascular a l'afavorir la regeneració del teixit lesionat (Cunningham, 2005; Zhao et al., 2006).



---

## **Paper de la inflamació en la isquèmia cerebral**

---

La resposta inflamatòria que es dona després d'un episodi isquèmic és important per l'evolució del territori infartat. Després d'un episodi isquèmic hi ha una ràpida mort del teixit, i és necessari eliminar les restes cel·lulars d'aquesta zona, perquè poden actuar com a substàncies inductores de mort i inflamació en el teixit potencialment viable i exacerbar el dany isquèmic inicial (Dirnagl et al., 1999).

Tot i l'absència de components del sistema immune i del plasma degut a l'elevada especialització del teixit, el SNC pot dur a terme respostes immunitàries davant d'infeccions sistèmiques o localitzades, o en resposta al dany tissular (Owens et al, 2005). Les cèl·lules residents del SNC participen activament en la inflamació i són capaces d'iniciar i portar a terme una ràpida i efectiva resposta. En el SNC, les cèl·lules glials s'activen i contribueixen al desenvolupament de la resposta inflamatòria juntament amb les cèl·lules pròpies del sistema immunitari.

---

### **Reacció glial**

---

---

#### **Activació microglial**

---

La micròglia és el tipus cel·lular més destacat en la resposta inflamatòria en el SNC. En condicions fisiològiques les cèl·lules de la micròglia actuen com a "sensors" altament efectius en front a canvis en l'homeòstasi del medi que les envolta, i presenten una morfologia ramificada característica que sembla contribuir a aquesta funció (Nimmerjahn, A et al., 2005). Diversos estímuls, com el dany en el teixit cerebral o estímuls inflamatoris, provoquen l'activació d'aquest tipus cel·lular. Les cèl·lules de la micròglia activades, adquireixen una morfologia ameboide característica, s'indueix l'expressió de molècules de secreció com interleucines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-

12, IL-16, IL-23, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), quimiocines (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL12/SDF-1 $\alpha$ , CX3CL1/fractalina ) i factors del complement (C1, C3, C4), implicades totes elles en l'inici i la progressió de la resposta inflamatòria.

L'activació microglial també comporta l'expressió d'una gran varietat de receptors de membrana (taula 1), que contribueixen tant en la immunitat innata, amb l'expressió de CD14 i dels anomenats *pattern recognition receptor* (PRR) entre els que destaquen els receptors Toll-like, (Jack et al., 2005; Akira et al., 2006); com en la immunitat adaptativa, comportant-se com a cèl·lules inflamatòries amb capacitat fagocítica i presentadores d'antigen, interaccionant amb limfòcits CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> (Nguyen et al., 2002).

<b>RECEPTORS</b>	
<b>Receptors de molècules d'adhesió:</b>	MHCI i MHCII, receptors CD4, receptor de ICAM-1 receptor de LFA-1 i Mac-1receptors del complement (C1q, C5a)
<b>Receptors de citocines i quimiocines:</b>	IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-16 TNF- $\alpha$ M-CSF, GM-CSF CCR, CXCR, CX3CR
<b>Receptors associats a la immunitat innata:</b>	receptors Toll-like receptors CD14 receptors de Manosa

**Taula II. Receptors de membrana expressats per la microglia reactiva.**

Després d'un episodi isquèmic es dona una ràpida activació glial. Les cèl·lules de la microglia s'activen i proliferen ràpidament (Capone et al., 2007; Schilling et al., 2005). La seva capacitat fagocítica juga un paper molt important en l'eliminació de les restes cel·lulars resultats de la mort necròtica i apoptòtica que es dona en el teixit infartat, evitant així la progressió de l'extensió del dany isquèmic (Ekdahl et al., 2009). També alliberen citocines antiinflamatòries com la IL-10, i molècules tròfiques com les

neurotrofines, que poden mediar la neuroprotecció i reparació del teixit infartat (Storini et al. 2005; Lai i Tod, 2008). No obstant, les cèl·lules de la micròglia també actuen alliberant citocines proinflamatòries, radicals lliures d'oxigen i òxid nítric (NO), que contribueixen a la patogènesi de la isquèmia cerebral (Block i Hong 2005). L'activació microglial és doncs un procés indispensable en la inflamació postisquèmica, però sembla que juga un paper dual en l'evolució de l'infart cerebral.

---

### Activació astrogial

---

Després de l'infart, les cèl·lules astrocitàries també s'activen ràpidament. El segell distintiu de l'astrogliosi reactiva és la sobreexpressió de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP), i d'altres molècules formadores de filaments intermedis com la vimentina. Els astròcits reactius pateixen altres canvis morfològics com un augment en el tamany nuclear, la dispersió de la cromatina, l'augment del nombre de mitocondris i ribosomes, i un augment en la grandària del complex de Golgi.

Segons el context del procés patològic, l'astrogliosi es pot considerar un procés beneficiós que promou la supervivència neuronal mitjançant la producció de factors de creixement i factors neurotròfics com el factor de creixement nerviós (NGF), el factor bàsic de creixement de fibroblasts (FGF), el factor de creixement transformant (TFG)  $\beta$ , el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF), el factor neurotròfic ciliar (CNTF), el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), etc. (Tokita et al, 2001;. Zhang i Chopp, 2002, Chen i Swanson, 2003).

Un altre mecanisme que resulta de l'activació astrogial és la formació de l'anomenada cicatriu glial, on els astròcits reactius acaben envoltant l'àrea necròtica delimitant la regió danyada del teixit cerebral. Aquesta estructura és essencial per a la regulació espacial i temporal de la inflamació després d'una lesió del SNC (Herrmann et al., 2004). Dins de la zona demarcada, hi ha una resposta inflamatòria robusta que és adjacent al teixit nerviós viable, de manera que la cicatriu glial suposa una barrera física que protegeix el teixit de les possibles lesions secundàries. Aquesta cicatriu glial es forma per l'acumulació d'astròcits reactius en la superfície de la lesió, proteoglicans

de la matriu extracel·lular, i per una capa de fibroblasts del teixit conjuntiu adjacent que proliferen sobre la capa d'astròcits.

D'altre banda, els astròcits reactius també alliberen citocines i molècules d'adhesió implicades en el reclutament leucocitari en la regió infartada, i incrementant així el dany secundari que es dona com a resultat de la resposta inflamatòria secundària a la lesió isquèmica.

## Migració Leucocitària

---

El procés inflamatori també es caracteritza pel reclutament de leucòcits circulants del torrent sanguini. Astròcits i micròglia reactiva expressen i secreten molècules de senyalització, com citocines i quimiocines. Això provoca l'activació de les cèl·lules de l'endoteli neurovascular, que reaccionen induint l'expressió de molècules d'adhesió a la membrana cel·lular, l'alliberació de quimiocines i citocines proinflamatòries, l'activació dels leucòcits i un augment en la permeabilitat de l'endoteli.

La migració dels leucòcits cap a la regió isquèmica s'inicia amb un procés d'adhesió dels leucòcits circulants a les parets de l'endoteli vascular activat. Aquest procés comença amb el rodament d'aquests per la superfície de les cèl·lules endotelials, un procés conegut com a *rolling*, mediat per contactes dèbils entre les cèl·lules mitjançant molècules d'adhesió, principalment selectines. Aquest primer contacte provoca l'activació dels leucòcits, sobretot dels neutròfils, i l'expressió de molècules d'adhesió més específiques que reforçaran les interaccions amb l'endoteli vascular. A continuació, els leucòcits creuen l'endoteli a través de les unions entre les cèl·lules per *diapedesis* fins aconseguir la completa migració cap al parènquima cerebral.

La infiltració leucocitària postisquèmica està associada a un augment del dany isquèmic, degut a l'alliberació de citocines proinflamatòries, enzims proteolítics lisosomals, i ROS per part de les cèl·lules infiltrants (Lefer i Ma 1993; Tedgui i Bernard 1994).

## Citocines com a mediadors inflamatoris

Les citocines són glicoproteïnes de baix pes molecular que actuen com a molècules senyalitzadores capaces d'activar diferents cascades de senyalització en resposta a la seva interacció amb receptors específics de membrana. Estan considerades com a les mediadores principals del sistema immunològic i de respostes inflamatòries.

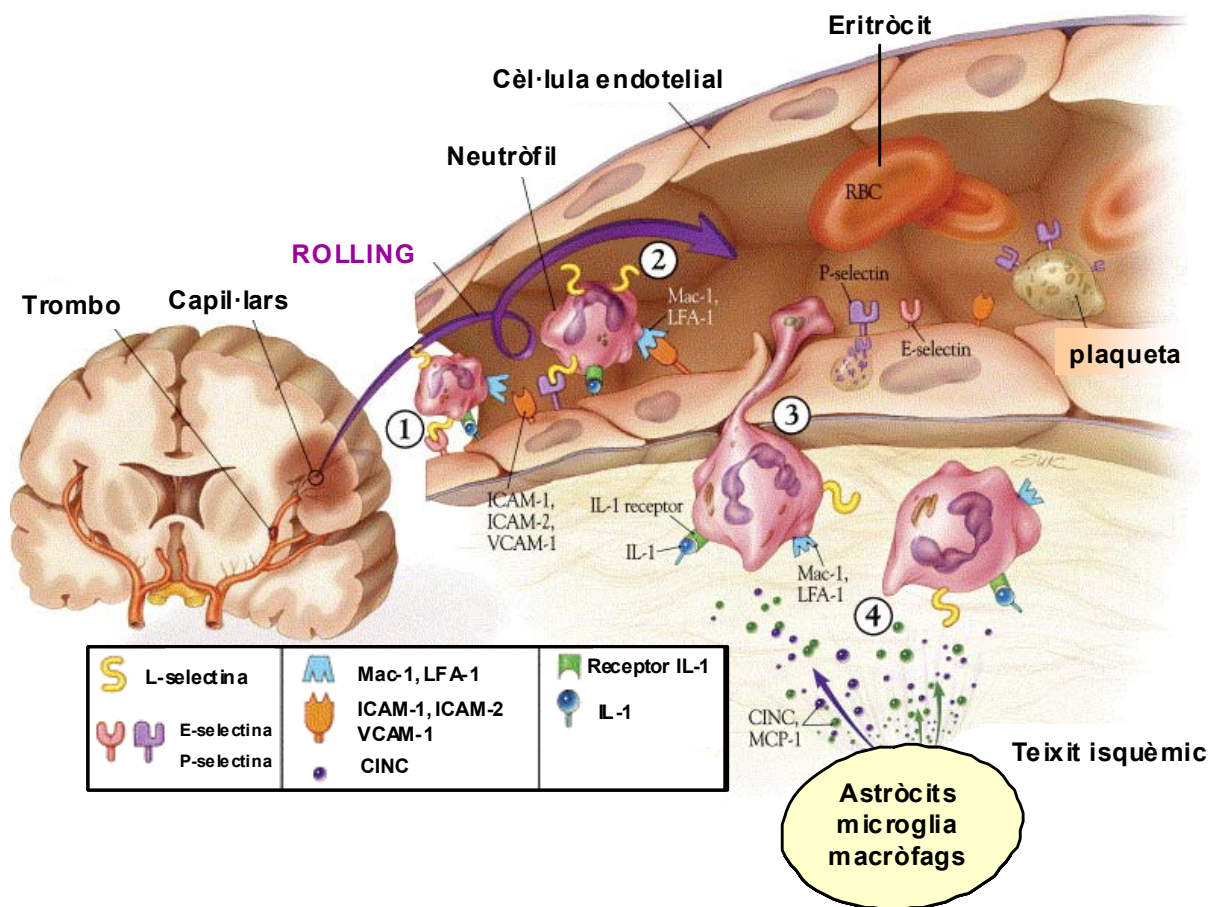


Figura 13. Infiltració leucocitària postisquèmica (adaptat Huang et al., 2006).

Els principals tipus cel·lulars productors de citocines són les cèl·lules del sistema immunològic com macròfags, monòcits i limfòcits, no obstant també s'ha observat la producció de citocines per part d'altres tipus cel·lulars com cèl·lules endotelials, fibroblasts, plaquetes i cèl·lules residents del sistema nerviós central com la microglia i els astròcits, i en neurones en menor mesura. En la isquèmia cerebral, la seva funció principal és la d'actuar com a molècules senyalitzadores participant en l'arribada i infiltració de leucòcits cap a la regió infartada i estimulant la síntesi de molècules

d'adhesió en leucòcits, cèl·lules endotelials i altres tipus cel·lulars. D'aquesta forma promouen la resposta inflamatòria en el teixit cerebral lesionat.

Les citocines són importants mediadors inflamatoris que es produeixen per les cèl·lules immunes i cèl·lules residents del cervell després de la isquèmia. Entre les citocines més estudiades en la isquèmia cerebral es troben la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) i la interleucina-10 (IL-10). També s'ha descrit que l'expressió de quimiocines com la proteïna quimiotàctica de monòcits-1 (MCP-1), proteïna inflamatòria dels macròfags-1 $\alpha$  (MIP-1) i la fractalcina (CX3CL1) juguen un paper en la isquèmia focal, facilitant la infiltració de leucocitària. A més, s'ha vist que les quimiocines poden afectar directament la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica.

## Interleucines

---

Les citocines més estudiades que s'ha demostrat que estan directament associades a la isquèmia cerebral són el factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), les interleucines (IL), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 i el factor de creixement transformant (TGF)- $\beta$ . Mentre que la IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , poden agreujar una lesió cerebral, el TGF- $\beta$  i IL-10 semblen jugar un paper neuroprotector (Zhu et al., 2002; Spera et al., 1998).

La IL-1 és una citocina proinflamatòria que es sobreexpressa després d'un episodi isquèmic, permanent o transitori, en la regió infartada. Els efectes induïts per la IL-1 inclouen febre, augment del ritme cardíac i de la pressió arterial, l'augment del dany induït per l'activació de receptors, la proliferació microglial, alliberació d'àcid araquidònic, i l'estimulació de la NOS. No obstant, les funcions més reconegudes de la IL-1 semblen ser la inducció de l'expressió de molècules d'adhesió en l'endoteli vascular com la E-selectina, les molècules d'adhesió cel·lular ICAM-1 i ICAM-2, i la mol·lècula d'adhesió vascular VCAM-1. Totes elles contribueixen a promoure la infiltració de neutròfils en el teixit.

La IL-1 existeix en dues formes diferents ( $\alpha$  i  $\beta$ ) que actuen unint-se a receptors específics de membrana. Existeixen dos receptors principals de la IL-1, els receptors de la IL-1 de tipus I i de tipus II. El receptor de tipus I s'expressa en la superfície de la membrana de diversos tipus cel·lulars i s'uneix a la IL-1 $\alpha$  i la IL-1 $\beta$  amb afinitat

similar. El receptor de tipus II es troba a la superfície de les cèl·lules B, neutròfils i macròfags i mostra major afinitat per la IL-1 $\beta$ . La regulació dels dos receptors en la isquèmia cerebral és diferent, de forma que podrien jugar un paper independent.

El TNF- $\alpha$  està considerat també com a citocina proinflamatòria. S'han observat augments en la expressió de TNF- $\alpha$  en la isquèmia cerebral. També s'han descrit nivells elevats de TNF- $\alpha$  plasmàtic en pacients d'ictus, en comparació amb individus sans. El TNF- $\alpha$  indueix l'expressió de molècules d'adhesió en les cèl·lules glials i endotelials com la ICAM-1, la VCAM-1 i la E-selectina, afavorint l'adherència dels neutròfils i la seva acumulació en la microvasculatura cerebral. L'acció de TNF- $\alpha$  també provoca alteracions en la barrera BHE, així com l'activació de les cèl·lules glials, en el marc d'un procés de reparació i remodelació en resposta a la isquèmia.

La IL-6 també està considerada com a citocina proinflamatòria. Joga un paper central en les respostes inflamatòries agudes i cròniques, i s'expressa en resposta a diverses formes de lesió cerebral, entre elles la isquèmia cerebral. Els nivells de la IL-6 són elevats poques hores després de l'episodi isquèmic, i es mantenen elevats durant la fase subaguda de l'ictus. També s'han trobat nivells elevats de la IL-6 en el plasma dels pacients d'ictus, i es considera un marcador de mal pronòstic (Vila et al., 2001). D'altra banda s'ha demostrat que la IL-6 indueix l'expressió del gen de la PLA<sub>2</sub>, i en conseqüència, estimula la producció de leucotriens, prostaglandines i del factor activador de plaquetes (PAF), que estan involucrats en el dany cerebral isquèmic. No obstant, també s'han observat efectes antiinflamatoris en el mecanisme d'acció de la IL-6, a través d'un mecanisme de retroalimentació negativa, estimulants la producció de l'antagonista del receptor d'IL-1 (IL1RA), i de l'antagonista del receptor soluble de TNF- $\alpha$ , que inhibeixen les seves respectives accions. Fins hi tot s'ha demostrat que l'administració intracerebral de l'IL-6 té efectes protectors en la isquèmia cerebral (Loddick et al., 1998).

El TGF- $\beta$  és una citocina antiinflamatòria. Regula la proliferació i diferenciació cel·lulars i juga un paper central en els mecanismes de reparació tissular. S'observa un augment de la seva expressió hores després d'un episodi isquèmic, sobretot en la zona de penombra. El seu paper antiinflamatori en la isquèmia cerebral se li atribueix per diverses raons com ara la reducció dels neutròfils adherits a les cèl·lules endotelials de la regió infartada, la reducció en l'alliberament de ROS i RNS generades principalment

per l'acció de macròfags durant la resposta inflamatòria, la promoció de l'angiogènesi en la zona de penombra isquèmica i la reducció en l'expressió i l'eficàcia d'altres citocines com el TNF- $\alpha$ , possiblement mitjançant el bloqueig de la cinasa p38 i la conseqüent inhibició del mecanisme de transducció del TNF- $\alpha$ .

La IL-10 està considerada també com a citocina antiinflamatòria. Els seus efectes antiinflamatoris més importants són la inhibició de la producció de citocines inflamatòries com IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-12 (Moore et al., 2001) i la inhibició de l'expressió del receptor d'immunitat innata TLR4 (del anglès *Toll-like receptor*) (Muzio et al., 2000). Diferents estudis han demostrat que la IL-10 protegeix el cervell contra els danys inflamatoris induïts pel LPS (Lynch et al., 2004) o la isquèmia (Spera et al. 1998), i s'ha observat que nivells baixos de IL-10 en el plasma de pacients s'associa a un mal pronòstic (Vila et al., 2003).

## Quimiocines

---

Les quimiocines són una família creixent de pèptids de baix pes molecular, que es secreten i juguen un paper essencial en la comunicació intercel·lular i en la resposta inflamatòria. Són responsables de la quimiotaxis i de l'aproximació de les cèl·lules immunitàries perifèriques des de zones allunyades al punt d'inflamació. Es produeixen en diversos teixits, incloent el cervell, i operen activant cinases intracel·lulars mitjançant la interacció amb receptors de membrana específics acoblats a proteïna-G (Bajetto et al, 2001). Després d'una lesió isquèmica s'observa un augment en l'expressió de quimiocines en el cervell i en el plasma (Chen et al, 2003). Les quimiocines més destacades són la *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) i la *macrophage inflammatory protein 1 alpha* (MIP-1 $\alpha$ ). D'acord amb el seu paper perjudicial, la inhibició d'aquestes quimiocines s'associa amb una disminució del dany (Garau et al, 2005), mentre la sobreexpressió de MCP-1 en el cervell potencia el dany isquèmic i incrementa la infiltració de cèl·lules inflamatòries (Chen et al, 2003).

A més de les seves propietats quimiotàctiques, algunes quimiocines afecten directament la permeabilitat de la BHE. S'ha observat que la MCP-1 incrementa la permeabilitat de la BHE en models *in vitro*, i altera les unions estretes, suggerint que la MCP-1 podria actuar "obrint" la BHE (Stamatovic et al, 2005). La MCP-1 és secretada per astròcits i



micròglia activada (macròfags), mentre que la MIP-1 s'expressa preferentment en cèl·lules de la micròglia activades (macròfags). Els limfòcits activats també expressen quimiocines (MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4) i incrementen l'expressió d'altres quimiocines (RANTES/CCL5, IP-10/CXCL10, MIP-1 $\beta$ /CCL4) en astròcits i macròfags perivasculars (Karpus et al, 1999).

---

## Molècules d'adhesió

---

Les molècules d'adhesió juguen un paper important en la infiltració leucocitària del territori isquèmic. La interacció entre leucòcits i les cèl·lules de l'endoteli vascular està mediada per tres grups de molècules d'adhesió diferents: les selectines, la superfamília de les immunoglobulines i les integrines.

---

### Selectines

---

Les selectines són una família de glicoproteïnes de membrana tipus I calci dependents, formada per tres membres que s'anomenen segons la seva localització majoritària: la L-selectina, que s'expressa en la membrana de leucòcits de forma constitutiva i augmenta la seva expressió enfront a l'activació cel·lular; la E-selectina, que s'expressa en cèl·lules endotelials, es sintetitzen en resposta a l'activació cel·lular; i la P-selectina, que s'expressa majoritàriament en plaquetes però també en cèl·lules endotelials. El lligand principal de la P-selectina és el carbohidrat *P-selectin glycoprotein ligand 1* o PSGL-1, que s'expressa en leucòcits, aquest té elevada afinitat per la P-selectina, tot i que també pot unir-se a les selectines L i E amb menor afinitat.

En el cas de les selectines P- i E-, determinats estímuls proinflamatoris com les citocines IL-1 i TNF- $\alpha$ , també promouen la seva expressió. Aquesta interacció promou activació cel·lular, mobilització d'integrines, inflamació i trombosi (Kim., 1996). Les selectines P i E són les principals responsables del reclutament de leucòcits en el teixit infartat. S'ha observat un augment de la seva expressió després d'un episodi isquèmic associat a una major infiltració leucocitària.

## La superfamília de les immunoglobulines

El pas de leucòcits al teixit infartat a través dels espais intercel·lulars de l'endoteli vascular està mediat per les interaccions entre integrines i molècules de la superfamília de les immunoglobulines, amb els seus respectius lligands.

Les immunoglobulines són glicoproteïnes de membrana involucrades en processos de reconeixement, unió o adhesió cel·lulars. Existeixen cinc membres de la superfamília de les immunoglobulines que actuen com a molècules d'adhesió.

Les molècules d'adhesió intercel·lulars (ICAM) que intervenen en el reforçament de l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli vascular per mitjà de la formació de ponts d'unió amb integrines. Entre els seus lligands destaquen les integrines  $\beta 2$  específica de leucòcits.

La molècula d'adhesió vascular 1 (VCAM-1), s'indueix en cèl·lules endotelials activades, i augmenta la seva expressió en resposta a TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ . Interactua amb la integrina  $\alpha 4\beta 1$  o *very late antigen 4* (VLA-4), i juga un paper important en el reclutament i tràfic de limfòcits al lloc de la inflamació. També pot expressar-se en macròfags tissulars, cèl·lules dendrítiques i fibroblasts de la medul·la òssia.

PECAM-1 està involucrada en la interacció entre cèl·lules endotelials i en la transmigració leucocitària a través de l'endoteli, i per tant és important pel procés de infiltració leucocitària.

La molècula d'adhesió cel·lular de la mucosa vascular 1 (MAd CAM-1). S'expressa en cèl·lules limfoides i mieloides immadures, i interacciona amb a L-selectina i amb L-PAM-1 ( $\alpha 4\beta 7$ ).

ICAM-1 i VCAM-1, són els membres del grup que s'ha vist estan involucrats en la resposta inflamatòria postisquèmica (Blann et al., 1999). Així doncs, s'ha vist un augment en la expressió de expressió de ICAM-1 i VCAM-1 abans de la infiltració leucocitària que es dona durant la reperfusió del teixit infartat. A més, s'ha vist que la seva sobreexpressió s'associa a un augment del dany isquèmic cerebral (Wang i Feuerstein, 1995). Malgrat això, en models animals d'isquèmia/reperfusió s'ha demostrat que el bloqueig de VCAM-1 no té efectes protectors (Justícia et al., 2007),

mentre que si que els té el bloqueig de ICAM-1 (Zhang et al., 1994) i els animals deficientes en ICAM-1 tenen volums d'infart cerebral més petits (Soriano et al., 1996). Malgrat això, l'assaig clínic amb un anticòs anti-ICAM-1 (enlimomab) va haver de ser discontinuat per efectes adversos greus (*Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators, 2001*).

## Integrines

Les integrines són heterodímers formats per glicoproteïnes transmembrana de tipus I. Estan formades per dues subunitats, una subunitat  $\alpha$  i una subunitat  $\beta$ , unides de forma no covalent. Les combinacions específiques de les subunitats  $\alpha\beta$  determinen l'activitat d'unió als lligands i diferents funcions de senyalització. En mamífers, les integrines estan constituïdes per 18 tipus de subunitats  $\alpha$  i 8 tipus de subunitats  $\beta$  i es classifiquen en diferents subfamília segons la subunitat  $\beta$ . Les Integrines de la subfamília  $\beta_2$  (CD18), s'expressen en leucòcits, i tenen un paper fonamental en l'adhesió i transmigració leucocitària. Els membres més destacats d'aquesta subfamília són les integrines *leukocyte function-associated molecule* (LFA)-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ) i *macrophage-1* (Mac-1) *antigen* ( $\alpha_M\beta_2$ ).

La subfamília  $\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$  de les integrines també s'expressa en leucòcits, i interacciona amb VCAM-1. Aquesta interacció és també important en processos d'extravasació de leucòcits i en nombrosos processos immunològics i inflamatoris. Es requereixen senyals d'activació per induir una unió forta de  $\alpha_4\beta_1$  a VCAM-1. Malgrat tot, la integrina  $\alpha_4\beta_1$  en estat inactivat pot fer de medidora en unions amb VCAM-1 i és la responsable del rodament (*rolling*) de leucòcits sobre cèl·lules endotelials activades.

## La immunitat innata en la Isquèmia/Reperfusió

El sistema immunitari és un conjunt de proteïnes, cèl·lules, òrgans i teixits, que funcionen conjuntament amb l'objectiu d'evitar l'entrada de microorganismes o toxines

que poden actuar com a agents patògens, i de generar una resposta contra aquests agents.

La primera barrera defensiva de l'organisme és un impediment fisiològic passiu a l'entrada de microorganismes patògens, format per la pell, les glàndules sudorípares, les cèl·lules de Langerhans, el pH àcid de l'estómac, etc. No obstant, si aquesta primera barrera és superada, el sistema immunitari activarà una sèrie de mecanismes que intentaran reconèixer i neutralitzar aquests agents patògens. El sistema immune però, també respon a altres estímuls en absència d'infecció. Actualment es pensa que el dany tissular agut genera senyals d'alarma que activen el sistema immunològic (Gallucci i Matzinger, 2001), i com veurem més endavant aquestes respostes es pensa poden intervenir en el dany cerebral després de la isquèmia.

El sistema immunitari es divideix en immunitat innata o natural i immunitat adquirida o adaptativa. La immunitat innata és la primera línia de defensa immunològica, està formada pel sistema del complement i els leucòcits del sistema immune innat, on trobem fagòcits (macròfags, neutròfils i cèl·lules dendrítiques), mastòcits, eosinòfils, basòfils i cèl·lules *natural killer* (NK). Aquestes cèl·lules tenen la capacitat d'identificar estructures moleculars, altament conservades, que són comuns en determinats tipus de microorganismes patogènics, i que reben el nom de patrons moleculars associats a patògens o PAMPs. Per a reconèixer aquests patrons moleculars, existeixen tota una sèrie de receptors anomenats receptores de patrons de reconeixement o PRRs. Un dels membres més importants dins del grup de receptors PRRs és la família de receptors "Toll-like" (TLR), que es descriuen més endavant. La resposta immunitària adaptativa és específica per cada antígen i requereix el reconeixement d'antígens específics durant un procés anomenat presentació d'antigen. El reconeixement de l'especificitat de l'antigen permet generar respostes més eficients per a cada patògen o cèl·lula infectada.

El SNC es troba protegit del medi que l'envolta, gràcies a la presència de la BHE i de la manca de drenatge limfàtic. No obstant, les infeccions en el SNC són possibles i això posa de manifest la necessitat de que cèl·lules residents del sistema nerviós central també siguin capaces d'iniciar una resposta immune innata enfront d'una infecció, fins que les cèl·lules de la perifèria del sistema immune innat i adaptatiu siguin reclutades.

Les cèl·lules de la micròglia són els macròfags residents del SNC i actuen com a sentinelles en el cervell (Aloisi, 2001; Bsibsi et al., 2002; Olson & Miller, 2004). No

obstant, altres cèl·lules pròpies del SNC com els astròcits, també presenten receptors PRRs, i amb els anys, nombrosos estudis han demostrat que juguen un paper essencial en l'activació del sistema immune innat en el SNC (McKimmie i Fazakerley, 2005). Estudis recents també han demostrat la presència de receptors TLR en neurones i oligodendròcits (Bsibsi et al., 2002; Prehaud et al., 2005), tot i que s'està estudiant quin és el seu paper en la resposta immune en el SNC.

## ELS Receptors *Toll-Like*

Els receptors Toll-like són una família de glicoproteïnes de membrana de tipus I. Tenen un domini C-terminal molt similar al domini intracel·lular del receptor de la Interleucina 1 (IL-1), d'aquí el seu nom “*Toll/IL-1 receptor (TIR) domain*” o TIR. Aquest domini reclutarà diverses proteïnes adaptadores que iniciaran diferents cascades de senyalització. El domini extracel·lular N-terminal conté entre 16 i 28 repeticions de Leucina (LRR: *Leucine rich repeats*), i cada repetició conté entre 20 i 30 aminoàcids amb un motiu “LxxLxLxxN”, altament conservat. Aquests dominis LRR són els que confereixen a cada receptor TLR la seva especificitat a determinats lligands.

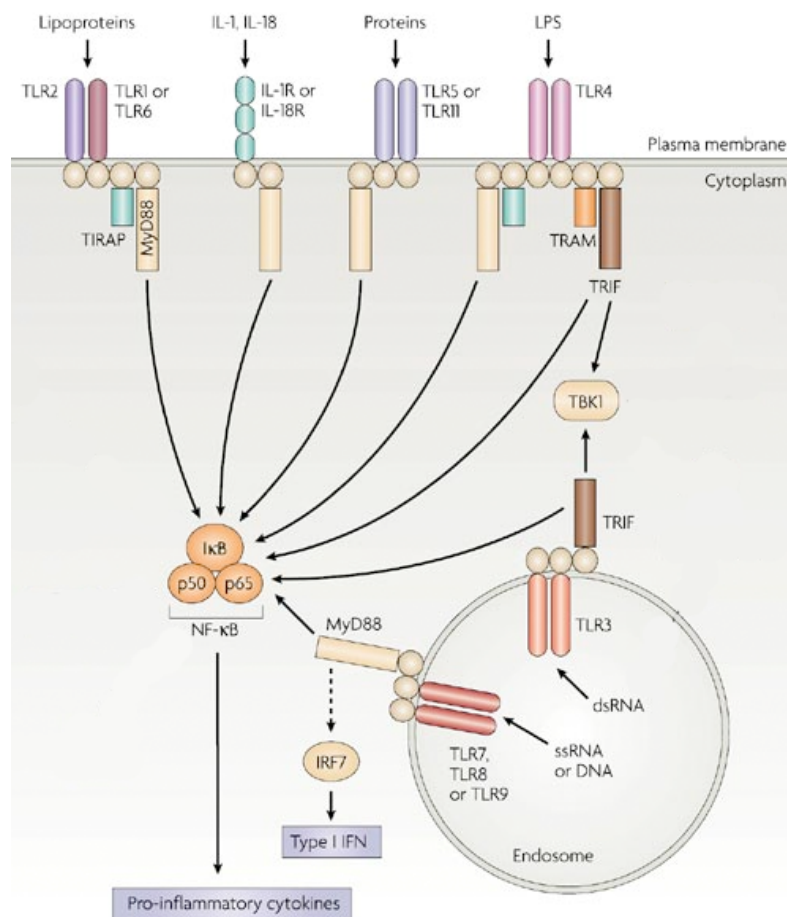


Figura I4. Receptors TLRs (Trinchieri i Sher et al., 2007).

El primer receptor Toll es va identificar en *Drosophila sp.* com a un component de la senyalització intracel·lular que controlava la polaritat dorsoventral en els estadis inicials del seu desenvolupament. Posteriorment es va veure que també estava implicat en la resposta immunitària (Lemaitre et al., 1996), i es van trobar homòlegs d'aquests receptors en mamífers (Medzhitov i Janeway 1997). Actualment es coneixen un total de 12 TLRs, 10 receptors en humans (TLR 1-10) i 12 receptors en ratolí (TLR1-9 i TLR11-12).

Segons la seva seqüència aminoacídica, podem classificar els membres de la família de receptors TLRs en cinc subfamílies:

La subfamília TLR-2, formada pels membres TLR-1, TLR-2, TLR-6 i TLR-10, reconeixen lipoproteïnes, lipopèptids i proteoglicans de la paret dels bacteris Gram positius majoritàriament, així com lipoproteïnes i lipopèptids de la membrana plasmàtica de *Mycoplasma sp.*

La subfamília TLR-3, té un únic membre. TLR-3 reconeix RNA viral de doble cadena (dsRNA) que es genera en aquelles cèl·lules que han estat infectades per determinats virus.

La subfamília TLR-5, formada pels membres TLR-5 i TLR-11, reconeixen molècules proteïques. Concretament, TLR5 reconeix components del flagel bacterià com la flagelina.

La subfamília TLR-9, formada pels membres TLR-7, TLR-8 i TLR-9, que reconeixen àcids nucleics. L'ADN bacterià i l'ADN víric, contenen nombroses repeticions de motius CpG no metilades, aquestes seqüències actuen com a PAMPs per determinats TLRs com el TLR9; els receptors TLR-7 i TLR-8, (molt similars a TLR-9) reconeixen ARN viral de cadena senzilla (ssRNA), així com compostos antivirals sintètics, com els derivats de la Imidazoquinolina.

I finalment la subfamília TLR-4, també amb un únic representant, reconeix el Lipopolisacàrid bacterià (LPS), que és un component essencial de la membrana externa de bacteris Gram-negatius.

La seva localització cel·lular és diferent segons el receptor, així els receptors TLRs 1, 2, 4, 5, 6 i 11 són receptors de membrana plasmàtica majoritàriament, i interaccionen amb PAMPs que entren en contacte amb la cèl·lula. La localització dels receptors TLRs 3, 7, 8, i 9 és intracel·lular, es troben a la membrana d'endosomes, lisosomes i reticle endoplasmàtic. El seu domini N-terminal queda exposat cap a l'interior d'aquests orgànuls, d'aquesta manera, després de que aquests orgànuls hagin degradat total o parcialment els organismes patògens, prèviament internalitzats per endocitosi, aquests receptors poden reconèixer ADN i ARN bacterià o viral.

## Receptor TLR4 i vies de senyalització

---

El receptor TLR-4 requereix de proteïnes addicionals per a poder reconèixer el LPS, que és el seu lligand més típic.

La proteïna de diferenciació mieloide (MD-2) és necessària pel reconeixement del LPS per part dels TLR-4, però també és indispensable per a la seva distribució cel·lular. La proteïna MD-2 és una glicoproteïna que s'uneix al receptor TLR-4 en el reticle endoplasmàtic (RE). El complex TLR-4/MD2 és després conduït a la membrana cel·lular. S'ha observat que animals deficients per la proteïna MD-2, presenten una resposta al tractament amb LPS similar a la que presenten els animals deficients en TLR-4, i també s'ha vist que en aquests animals el receptor TLR-4 queda retingut en l'Aparell de Golgi i no és transportat a la membrana de la cèl·lula.

La proteïna d'unió a LPS o (LBP), és una proteïna soluble present en el sèrum. El LPS ha d'estar unit a aquesta proteïna per a ser reconegut pel receptor TLR-4.

La proteïna CD14, és una glicoproteïna que es pot trobar en forma soluble en el plasma o bé unida a la membrana cel·lular a través d'una cua fosfatidilinositol. Aquesta proteïna s'uniria al complex LPS:LBP.

Tant la proteïna LBP, com CD14 tenen motius rics en repeticions de leucina a través dels quals s'unirien al complex TLR4:MD-2. El complex TLR4/MD-2:LPS/LBP/CD14 activa el receptor TLR-4, que dimeritza i activa dues vies de senyalització diferents a



través del reclutament de proteïnes adaptadores, la via dependent de la proteïna adaptadora *myeloid differentiation primary-response protein 88* (MyD88), i la via dependent de la proteïna adaptadora *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF). Aquestes vies de senyalització que descriurem a continuació es coneixen fonamentalment per la informació obtinguda en línies cel·lulars i en monòcits o macròfags tractats amb l'activador clàssic de TLR-4, que és el LPS. No obstant, com veurem més endavant, hi ha evidències experimentals que suggereixen que la senyalització podria ser dependent del tipus cel·lular, i aquest serà un punt que investigarem en aquesta tesi.

---

### Via dependent de la proteïna adaptadora MyD88

---

La proteïna adaptadora MyD88 s'associa a tots els TLRs excepte TLR-3. Aquesta proteïna té dos dominis: un domini *toll-interleukin 1 receptor* (TIR) C-terminal, que és el responsable de la interacció amb el domini TIR dels TLR; i un domini *death domain* (DD) N-terminal, responsable de la interacció de MyD88 amb diferents membres de la família de proteïnes adaptadores *IL-1 receptor associated kinase* (IRAK).

La proteïna *TIR domain containing adaptor protein* (TIRAP) també anomenada *MyD88 adapter protein* (MAL) és també una proteïna adaptadora que es troba unida a fosfatidil inositol-4, 5-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>) de la membrana cel·lular, i que fa de pont entre la proteïna MyD88 i el receptor TLR-4. A diferència de MyD88, TIRAP/MAL no és indispensable per a la senyalització però actua atraient a MyD88 a la membrana, facilitant així la interacció de MyD88 amb el domini TIR del receptor TLR4.

Existeixen quatre proteïnes IRAK diferents (IRAK 1,2,4 i IRAK-M) identificades en mamífers, però són les proteïnes IRAK-1, 2 i IRAK-4 les proteïnes involucrades en la senyalització de TLR-4 per la via dependent de MyD88. Aquestes proteïnes posseeixen dos dominis, un domini de mort (DD) N-terminal, i un domini central amb activitat serina/treonina cinasa. IRAK-4 s'uneix a MyD88 gràcies a la interacció entre els dominis DD d'IRAK-4 i el domini intern de MyD88. Aleshores IRAK-4 fosforila a IRAK-1 i IRAK-2, gràcies a la seva activitat cinasa. IRAK-1 s'autofosforilarà fins estar totalment activada. En aquest moment IRAK-1/2 és dissocien del complex TLR-4/MyD88/IRAK-4 per unir-se a TRAF-6 seguint amb la via de senyalització.

Un cop associat, TRAF-6 interacciona amb l'enzim conjugador a ubiquitina E2, variant 1 (Uev1A) i l'enzim conjugador a ubiquitina E3 (UbcE3), que poliubiquitinaran a TRAF-6, permetent que interaccioni amb altres proteïnes. El complex Uev1A/UbcE3/TRAF-6 interacciona amb el complex proteic format per TAK-1 i les proteïnes d'unió a TAK-1 i a TAB 2-3.

TAK-1 és aleshores ubiquitinat i s'activa, fosforilant al complex proteic IKK, format per les subunitats catalítiques IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ , i per la subunitat reguladora IKK $\gamma$  o NEMO (*NF $\kappa$ B essential modulator*), que també seran ubiquitinades. Les IKKs actives fosforilen a l'inhibidor de NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B, provocant la seva poliubiquitinació i degradació via proteasoma. Mentre I $\kappa$ B es troba unit a NF $\kappa$ B manté inactiu a aquest factor de transcripció. No obstant, quan I $\kappa$ B es dissocia del complex, NF $\kappa$ B queda lliure i actiu, permetent la seva translocació al nucli de la cèl·lula i la transcripció de gens de resposta inflamatòria, com per exemple TNF- $\alpha$  i IL-6. TAK-1 també interacciona amb la via de les MAPKs per mitjà de la fosforilació d'alguns dels seus membres, com la proteïna MKK6, que activarà les proteïnes cinasa JNK; i MKK3 i MKK7, que activaran a p38. Al seu torn, JNK i p38 activaran el factor de transcripció activador de la proteïna 1, AP-1 (*activator protein 1*).

Així doncs, la via dependent de MyD88 activada com a resultat de la interacció TLR-4/LPS portarà a una activació immediata dels factors de transcripció NF $\kappa$ B i AP-1, i per tant, a un augment en l'expressió de gens proinflamatoris sota el seu control. Alguns d'aquests gens jugaran també un paper fonamental en la modulació de la transcripció dependent de NF $\kappa$ B. Aquests inclouen la proteïna I $\kappa$ B $\zeta$ , que funciona com un coactivador induïble de la subunitat p50 de NF $\kappa$ B, facilitant així la inducció de IL-6 i IL-12p40 (Yamamoto et al., 2004); C/EBP $\delta$ , que actua amb NF $\kappa$ B potenciant la producció de IL-6 (Litvak et al., 2009); I $\kappa$ B-NS, que suprimeix la inducció de IL-6 i del factor de necrosi tumoral (TNF) modulant l'activitat d'unió a l'ADN de la subunitat p65 de NF $\kappa$ B (Kuwata et al., 2006), i ATF3, que restringeix l'activitat de NF $\kappa$ B mitjançant el reclutament de histones acetiltransferasa (Gilchrist et al., 2006).

---

## Via dependent de la proteïna adaptadora TRIF

---

El receptor TLR4 promou també l'activació de la via dependent de la proteïna adaptadora TRIF, també anomenada via independent de MyD88. S'havia observat que animals *knock-out* per MyD88 presentaven una activació retardada de NFκB en resposta al LPS, i que animals dobles *knock-out* per MyD88 i TRIF no mostraven cap resposta a l'activació de TLR-4 per LPS, evidenciant així que TRIF era un dels responsables implicats en la activació retardada de NFκB, i per tant un dels components de la via independent de MyD88 (Hirotsu et al., 2005).

La interacció del receptor TLR4 amb TRIF requereix la presència de la proteïna adaptadora *TIR domain-containing adaptor, TRIF-related adaptor molecule* (TRAM). Estudis recents han demostrat que l'activació de la via dependent de TRIF requereix la internalització prèvia del complex CD14/TLR4/MD2 a endosomes, a través d'un procés d'endocitosi dependent de dinamina (Tanimura et al., 2008). La interacció LPS/TLR4/MD2 provoca el reclutament de la proteïna adaptadora TIRAP/MyD88, en regions de la membrana plasmàtica riques en PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> també anomenades *lipid rafts*, iniciant la via de senyalització dependent de MyD88. Posteriorment, la interacció LPS/TLR4/MD2/CD14 provoca la internalització del receptor TLR-4 per endocitosi. Això fa que la proporció de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> de la membrana endosomal disminueixi, i el complex TIRAP/MyD88 perdi afinitat, permetent la interacció de TLR-4 amb la proteïna adaptadora TRAM, que té un domini de localització subcel·lular essencial per a la seva localització endosomal, i amb la proteïna TRIF, iniciant la cascada de senyalització.

Després de l'activació del receptor, la proteïna TRIF interacciona amb les proteïnes TRAF3 i TRAF6 a través de motius d'unió a TRAF que es troben en la seva regió N-terminal. TRIF també conté un motiu d'unió a la proteïna *receptor-interacting protein* (RIP1) en la regió C-terminal.

La interacció amb TRAF6 comporta la formació del complex Uev1A/UbcE3/TRAF-6 i a l'activació de NFκB igual que en la via dependent de MyD88.

La interacció amb TRAF3, unida a les proteïnes *NAK-associated protein 1* (NAP1) i *TBK1 adaptor* (SINTBAD), comportarà l'activació de dues proteïnes cinases TBK-1, i

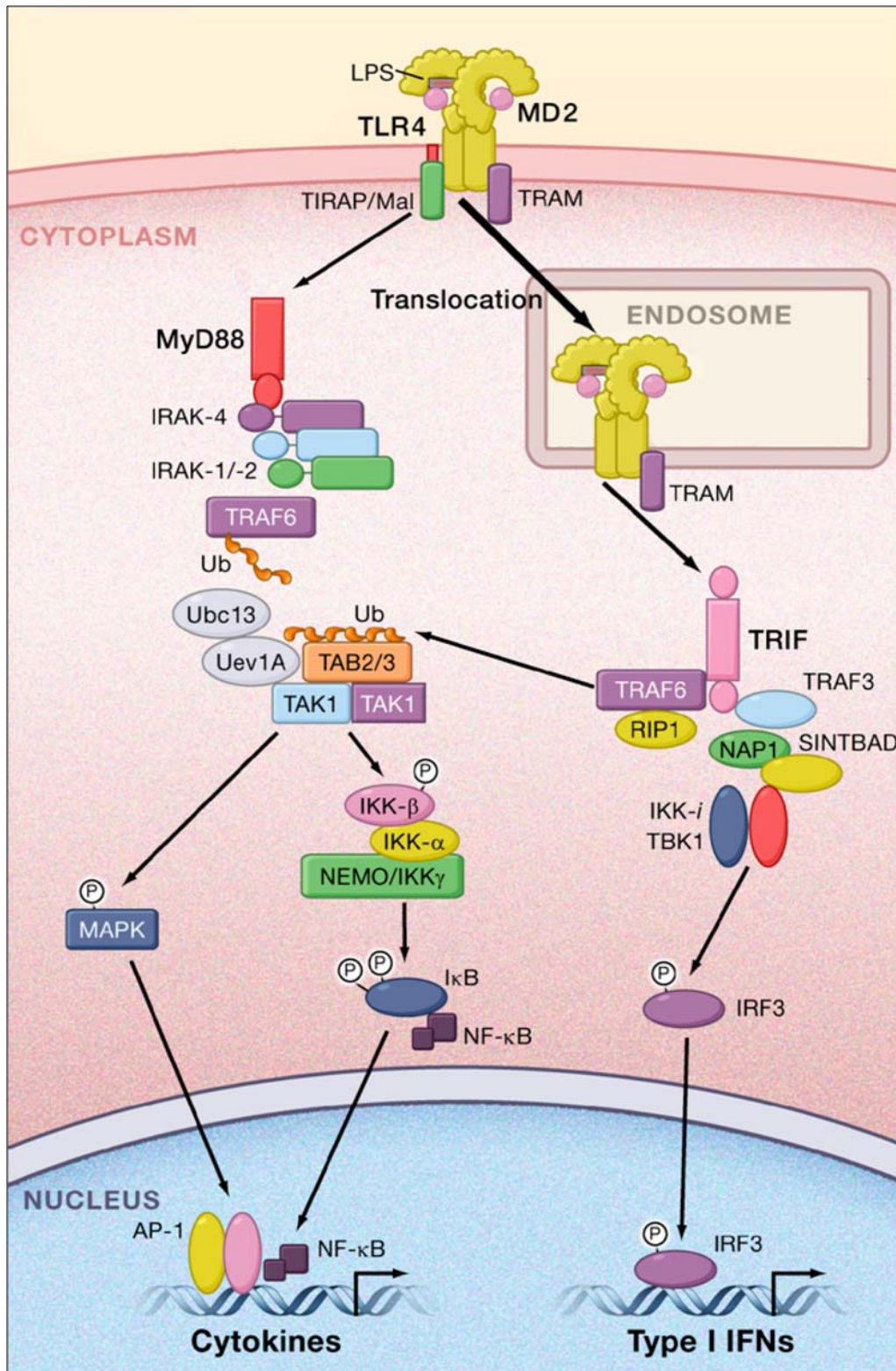


Figura I5. Senyalització del receptor TLR-4 (adaptat Takeuchi i Akira, 2010).

la seva homòloga IKK $\epsilon$  (Hacker et al., 2006), que fosforilen al factor de transcripció IRF3 activant-lo. IRF3 dimeritza i passa al nucli, on s'uneix a seqüències IRSE, activant l'expressió d'interferó de tipus I (IFN), com els IFN- $\alpha$  i - $\beta$ . IKK- $\epsilon$  també pot fosforilar la proteïna de la família de transductors de senyals i activadors de la transcripció STAT-1 (que intervé en les respostes als IFNs) facilitant així la inducció de l'expressió de gens induïbles per IFN com *Adar1*, *Ifit3*, i *Irf7* (TenOever et al., 2007).

IRF3 pot també interaccionar amb altres proteïnes com la subunitat p65 de NF $\kappa$ B i unir-se a seqüències IRSE, i activar apoptosi, amb la intervenció de proteïnes com RIP-2, FADD i caspasa-8 (Kawai et al., 2004; Honda et al., 2005; Uematsu et al., 2005). Un estudi recent també ha identificat un enzim ubiquitina lligasa E2, Ubc5, com a molècula necessària per a l'activació de IRF3 (Zeng et al., 2009).

## Paper dels TLRs en la isquèmia/reperfusió

---

La resposta inflamatòria juga un paper crucial en les lesions cerebrals isquèmiques i en la mort neuronal (Arumugam et al., 2005 i 2007; Ishikawa et al., 2005). La capacitat dels TLRs per induir una resposta inflamatòria en les cèl·lules immunes suggereix la seva implicació en la resposta inflamatòria i en el dany isquèmic al cervell. Així mateix, el fet que cèl·lules residents del SNC, i que no pertanyen al sistema immunitari, presentin també aquests receptors emfatitza la seva importància en la modulació de la resposta immune innata en el cervell (figura 6).

Les cèl·lules de la micròglia expressen tots els receptors Toll coneguts fins el moment, tant en ratolins (Olson et al., 2004) com en humans (Bsibsi et al., 2002). Les cèl·lules astrocitàries també presenten diversos receptors TLRs, els TLRs 1-7, 9 i 10, que es poden detectar en els cultius d'astròcits primaris humans (Jack et al., 2005), i en cultius d'astròcits murins, on la seva estimulació promou l'expressió i alliberació de citocines proinflamatòries (Bowman et al., 2003).

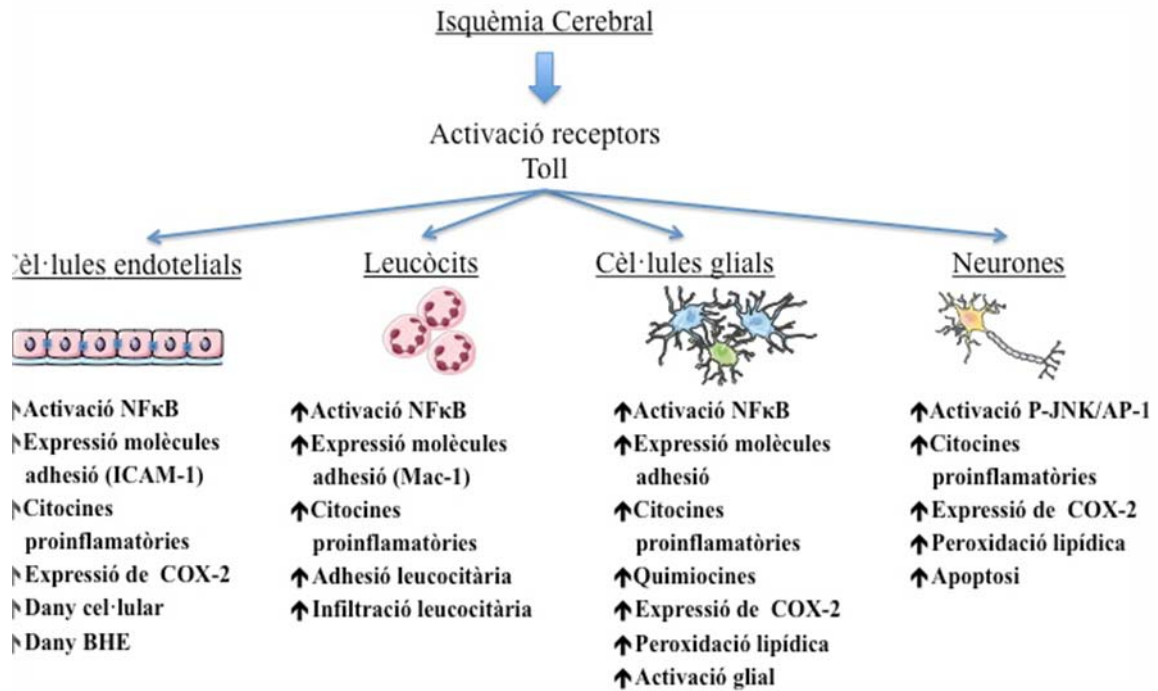


Figura 6. Paper dels TLRs en la patogenicitat de la isquèmia cerebral (adaptat Arumugam et al., 2009).

En comparació amb altres tipus cel·lulars, es coneix molt poc sobre l'expressió i funció dels TLR en oligodendròcits. Diversos estudis demostren l'expressió del receptor TLR-2 en oligodendròcits (Bsibsi et al., 2002; Lehnardt et al., 2006), i suggereixen que l'activació d'aquest receptor està implicada en la reparació del sistema nerviós central.

Pel que fa a l'expressió neuronal de receptors TLRs, s'ha incrementat el nombre de treballs que suggereixen que aquesta família de receptors juguen un paper en processos, fisiològics i patològics (Tang et al., 2008; Stevens et al., 2008; Ziegler et al., 2007).

## Lligands endògens dels receptors TLRs

Diferents treballs realitzats en *Drosophila* havien establert que determinats lligands endògens podien activar receptors TLR, i que aquesta activació era necessària per al seu desenvolupament embrionari (Stein et al., 1991). Posteriorment es va demostrar que molts aquests lligands endògens s'alliberen en el context d'una lesió i poden provocar fenòmens d'inflamació (Akira et al., 2001; Karanth et al., 2006), regulant la producció i

l'alliberació de citocines i quimiocines, i l'activació i reclutament de cèl·lules immunes, en el SNC (fig.7).

Les molècules endògenes associades a dany tissular que poden activar els receptors d'immunitat innata es coneixen com a DAMPs, per diferenciar-les de les PAMS que serien les molècules derivades de patògens que també activen els mateixos receptors. Alguns de les molècules que actuen com a lligands endògens del receptor TLR-4 i que s'alliberen el la isquèmia cerebral són les proteïnes de xoc tèrmic (HSP). La seva expressió es veu incrementada enfront diverses situacions d'estrès cel·lular i canvis de temperatura. Diversos estudis han suggerit que algunes HSPs, com HSP60 (mitocondrial) i HSP70 (principalment citoplasmàtica), són alliberades per cèl·lules del SNC sotmeses a la mort cel·lular necròtica o apoptòtica (Lehnardt et al., 2008), i que a nivell local poden tenir propietats immunostimulants i poden modular la inflamació a través de les seva interacció amb receptors TLRs (Asea 2008). Això fa que les HSPs estiguin en una posició idònia per iniciar la neuroinflamació després d'una lesió isquèmica.

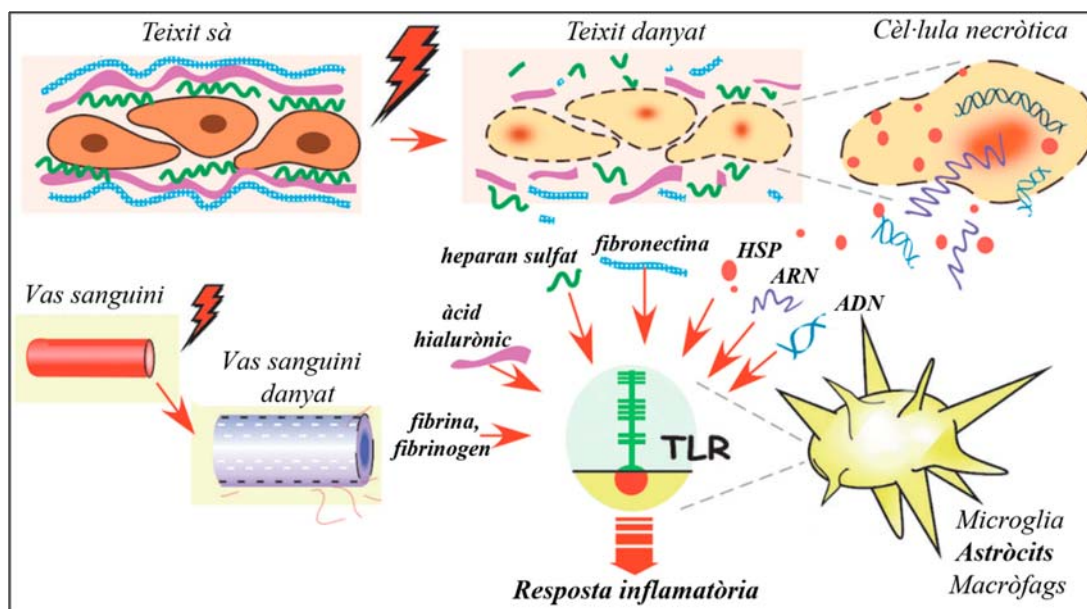


Figura 17. Activació de receptors TLR a través de lligands endògens en resposta a una lesió (adaptat Karikó et al., 2006).

No obstant les HSPs no són les úniques molècules que es comporten com a lligands endògens de receptors TLRs, diferents components de la matriu extracel·lular també es poden comportar com a tals. En la inflamació associada a lesions traumàtiques, diversos enzims proteolítics alliberen fragments de la matriu extracel·lular que en la seva forma soluble són biològicament actius. Alguns d'aquests components poden unir-se a receptors TLRs i activar la resposta immune innata (Brunn i Platt, 2006), com són l'heparan sulfat (Johnson et al, 2002, 2004.), oligosacàrids derivats d'àcid hialurònic (Jiang et al, 2005;. Termeer et al, 2002.), el domini extra A (EDA) de la fibronectina (Okamura et al., 2001), i el biglicà (Schaefer et al., 2005), entre d' altres (Piccinini i Midwood, 2010).

La mort necròtica que esdevé com a conseqüència del insult isquèmic també podria provocar una resposta immune caracteritzada per l'activació de receptors TLRs. S'ha descrit que les cèl·lules necròtiques són reconegudes pels receptors TLR2 i TLR3, però els lligands concrets encara no s'han determinat (Lee et al, 2006). L'ARN i l'ADN alliberat per cèl·lules necrosades, així com diverses proteïnes associades a l'ADN com la *DNA-binding protein high-mobility group box 1 protein* (HMGB1), també són capaces d'estimular receptors TLRs (Karikó et al., 2004; Park et al., 2006; Scaffidi et al., 2002).

## TLR4 en la isquèmia cerebral

---

Determinats lligands endògens com HSP-60, HSP-70 i HMGB1 (Kinouchi et al., 1993, Faraco et al., 2007, Lehnardt et al., 2008), poden activar TLR4 en el propi cervell, de la mateixa manera que ho faria el seu activador clàssic, el LPS (taula 2). Aquesta activació dona lloc a la generació de mediadors inflamatoris com TNF, IL-1, IL-6, i iNOS, associats al dany isquèmic.

Diversos models d'isquèmia cerebral han suggerit que l'activació del receptor TLR4 està directament relacionat amb el procés neuroinflamatori postisquèmic i amb un augment del dany. El paper patogènic dels TLR en els processos isquèmics va ser demostrat per primera vegada en un model murí de dany per isquèmia/reperfusió miocardiàca, on es va veure que els ratolins amb receptors TLR4 no funcionals



presentaven un dany isquèmic menor que els ratolins de tipus salvatge (Oyama et al., 2004).

Estudis posteriors han demostrat que ratolins deficients en TLR4 presenten una millora neurològica en diferents models d'infart cerebral (Caso et al., 2007; Hua et al., 2007), en aspectes com el volum d'infart, la funció neurològica i determinats marcadors inflamatoris (Tasaki et al 1997; Caso et al 2007).

També s'ha descrit que el LPS pot induir processos protectors de preconditionament en els que l'activació de TLR4 prèvia a la isquèmia estaria implicada en la protecció contra el dany citotòxic provocat per un accident isquèmic cerebrovascular (Tasaki et al., 1997; Rosenzweig et al., 2004; Hickey et al 2007). Aquesta protecció estaria mediada per un increment en la producció de IFN- $\beta$  (Hickey et al., 2007; Marsh et al., 2009). Per tant, aquests estudis suggereixen que una exposició prèvia a LPS, és a dir, una activació moderada del receptor, prèvia al insult isquèmic, podria modular les vies de senyalització activades pel receptor, afavorint la via antiinflamatòria TRAF/TRIF amb la producció de IFN- $\beta$ , en lloc de la via proinflamatòria del TNF- $\alpha$ .

	<b>Lligand endogen</b>	<b>Referències</b>
<b>Cèl·lules necròtiques</b>	<b>HSP60, HSP70, GP96</b>	Asea et al., 2002, Ohashi et al., 2000, Vabulas et al., 2002
<b>Components de la matriu extracel·lular</b>	<b>Fibronectina Àcid hialurònic Heparan sulfat Fibrina/fibrinogen</b>	Okamura et al., 2001 Termeer et al., 2000 Johnson et al., 2002 Smiley et al., 2001
<b>Cèl·lules del sistema immunitari</b>	<b>Defensina Elastasa</b>	Biragyn et al., 2002 Devaney et al., 2003

**Taula 12. Lligands endògens que activadors del receptor TLR-4.**

---

## Paper dels Astròcits en el SNC

---

---

### Estructura i funció de l'astroglia en el SNC

---

Les cèl·lules glials astrocitàries o astròcits, són el tipus cel·lular majoritari en el SNC. Des d'un punt de vista morfològic, podem diferenciar dos tipus majoritaris d'astròcits: els astròcits fibrosos i els astròcits protoplasmàtics. Els astròcits fibrosos tenen menys processos que els protoplasmàtics, però comparativament aquests processos són llargs i més grans. A més, els processos tenen menys branques i s'estenen simètricament al voltant del cos cel·lular. Els astròcits protoplasmàtics, per contra, tenen processos més curts però més abundants. Els astròcits protoplasmàtics es troben a la substància gris, mentre que els astròcits fibrosos es troben principalment en la substància blanca, però també a la capa cortical externa del hemisferi cerebral. Els astròcits fibrosos projecten a la superfície pial i estan involucrats en la formació de la glia limitant. Els astròcits contenen paquets citoplasmàtics de filaments intermedis (9-10 Å) que estan constituïts principalment per la proteïna GFAP, una de les proteïnes més abundants del cervell (Eng et al., 2000).

Els astròcits formen contactes especialitzats entre sí a través d'unions anomenades “*gap junction*” o unions perforants, que són unitats de comunicació intercel·lular que permeten la transferència directa de les molècules de pes molecular petit (<1kDa). La importància d'aquestes unions en estat fisiològic no es coneix amb certesa però es creu que poden estar relacionades amb el manteniment de l'homeòstasi iònica. En situacions d'estrès cel·lular, les “*gap junction*” permeten la comunicació i la transmissió directa de respostes funcionals entre els astròcits que es troben en el zona de la lesió primària fins a astròcits en regions més distals (Enkvist i McCarthy, 1992).

En un principi es pensava que el paper dels astròcits era bàsicament de suport estructural i metabòlic per a les neurones, no obstant es va veure que els astròcits eren capaços de respondre a un estímul determinat amb increments intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$ , així com d'alliberar neurotransmissors excitatoris com el Glutamat, en resposta a augments de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lulars (Haydon et al., 2006; Montana et al., 2006). Així

doncs, durant els últims vint anys s'han realitzat nombrosos estudis que han posicionat a aquest tipus cel·lular com elements del SNC que juguen un paper actiu en diferents processos tant en situacions fisiològiques com en situacions patològiques del SNC.

Els astròcits tenen una localització estratègica en el cervell, formant part de la unitat cerebrovascular, ja que els peus astrocitaris es troben envoltant a les cèl·lules endotelials de la microvasculatura i contribueixen en la funcionalitat de la BHE. També estan en contacte amb la resta de tipus cel·lulars del cervell. Com que els processos astrocitaris també envolten els espais sinàptics, estan en contacte molt proper amb les connexions sinàptiques neuronals, a més, donen suport metabòlic a les neurones. Els astròcits proporcionen substrats metabòlics energètics com el lactat i el piruvat (Anderson et al., 2003), sobretot en aquelles situacions on les neurones tenen màxima activitat. A més són capaços d'un cert emmagatzematge de la glucosa en forma de glicogen, que capten del torrent sanguini a través dels peus astrocitaris. Proporcionen intermediaris metabòlics a les neurones necessaris per a la síntesi del neurotransmissors com el glutamat i el GABA, i intermediaris metabòlics com el glutatió per a la síntesi d'enzims antioxidants. A nivell metabòlic, també actuen recollint els diferents productes de rebuig que són el resultat del metabolisme cel·lular, per a ser alliberats al torrent sanguini per a la seva degradació.

Els astròcits també formen part activa de la transmissió sinàptica, s'ha vist que presenten receptors per a determinats aminoàcids excitatoris com el glutamat i que responen a l'activació d'aquests receptors. També poden actuar modulant la transmissió sinàptica, expressen transportadors de membrana encarregats de recollir de l'espai sinàptic l'excés de neurotransmissors com el glutamat i el GABA (Haberg et al, 2001; Hertz et al., 2001; Matthias et al., 2003). A més, també s'ha observat que els astròcits alliberen ATP com a resposta a determinats estímuls, i que un cop alliberat a l'espai extracel·lular aquest és hidrolitzat a adenosina per uns enzims presents en la membrana plasmàtica, les ectonucleotidases. L'adenosina s'uneix a receptors específics de membrana que actuaran modulant la transmissió sinàptica.

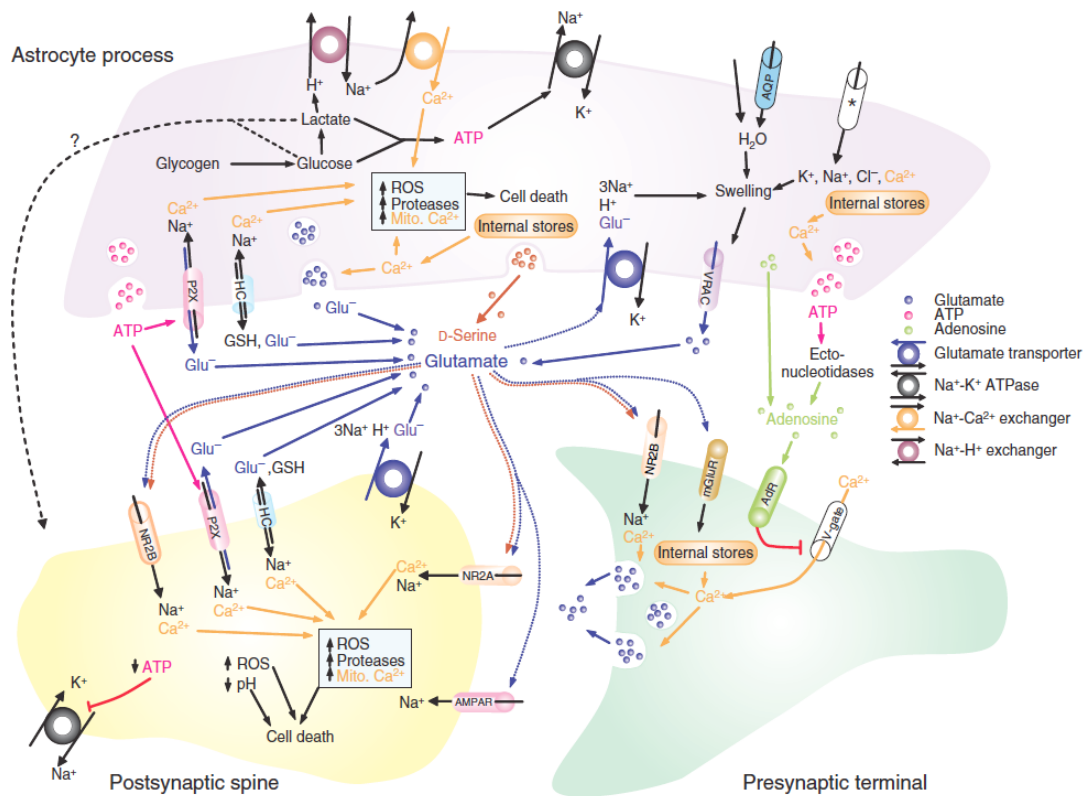


Figura 18. Paper de l'astròcit en el procés excitotòxic (Rossi et al., 2007)

Per últim, els astròcits també juguen un paper protector a diferents nivells. Actuen com a sensors del medi que els envolta i regulen la homeòstasi iònica del fluid intersticial per al correcte funcionament del teixit nerviós. Per exemple, juguen un paper essencial com a tamponadors de potassi en el medi extracel·lular. Els astròcits expressen elevades quantitats de canals de  $\text{K}^+$  a la seva membrana, incrementant la seva concentració en el medi extracel·lular si és necessari, i recaptant-lo ràpidament per a eliminar l'excés, gràcies l' elevada permeabilitat que tenen per aquest ió.

## Paper dels astròcits en la BHE i la Unitat Cerebrovascular

L' endoteli cerebrovascular, les neurones, els perícits i les cèl·lules gials (astròcits i microglia) formen una unitat funcional que es coneix com a "unitat neurovascular" (Iadecola, 2004; Zlokovic, 2008). La proximitat dels diferents tipus cel·lulars permet una comunicació paracrina efectiva necessària pel funcionament normal del SNC

(Deane i Zlokovic, 2007; Lok et al., 2007). Entre les funcions que realitzen els elements de la unitat neurovascular s'inclouen la regulació de l'acoblament hemodinàmic neurovascular, la permeabilitat microvascular, les interaccions de la matriu extracel·lular, la inactivació de neurotransmissors, l'acoblament neurotròfic, i l'acoblament angiogènic i neurogènic.

Les cèl·lules astroglials són el tipus cel·lular majoritari associat a la barrera hematoencefàlica. Els astròcits es col·loquen entre les neurones, i l'endoteli cerebrovascular, els peus perivasculars astrocitaris es troben envoltant la microvasculatura cerebral i contribueixen a la integritat de la BHE, participant en la seva estructura i funcionalitat. Poden potenciar la barrera física que és la BHE, reforçant la restricció de les unions estretes (*tight junctions*), també juguen un paper essencial en la regulació del contingut d'aigua cerebral i el metabolisme d'electròlits, en condicions normals i patològiques (Abbott et al., 2006). A més, contribueixen a la modulació de la transmissió sinàptica, i reforcen la selectivitat en el transport de substàncies, per mitjà de l'expressió de transportadors i sistemes enzimàtics altament selectius incloent aminopeptidases, endopeptidases, colinesterases, i altres. Aquests enzims formen una barrera metabòlica que modifica molècules endògenes i exògenes, que podrien afectar negativament la funció neuronal (Pardridge, 2005).

A part de la seva funció de barrera, també poden influir sobre la integritat i funcionalitat de la unitat neurovascular ja que són capaços de secretar diferents mediadors moleculars com prostaglandines (PGE), òxid nítric (NO), i àcid araquidònic (AA), que incrementen o disminueixen el diàmetre del vas sanguini cerebral, i per tant, del FSC de forma coordinada. En determinades condicions també poden secretar metal·loproteïnases (MMP) com la MMP-9, involucrades en el dany de la BHE.

La lesió per reperfussió en la isquèmia cerebral, comporta una obertura bifàsica de la BHE. Hi ha una obertura primerenca transitòria, que es dona diverses hores després de l'inici de la reperfussió i que està causada per l'activació constitutiva de l'enzim gelatinasa A (MMP-2); i una obertura tardana, de 24 a 48 hores de l'inici de la reperfussió, associada a un increment del dany en la microvasculatura cerebral i que s'associa amb l'expressió i activació de la gelatinasa B (MMP-9) i l'estromelisina-1 (MMP-3). Les MMPs també poden degradar proteïnes de la làmina basal, com la

fibronectina, la laminina, i l'heparan sulfat, entre d'altres, després d'un insult isquèmic, el que contribueix al dany de la BHE (Cheng et al., 2007; Zlokovic et al., 2006).

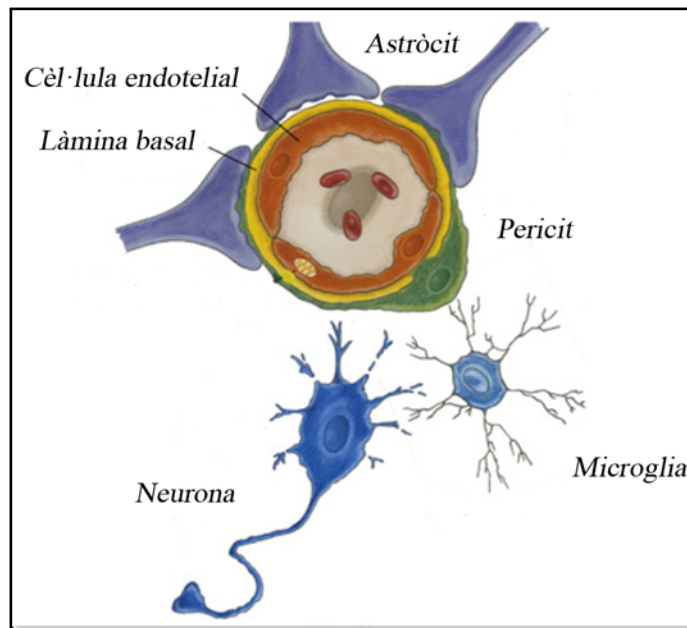


Figura 19. La Unitat neurovascular (adaptat Zlokovic et al., 2008).

## Paper dels astròcits en el procés isquèmic

---

Els astròcits estan considerats com la principal defensa antioxidant del cervell, actuant com a agents detoxificadors de ROS. Després de la isquèmia i la reperfusió cerebral, els astròcits són menys vulnerables a les ROS que les neurones pel fet de tenir nivells més elevats d'enzims antioxidants com la glutatió peroxidasa (Swanson et al, 2004). Els astròcits poden proporcionar a les neurones substrats necessaris per a la síntesi d'enzims antioxidants com el glutatió i la tioredoxina (TRX). El glutatió és necessari per la síntesi dels enzims glutatió peroxidasa i glutatió reductasa (Hertz et al., 2001; Anderson et al., 2003). L'esgotament de glutatió en els astròcits es correlaciona amb un augment de la mort neuronal causada per l'estrès oxidatiu *in vitro* (Chen et al., 2001). La tioredoxina (TRX), que és una proteïna petita capaç de modificar l'estat reduït o oxidat de diferents

molècules intracel·lulars (Morrison et al., 2004). S'indueix en les cèl·lules gials en la isquèmia cerebral “*in vivo*” (Hori et al., 1994), i s'ha vist que elimina ROS i que podria ser una molècula neuroprotectora (Chiueh et al, 2003; Masutani et al, 2004).

Els membres de la família de les metal·lotioneïnes (MT) són un altre exemple de molècules amb capacitat detoxificadora, actuen eliminant els ROS, així com alguns metalls neurotòxics com el zinc i el coure. Els membres de la família MT-I i II, s'expressen principalment en els astròcits, i són fortament induïts per la isquèmia cerebral (Trendelenburg et al., 2002; MacManus et al., 2004).

Així doncs, malgrat que els astròcits també són susceptibles a l'estrès oxidatiu després d'un episodi isquèmic, aquests són un tipus cel·lular més resistent que les neurones, i podrien jugar un paper essencial donant suport antioxidant a aquestes.

Els astròcits també difereixen de les neurones en aspectes importants que fan que siguin més resistents enfront a l'excitotoxicitat en una situació isquèmia. En primer lloc, els astròcits són capaços de mantenir nivells essencials d'ATP durant més temps que les neurones gràcies en gran part als seus reservoris de glicogen, cosa que fa que el desequilibri iònic es retardi en el temps (Xie et al., 2007). En segon lloc, els astròcits acostumen a ser més resistents a l'Excitotoxicitat induïda per glutamat degut a la menor densitat de receptors ionotòpics. D'altra banda, poden també contribuir al dany isquèmic. S'ha descrit que els astròcits poden alliberar vesícules que contenen neurotransmissors com glutamat i ATP (Haydon et al., 2006; Montana et al., 2006), en resposta a concentracions intracel·lulars elevades de  $Ca^{2+}$ , com succeeix en el cas de la isquèmia cerebral (Melani et al., 2005), i que aquesta alliberació podria influir incrementant el dany excitotòxic cel·lular. L'alliberació d'ATP per part dels astròcits és fonamental per a la propagació intercel·lular de les anomenades “onades de  $Ca^{2+}$ ”, mitjançant l'activació de receptors purinèrgics P2Y (Fam et al., 2003), aquestes onades es propagaran a les cèl·lules astrocitàries veïnes a través de les *gap junctions*. L'alliberació de l'ATP també pot provocar l'alliberació de glutamat per part dels astròcits a través de l'activació i l'obertura de receptors P2X, en particular del receptor P2X7 (Duan et al., 2003). Aquests receptors tenen una elevada permeabilitat als ió  $Ca^{2+}$ , de forma que la seva activació incrementa la concentració de calci intracel·lular provocant encara més, l'alliberació de glutamat. Els receptors P2X7 es troben presents en les membranes d'astròcits i neurones, per tant, és possible que l'ATP alliberat pels

astròcits durant la isquèmia contribueixi en el manteniment sostingut de concentracions de glutamat extracel·lular elevades. S'ha vist que el bloqueig dels receptors P2X redueix el volum del infart i millora la recuperació funcional en un model *in vivo* d'isquèmia cerebral transitòria (Lammer et al., 2006). No obstant, l'alliberació d'ATP també pot actuar inhibint la transmissió sinàptica, l'ATP alliberat pels astròcits contribueix a l'augment de l'adenosina extracel·lular que es produeix durant la isquèmia (Parkinson et al., 2004). Aquesta s'uneix a receptors específics de membrana, i suprimeix els potencials excitatoris postsinàptics evocats (EPSC), protegint així a les neurones (Rudolphi et al., 1992).

Els astròcits presenten un elevat nombre de transportadors de glutamat a la seva membrana, transportant l'excés de glutamat des de l'espai sinàptic cap al citoplasma, on és convertit en glutamina gràcies a l'acció de la glutamina sintetasa. Existeix una ampla varietat de transportadors de glutamat, els més representatius són la família de "transportadors de glutamat d'elevada afinitat al sodi", són una família de 5 membres EAAT 1-5, on el glutamat es transporta acompanyat de tres ions sodi més un protó, amb el cotransport d'un ió de potassi. L'expressió d'aquests receptors no és específica dels astròcits, però sí que són més abundants en comparació amb d'altres tipus cel·lulars com les neurones. No obstant, el col·lapse de gradient iònic provoca el funcionament invers d'aquests receptors. A més, l'acidosi i els ROS també inhibeixen el funcionament del transportadors de glutamat.

## **Paper dels astròcits en la resposta inflamatòria**

---

Els astròcits participen activament en la resposta inflamatòria que esdevé després d'un insult isquèmic, ja que tenen la capacitat d'iniciar una resposta immune innata.

Com ja he comentat, el paper principal de la immunitat innata és protegir a l'individu enfront a organismes patògens a través del reconeixement de patrons moleculars concrets (PAMPs) mitjançant receptors PRRs, que també reconeixen estructures i molècules associades a mort cel·lular (DAMPs), ja sigui per necrosi (Karikó et al., 2004) o apoptosi (Elwar et al., 2003). Existeixen diferents PRRs que s'expressen en



astròcits i que juguen un paper en l'activació de la immunitat innata en aquest tipus cel·lular.

En astròcits s'ha demostrat l'expressió de diferents receptors de la família dels TLRs, més concretament els receptors TLR 2-5 i TLR-9 *in vitro* (Carpentier et al, 2005; Bowman et al., 2003; Elwar et al., 2005), però diferents estudis han demostrat que TLR3 és el receptor predominant expressat en els astròcits (Farina et al., 2005; Jack et al., 2005; Park et al., 2006) .

El sistema del complement és un altre component important de la immunitat innata. Es compon de proteïnes solubles i de superfície, expressades en gairebé tots els tipus cel·lulars. Els astròcits reactius poden produir la major part dels factors del complement després de la seva activació i s'ha demostrat que expressen receptors com C1R, C2R, C3aR i C5aR, i molècules reguladores del complement com C1q, C1r, C1s, C2, C4, C3, factor B, factor D, C5-9, en diferents estudis *in vivo* (Gasque et al., 2000).

Els astròcits també presenten diversos receptors *Scavenger* (SR), que també intervien en el sistema immune innat. Reconeixen i internalitzen gran varietat de lligands com lípids, col·lagen i cèl·lules apoptòtiques amb la funció de mantenir l'homeòstasi del teixit (Alarcon et al., 2005).

Adicionalment, juguen un paper essencial en la neuroinflamació amb l'alliberació de diferents mediadors inflamatoris, com les quimiocines CCL2, CCL5, CCL20, CXCL10, CXCL12 CXCL1, CXCL2 i CX3CL1, i citocines IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , entre d'altres. Aquestes molècules alliberades actuen provocant l'activació de les cèl·lules veïnes amplificant la senyal inflamatòria i la resposta immune innata, i en segon lloc alterant la permeabilitat de la BHE facilitant la infiltració leucocitària en el cervell, la qual cosa comporta l'amplificació de la resposta inflamatòria local.

Finalment, hi ha indicis que fan pensar que els astròcits podrien jugar un paper com a cèl·lules presentadores d'antigen (APC). El complex major d'histocompatibilitat (MHC) classe II té un paper essencial en la inducció de la resposta immune adaptativa mitjançant la presentació d'antígens a cèl·lules CD4<sup>+</sup> *T-helper*. Les molècules MHC de classe II s'expressen normalment en APC pròpies del sistema immune innat com les cèl·lules dendrítiques, els limfòcits B, i els macròfags. No obstant, també l'expressen cèl·lules residents del SNC, els astròcits van ser el primer tipus cel·lular del SNC on es

va demostrar que expressaven MHCII, en resposta a una estimulació amb IFN- $\gamma$  *in vitro* i *in vivo* (Wong et al., 1984). Posteriorment es va veure que l'expressió era molt menor, i es produïa més tard, que en les cèl·lules de la micròglia (Vass i Lassmann, 1990). El MHC II pot ser induït o regulat per citocines com l'IFN- $\gamma$ , que sembla ser l'inductor més potent de MHC en astròcits (Soos et al., 1998), però també per neurotransmissors i neuropèptids (Dong et al., 2001; Benveniste et al., 2001).

El contacte inicial entre les APC i els limfòcits T CD4<sup>+</sup> s'inicia a través d'interaccions transitòries entre la molècula d'adhesió ICAM-1, expressada en les APC, i la integrina LFA-1, expressada en les cèl·lules T. Els astròcits són capaços d'expressar la molècula d'adhesió ICAM-1 (Aloisi et al., 1998), en resposta a l'acció de diferents citocines proinflamàtores com el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$  (Lee et al., 2000). No obstant, hi ha controvèrsia sobre la capacitat dels astròcits per actuar com a cèl·lules presentadores d'antigen, ja que no està clar que els astròcits expressin determinades molècules coestimuladores (B7-1 i B7-2 i CD40), necessàries per aquest procés. Per tant, en general, la possibilitat de que els astròcits puguin actuar com APCs no està plenament acceptada.

---

## **La ciclooxigenasa-2 en la isquèmia i en la inflamació**

---

### **L'enzim Prostaglandina H sintasa i el metabolisme de l' àcid Araquidònic**

---

La isquèmia cerebral provoca la síntesi de prostanoids, que són molècules implicades en la regulació de diverses funcions homeostàtiques, i en situacions patològiques són molècules vasoactives potents, amb capacitat vasoconstrictora o vasodilatadora. Els prostanoids estan implicats en l'agregació plaquetar, en el manteniment de la funció renal, intervenen en la resposta inflamatòria, augmenten la permeabilitat dels vasos, faciliten la infiltració leucocitària i estimulen la generació de febre i dolor.

La Prostaglandina H sintasa (PGHS) també coneguda com a ciclooxigenasa (COX), és l'enzim que catalitza el primer pas en la síntesi de prostanoids, que inclouen prostaglandines (PGs), prostaciclina, i tromboxà (TX). L'enzim COX és una glicoproteïna homodimèrica localitzada en la membrana del reticle endoplasmàtic. Cada monòmer es compon de tres dominis estructurals, un primer domini similar al domini del factor de creixement epidèrmic (EGF), (residus 33-72) en l'extrem N-terminal; un domini d'unió a membrana (MBD), (residus 73-116), i un tercer domini catalític amb estructura globular, que conté els centres actius ciclooxigenasa i peroxidasa, (residus 117-583), en la regió C-terminal. També conté la seqüència KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), que dirigeix a la proteïna a la membrana del reticle endoplasmàtic i fa que quedi retinguda allà (fig.10).

Existeixen dues isoformes de l'enzim, la COX-1 i la COX-2, que presenten una homologia de seqüència aproximada del 60% en éssers humans i rosegadors. Malgrat les seves similituds estructurals i funcionals, els enzims COX estan codificats per gens diferents, tenen patrons d'expressió independents, i possiblement realitzen diferents funcions biològiques. La isoforma COX-1 es troba àmpliament distribuïda en gairebé tots els tipus de cèl·lules i es creu que és l'enzim responsable de la síntesi i manteniment dels nivells fisiològics de prostaglandines (Yermakova i O'Banion 2000).

La isoforma COX-2 només s'expressa de forma constitutiva en determinats teixits com en el SNC i en el ronyó, a nivells basals molt baixos. No obstant, la seva expressió s'indueix en resposta a diversos estímuls com factors de creixement, citocines i molècules proinflamatòries, i és la isoforma responsable de la producció de prostanoids en diverses malalties inflamatòries agudes i cròniques com l'artritis reumatoide i l'aterosclerosi (Rajakarira, et al., 2006). En comparació amb la COX-1, la seva regulació gènica és molt complexa, el gen de la COX-2 presenta una caixa TATA d'uns 30 parells de bases a 5'-*upstream* de l'inici de transcripció, a més de diversos llocs d'unió a factors de transcripció com l'element de resposta a AMPc (CRE), l'element de resposta a IL-6, el potenciador CCAAT vinculat a proteïna (C/EBP); llocs d'unió a diferents factors de transcripció com AP-2, NFκB, Sp-1, PEA-3, GATA-1; i l'element de resposta a glucocorticoids (Phillis et al., 2006). Depenent del tipus de cèl·lula i de l'estímul, diferents combinacions d'elements reguladors activaran l'expressió de la COX-2 a través de vies de senyalització diferents.

Una altra diferència important entre les dues isoformes és que la COX-2 presenta una seqüència extra de 18 aminoàcids en l'extrem C-terminal, que no està present en la COX-1. La seva funció no està establerta, però es creu que podria ser un marcador de proteòlisi ràpida o ser una senyal de trànsit subcel·lular, implicada en la seva degradació (fig.10).

L'àcid araquidònic (AA) és el substrat inicial en la síntesi dels prostanoids. Aquest és alliberat dels fosfolípids de membrana gràcies a l'acció de l'enzim fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que catalitza l'hidròlisi dels glicerofosfolípids de membrana en la posició sn-2 per alliberar AA (Stanimirovic i Satoh, 2000). Aquest serà metabolitzat a través de diferents cascades enzimàtiques que donaran com a resultat la producció d'un conjunt de molècules bioactives que són els eicosanoids, entre els que podem diferenciar els prostanoids, els leucotriens i els àcids epoxieicosatrienoics .

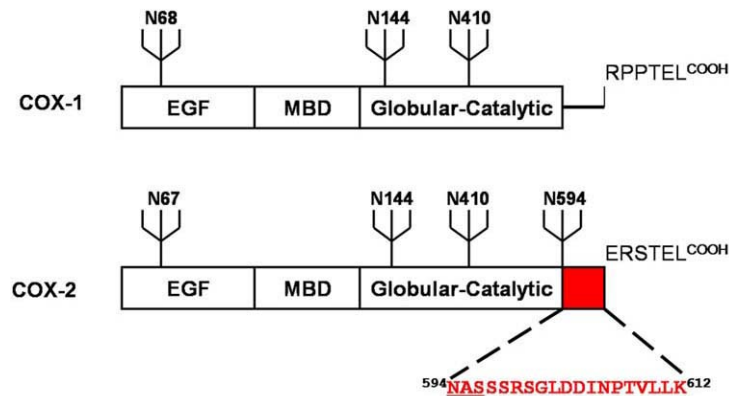


Figura I10. Estructura dels monòmers COX-1 i COX-2.

La via principal en el metabolisme de l'AA és l'anomenada via de les ciclooxigenases. L'enzim COX presenta dues activitats catalítiques, una activitat bis-oxigenasa (ciclooxigenasa), que catalitza la formació de PGG<sub>2</sub> partir de l'àcid araquidònic, i una activitat peroxidasa, que redueix PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub>. L'activitat bis-oxigenasa consta de dues etapes, la substitució d'un àtom d'hidrogen en el C-11 de l'AA per un àtom d'oxigen molecular formant el 11-peroxil radical, seguida d'un procés de ciclació i posterior atac d'una segona molècula d'oxigen en el C-15. La reducció d'aquest nou radical peroxil formaria finalment la PGG<sub>2</sub>. L'activitat peroxidasa consta bàsicament de la reducció del grup peròxid de la PGG<sub>2</sub> a alcohol, formant una nova prostaglandina, la PGH<sub>2</sub>.

Un cop s'ha format la PGH<sub>2</sub>, aquesta actua com a substrat de diferents enzims prostaglandina isomerasas que finalitzaran la cascada enzimàtica donant lloc als diferents prostanoids. Així doncs, la prostaglandina E<sub>2</sub> sintasa (PGES), la prostaglandina D sintasa (PGDS), la prostaglandina F sintasa (PGFS), la prostaciclina sintasa (PGI<sub>2</sub>S) i la tromboxà sintasa (TxAS), catalitzen la formació de les prostaglandines PGE<sub>2</sub>, PGD, PGF<sub>2</sub>α, PGI<sub>2</sub>, i TXA<sub>2</sub>, respectivament.

En el cas de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) s'han descrit tres enzims sintases diferents en mamífers. En primer lloc tenim la PGE<sub>2</sub> microsomal 1 (mPEGS-1), que pertany a la família de les proteïnes associades a membrana implicades en el metabolisme dels eicosanoids i del glutatió, presenta una distribució perinuclear associant-se a la COX-2 i la seva expressió s'indueix en resposta a determinats estímuls inflamatoris com la IL-1β. En segon lloc, la PGES citosòlica (cPGES), s'expressa constitutivament i s'associa preferentment a COX-1. Finalment, tenim la PGES microsomal 2 (mPGES-2), que

també té una distribució perinuclear i s'associa a les ciclooxigenases COX-1 i COX-2 amb la mateixa afinitat.

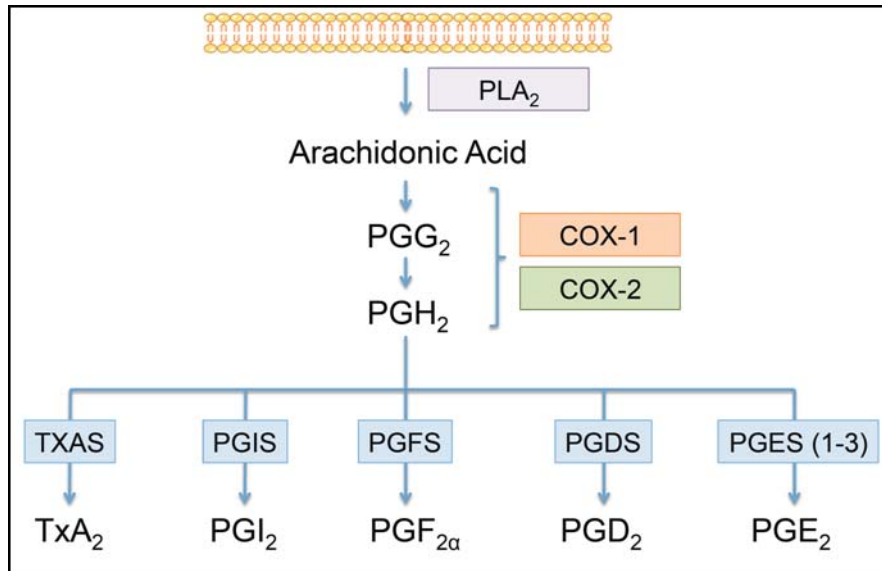


Figura I11. Metabolisme de l'àcid araquidònic per la via de les ciclooxigenases.

La PGH<sub>2</sub> que es forma per activitat de la COX és un metabòlit molt inestable, amb una vida mitjana d'uns pocs minuts, per tant, la síntesi de les diferents prostaglandines dependrà en gran part de l'associació entre les COXs i els diferents enzims PGES.

Cada prostanoid s'uneix a un receptor específic associat a proteïnes-G. (taula: I3). Aquests receptors es distingeixen segons la via de transducció de senyal que activen. L'activació dona lloc a canvis en la producció de AMPc, en els nivells de fosfoinositol, i en la mobilització de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular. La PGE<sub>2</sub> es pot unir a quatre subtipus de receptors (EP1, EP2, EP3 i EP4), mentre que la PGD<sub>2</sub> s'uneix a dos subtipus de receptors (PGD1 i PGD2). Una mateixa PG pot activar diferents cascades de senyalització, la resposta final de les quals pot ser, en alguns casos, potencialment antagonica.

A part de la via de les ciclooxigenases, també existeixen altres vies de metabolització de l'AA que poden donar lloc a molècules diferents als prostanoids, però que també poden actuar com a compostos vasoactius.

PG	Receptor	Distribució en el SNC	Senyalització
<b>PGE2</b>	EP1	Hipotàlem/Tàlem > escorça, hipocamp, estriat i cerebel	↑IP3, ↑Ca <sup>2+</sup>
	EP2	Escorça, estriat, hipocamp, tàlem	↑cAMP
	EP3	Tàlem / hipotàlem > escorça cerebral, estriat hipocamp	↓cAMP
	EP4	Hipotàlem, Tàlem > hipocamp, escorça cerebral i estriat	↑cAMP
<b>PGD2</b>	DP1	Meninges i plexes coroides >>, tàlem, hipotàlem, tronc cerebral >> escorça, hipocamp	↑cAMP
	DP2	Escorça, hipocamp, tàlem, tronc cerebral	↓cAMP
<b>PGF2α</b>	FP	Hipocamp, escorça i sinaptosomes	↑IP3, ↑Ca <sup>2+</sup>
<b>PGI2</b>	IP	Escorça cerebral, hipocamp, estriat	↑ cAMP
<b>TXA2</b>	TP	Racte de la substància blanca, hipocamp i escorça	↑ IP3, ↑Ca <sup>2+</sup>

**Taula I3. Receptors del diferents prostanoids i mecanisme d'actuació.**

La biosíntesi de leucotriens està catalitzada per uns enzims anomenats Lipooxigenases, implicats en el metabolisme de l'àcid araquidònic (AA) i en la oxidació d'altres àcids grassos poliinsaturats. Els diferents productes d'aquesta via enzimàtica també poden comportar-se com a molècules constrictores o dilatadores dels vasos cerebrals, i per tant són capaços d'afectar a la circulació cerebral en una forma comparable a la via de les ciclooxigenases.

La nomenclatura de les diferents lipooxigenases (LOX)es basa en la posició en la que realitzen en la inserció d'un oxigen molecular en un dels carbonis de la cadena alifàtica de l'AA (carboni 5, 8, 12 o 15 de la cadena alifàtica). El producte resultant és l' hidroperoxieicosatetraenoic (HPETE), (Shimizu i Wolfe, 1990). Les LOX més abundants en el cervell són la 5-LOX i 12-LOX, i es troben presents en neurones corticals, astròcits i oligodendròcits (Bendani et al., 1995), i generen els àcids grassos 5-HPETE, 12 - HETE i 15-HETE (Watanabe et al., 1993).

La 5-LOX està present en el citoplasma de les cèl·lules nervioses. Després de l'activació cel·lular que condueix a la síntesi de leucotriens, 5-LOX transloca des del citoplasma de l'embolcall nuclear. Aquest enzim catalitza una reacció de deshidratació, que genera un epòxid inestable intermediari, el Leucotrié A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). El LTA<sub>4</sub> es metabolitza a LTB<sub>4</sub>, per mitjà de l'acció de l'enzim LTB<sub>4</sub> sintasa, amb activitat hidrolasa; o es metabolitza a LTC<sub>4</sub>, per mitjà de l'acció de l'enzim LTC<sub>4</sub> sintetasa, que implica la conjunció d'una molècula de glutatió. LTA<sub>4</sub> és el precursor de la família dels cisteinil leucotriens

(CysLTs), que inclou el LTC<sub>4</sub>, el LTD<sub>4</sub> i el LTE<sub>4</sub> (Shimizu i Wolfe, 1990). En els teixits no neuronals, l'acció dels enzims LOX sobre HPETE i HETE, catalitzen la formació de lipoxines (LXA<sub>4</sub> i LXB<sub>4</sub>), un grup d'eicosanoids implicats en la resolució de la resposta inflamatòria aguda mitjançant la modulació del tràfic de leucòcits i la prevenció de la lesió aguda dels teixits mitjançada per neutròfils (Serhan, 1994; Serhan et al., 2003; Levy et al., 2003).

A més de les vies de la COX i LOX, el citocrom P450 (CYP450) o epoxigenasa (EPOX) també pot catalitzar la conversió de l'àcid araquidònic en compostos biològicament actius a través d'una reacció oxidativa dependent de NADPH (Coon, 2005). Els enzims EPOX metabolitzen l'AA en presència de NADPH i d'oxigen molecular, generant diferents compostos àcids cis-epoxieicosatrienoics, EETs, àcids mono-hidroxi-eicosatetraenoic, i alcohols  $\omega$  i  $\omega$ -1 (Zeldin, 2001). No obstant, s'ha demostrat que aquests enzims s'expressen en nivells relativament alts en els astròcits, en concret en aquells situats al voltant de vasos sanguinis (Hertz et al., 2004). Els EETs contribueixen a la regulació del flux sanguini cerebral i tenen un paper crucial en l'homeòstasi cardiovascular.

## **La COX-2 i els prostanoids en la isquèmia cerebral i en la inflamació**

---

La COX-2 s'indueix en les cèl·lules del cervell en condicions patològiques com en la isquèmia cerebral. L'augment de la COX-2 en la isquèmia es va descriure inicialment en un model experimental d'isquèmia focal transitòria (Planas et al., 1995). Estudis posteriors han confirmat la inducció de COX-2 en models d'isquèmia focal i global (Collaco-Moraes et al., 1996; Nogawa et al., 1997; Miettinen et al., 1997; Zhao et al., 2006). També s'ha estudiat el patró d'expressió de COX-2 després d'un episodi isquèmic. Així doncs, la COX-2 augmenta de forma significativa en la perifèria del nucli isquèmic (zona de penombra) principalment en neurones, mentre que l'expressió en el nucli isquèmic és menor, amb una colocalització a les cèl·lules endotelials que envolten la microvasculatura de la regió infartada del cervell.



L'augment de la COX-2 també s'ha detectat en teixits cerebral postmortem de pacients que havien patit isquèmia cerebral. En aquests teixits la proteïna COX-2 es troba sobreexpressada tant en cèl·lules neuronals com en cèl·lules glials, en tot el cervell. En la fase aguda del infart cerebral, la proteïna COX-2 està present en els neutròfils infiltrants i en neurones properes a l'infart, el que suggereix que la COX-2 participa en la lesió isquèmica en el cervell humà (Iadecola et al., 1999). Els astròcits reactius i els vasos sanguinis també mostren un augment en l'expressió de l'enzim Maslinska et al., 1999). Aquests estudis suggereixen que la inducció primerenca de la COX-2 pot estar involucrada en la lesió tissular, mentre que la inducció retardada en zones més distals a la regió infartada pot estar involucrada en la cicatrització i la remodelació del teixit (Sairanen et al., 1998).

En vista d'aquestes observacions va sorgir la idea que la inducció de COX-2 és un component important del dany tissular que ocorre en la isquèmia, i que per tant, la seva inhibició farmacològica amb antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) podia ser un tractament plausible per a la reducció del dany isquèmic cerebral. No obstant, diversos estudis han demostrat que el tractament de l'ictus amb AINEs no sembla tenir efectes, i a més, estudis recents han mostrat que el tractament crònic amb inhibidors de la COX-2 augmenta el risc de patir malalties cardiovasculars i cerebrovasculars (Grosser et al. 2006).

Nombrosos estudis coincideixen en concloure que la inhibició selectiva de l'enzim COX-2 en diversos models d'isquèmia cerebral, proporciona efectes beneficiosos en la progressió de l'infart cerebral, que es tradueix en una disminució del dany isquèmic i la mort neuronal. Així mateix, s'ha vist també que ratolins deficients en COX-2 estan protegits contra la isquèmia cerebral (Iadecola et al, 2001; Araki et al, 2001; Candelario-Jalil i altres, 2007; Candelario-Jalil i Fiebich, 2008), el que suggereix un efecte perjudicial de la COX-2 en l'accident cerebrovascular.

D'altra banda, els ratolins deficients en COX-2 sotmesos a un estímul inflamatori per exposició al lipopolisacàrid bacterià (LPS) mostren una resposta inflamatòria exacerbada, amb una major infiltració de leucòcits i un augment en el dany i la permeabilitat de la BHE mentre que aquests efectes s'atenuen en els ratolins deficients per la COX-1 (Aid et al. 2008, 2010;. Choi et al, 2008, 2009, 2010).

La COX-1 ha estat considerada tradicionalment com a la isoforma enzimàtica de COX responsable de la síntesi de PG en situacions d'homeòstasi, no obstant altres estudis postulen que podria tenir un paper actiu en la neuroinflamació i en diferents malalties neurodegeneratives (Minghetti et al., 1999). És per aquesta raó que diferents grups d'investigació consideren que l'ús de inhibidors de la COX-1 podria suposar una possibilitat terapèutica en malalties amb un component neuroinflamatori important. A més, postulen que l'activitat de la COX-2 podria tenir efectes beneficiosos sobre la resolució de la resposta inflamatòria en determinades situacions. Per tant, els darrers estudis qüestionen el paper nociu que es va atribuir primer a la COX-2 en el cervell. Malgrat això els mecanismes moleculars que expliquen aquests efectes de la COX-2 encara es desconeixen.

### **Paper dual de la prostaglandina PGE<sub>2</sub> en la isquèmia cerebral i la inflamació**

---

Nombrosos estudis han demostrat el paper deleteri que juga la prostaglandina PGE<sub>2</sub> en la isquèmia cerebral. La PGE<sub>2</sub> indueix mort cel·lular per apoptosi en les neurones corticals i hipocampals de rata (Takadera et al., 2006), a més també s'ha demostrat que la PGE<sub>2</sub> augmenta l'alliberament de glutamat per part dels astròcits (Bezzi et al., 1998), potenciant l'excitotoxicitat en el context de la isquèmia cerebral.

A més, el paper de la PGE<sub>2</sub> és particularment important per a la propagació de la inflamació postisquèmica, ja que activa NFκB (Poligone et al., 2001), que al seu torn, indueix la transcripció de diverses citocines i quimiocines proinflamatòries, com IL-1β, factor de necrosi tumoral α, i CCL2. La producció d'aquests mediadors proinflamatoris condueix a l'entrada i l'activació dels neutròfils mitjançant la modulació de l'expressió de metal·loproteïnases de la matriu, l'augment de la permeabilitat de la BHE (Candelario et al., 2007) i facilitant la infiltració leucocitària en la regió infartada.

No obstant això, la PGE<sub>2</sub> també pot induir neuroprotecció en determinades situacions. Tot fa pensar que el paper neurotòxic o neuroprotector de PGE<sub>2</sub>, en la isquèmia i altres malalties (Cazevieille et al., 1994) ve determinat pel tipus de receptor que activa. Així doncs, l'activació dels receptors de PGE<sub>2</sub> EP<sub>2</sub> o EP<sub>4</sub> té efectes neuroprotectors enfront

de l'excitotoxicitat induïda per NMDA (McCullough et al., 2004; Ahmad et al., 2005 i 2006; Liu et al., 2005), la isquèmia in vivo, i en la privació d'oxigen i glucosa (OGD) in vitro (McCullough et al., 2004). La unió de PGE2 als receptors EP1 i EP3, en canvi, s'associa amb neurotoxicitat en la isquèmia cerebral (Kawano et al., 2006).

*Objectius*



### **Objectiu general**

En aquesta tesi ens hem plantejat l'objectiu d'investigar les vies de senyalització intracel·lular i els mediadors inflamatoris que participen en la resposta dels astròcits a l'activació dels receptors d'immunitat innata, i concretament TLR-4.

### **Objectius concrets**

- 1) Identificar les vies de senyalització implicades en la resposta a l'activació de TLR-4 en astròcits.
- 2) Estudiar l'ambient proinflamatori que es genera en resposta a l'activació d'aquest receptor en astròcits.
- 3) Determinar el paper de la COX-2 astrogliàl en la neuroinflamació induïda per TLR-4.
- 4) Avaluar l'alliberació de prostanoids dependent de l'activitat de la COX-2 en astròcits
- 5) Caracteritzar del perfil proinflamatori induït pel LPS, en astròcits deficients en COX-2.



# *Materials i mètodes*





## Animals utilitzats

---

La manipulació dels animals d'experimentació realitzada en aquesta tesi s'ha dut a terme d'acord amb la normativa vigent i les directrius de la Unió Europea. Els protocols experimentals específics han estat aprovats pel comitè d'ètica de la Universitat de Barcelona.

### Treball in vitro

En la preparació dels cultius glials es van utilitzar animals postnatsals de 1-2 dies de vida (P1-2).

Les rates Sprague-Dawley van ser obtinguts de Charles-River (Lió, França).

Els ratolins knock-out (KO) per la proteïna adaptadora MyD88, amb un fons genètic C57BL/6, es van obtenir de *Bioservices Oriental, Inc* (Kyoto, Japó), i es van creuar amb ratolins C57Bl6 obtinguts de Charles River. D'aquest creuament es va obtenir una colònia de ratolins heterozigots MyD88 (+/-) que es va mantenir en l'estabulari de la Facultat de Medicina (Universitat de Barcelona). Per a cada llogridada obtinguda dels progenitors heterozigots es va genotipar cada animal nascut, i es van seleccionar els animals KO i WT per MyD88.

Els ratolins de tipus salvatge (WT) i knock-out (KO) per la proteïna STAT1, amb un fons genètic 129.S6.SvEv-Stat, es van obtenir de Taconics Inc. (Hudson, NY, EUA).

Els ratolins de tipus salvatge (WT) i knock-out (KO) per la proteïna COX-2, amb un fons genètic mixte (C57BL/6, 129P2), es van obtenir de Taconics Inc. Per a l'obtenció dels ratolins KO, es van creuar femelles heterozigotes (+/-) amb mascles homozigots (-/-) per COX-2, i es va genotipar cada animal nascut de les diferents llogridades, seleccionant només els animals KO per COX-2.

### Treball in vivo

Es van utilitzar Rates mascles Wistar de 280-350 gr. de pes., obtingudes de Charles-River (Lió, França).

Ratolins *knock-out* (KO) per la proteïna adaptadora MyD88 adults de 25-29 gr de pes.

### Protocol de genotipatge

El genotipatge es va dur a terme utilitzant la tècnica de la PCR a partir d'ADN extret de biòpsies de la cua dels diferents animals. L'extracció de l'ADN es va realitzar amb el kit *Extract-Namp Tissue PCR* (Sigma), d'acord amb les instruccions del fabricant.

Pel genotipatge dels animals KO i WT per MyD88 es van utilitzar els encebadors de la taula M1. Les condicions d'amplificació utilitzades van ser les següents: un primer pas de desnaturalització i activació de la polimerasa d'ADN de 5 minuts a 94 °C, seguit de 42 cicles d'amplificació, dividits en un pas de desnaturalització de l'ADN de 30 segons a 94 °C, un pas d'hibridació de 30 segons a 65 °C i un pas d'amplificació d'1 minut a 72 °C. En l'últim cicle es va afegir un pas d'extensió addicional a 72 °C durant 5 min.

Rat Gens	Primer Sequence 5' → 3'	
<b>MyD88 - KO</b>	F: AGATGATCCGGCAACTAGAACA	300pb
	R: GATTCGCAGCGCATCGCCTT	
<b>MyD88 - WT</b>	F: AGATGATCCGGCAACTAGAACA	600pb
	R: GAATCAGTCGCTTCTGTTGGAC	

□

**Taula M1. Encebadors pel genotipatge dels animals transgènics per MyD88.**

Pel genotipatge dels animals KO i WT per COX-2 es van utilitzar els encebadors que es mostren en la taula M2. Les condicions d'amplificació utilitzades van ser les següents: un primer pas de desnaturalització i activació de la polimerasa d'ADN de 5 minuts a 94 °C, seguit de 34 cicles d'amplificació, dividits en un pas de desnaturalització de l'ADN de 30 segons a 94 °C, un pas d'hibridació de 30 segons a 57 °C i un pas

d'amplificació d' 1 minut a 72 °C. En l'últim cicle es va afegir un pas d'extensió addicional a 72 °C durant 5 min.

<b>Rat Gens</b>	<b>Primer Sequence 5' → 3'</b>	
<b>COX-2 KO</b>	F:ACGCGTCACCTTAATATGCG	905pb
	R:ATCCCTTCACTAAATGCCCTC	
<b>COX-2 WT</b>	F:ACACCTTCAACATTGAAGACC	725pb
	R:ATCCCTTCACTAAATGCCCTC	

?

Taula M2. Encebadors pel genotipatge dels animals transgènics per COX-2 (Loftin et al., 2000).

## Cultius cel·lulars

---

### Cultiu enriquit d' astròcits de rata

---

Els cultius gials es van preparar tal i com descriu (Fauconneau et al, 2002) amb algunes modificacions.

Per cada cultiu, es sacrifiquen 10 rates P1 per decapitació, s'extreu el cervell asèpticament i es manté en una placa de Petri amb PBS fred, en gel. A continuació es separen els dos hemisferis cerebrals, descartant el cerebel, els lòbuls olfactoris i les meninges, amb l'ajut d'una lupa binocular. La dissociació del teixit es realitza mecànicament, disgregant la mescla amb una pipeta Pasteur fins que s'assoleix una suspensió homogènia. Es filtra la suspensió amb un filtre de 70 µm i es centrifuga 5 minuts a 1000 rpm. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el *pellet* en medi DMEM suplementat amb un 20% de sèrum boví fetal (FBS) i un 0.4% de penicil·lina/estreptomicina. Sembrem les cèl·lules en flascons de 75 cm<sup>2</sup>. Les cèl·lules es mantenen a l'incubador a 37°C en una atmosfera humidificada amb 5% CO<sub>2</sub> i 95% d'aire. La confluència s'assoleix després d'uns 12-13 dies in vitro (DIV). En aquest moment, el cultiu està format per un 75 % d'astròcits i un 25% de microglia.

Passat aquest temps procedim a recollir i sembrar en plaques de cultiu les cèl·lules astrocitàries que em fet créixer, intentant descartar el màxim possible de les cèl·lules microgials i altres tipus cel·lulars que també es troben presents en el cultiu glial inicial però que no són del nostre interès.

Per eliminar la micròglia adherida damunt de la monocapa astrocitària els flascons s'agiten en un agitador orbital a 250 rpm durant 18h (*overnight*). Després de l'agitació, es fa un rentat amb PBS per eliminar les restes de sèrum i es desadhereixen les cèl·lules amb tripsina 0,025%/EDTA 2 mM. Els cations bivalents són inhibidors de la tripsina, afegim EDTA (quelant de cations bivalent) per augmentar l'acció de la tripsina. Es deixa actuar la tripsina dins l'incubador durant 5 minuts aproximadament fins que observem que les cèl·lules comencen a desadherir-se. En aquest punt neutralitzem

L'acció de la tripsina addicionant PBS amb un 20% de FBS. Recuperem la suspensió cel·lular i centrifuguem 5 minuts a 1000 rpm. Després de la centrifugació descartem el sobrenedant i resuspenem el pellet cel·lular en DMEM amb un 10% de FBS i antibiòtics. Sembrem a una densitat de 300 cèl·lules /mm<sup>2</sup>.

---

### **Cultiu enriquit d'astròcits de ratolí**

---

El cultiu pur d'astròcits de ratolí s'ha preparat segons el mètode de Giulian i Baker (1986). A diferència del mètode de Fauconneau, la dissociació del teixit es realitza de manera mecànica i química. Després de l'obtenció dels hemisferis cerebrals, el teixit es disgrega amb tripsina 0,25%/EDTA 1mM durant 25 minuts en agitació a 37°C. La tripsina es neutralitza amb DMEM:F12 (1:1) suplementat amb un 10% FBS i DNasa 4mg/mL. La disgregació es continua mecànicament pipetejant fins que s'aconsegueix una suspensió cel·lular completament homogènia i centrifuguem les cèl·lules 5 minuts a 1000 rpm. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el pellet en medi DMEM:F12 suplementat amb un 20% de FBS i un 0.4% de penicil·lina/estreptomycina. Sembrem les cèl·lules en flascons de 25 cm<sup>2</sup>. Les cèl·lules es mantenen a l'incubador a 37°C en una atmosfera humidificada amb 5% CO<sub>2</sub> i 95% d'aire.

Les cèl·lules gials es mantenen en medi DMEM:F12 amb un 10% de FBS i el medi es canvia un cop a la setmana. En els cultius de ratolí, pels procediments de purificació dels astròcits s'utilitza el medi DMEM:F12 al 10% de FBS més antibiòtics.

---

### **Cultiu de microglia**

---

Els cultius de microglia s'han obtingut mitjançant el mètode *Mild Trypsinization* descrit per Saura et al. (2003). Després de la dissecció sembrem les cèl·lules directament en plaques de cultiu en medi DMEM:F12 suplementat amb un 20% de i un 0.4% de penicil·lina/estreptomycina. Canviem el medi de cultiu un cop per setmana i mantenim les cèl·lules en un incubador a 37°C (5% CO<sub>2</sub> i 95%) durant 20 dies. En aquest punt

## Materials i mètodes

tenim un cultiu confluent de glia mixta en placa. Per aconseguir un cultiu de cèl·lules microglials descartem els astròcits mitjançant una tripsinització suau. En primer lloc, recollim el medi de cultiu condicionat sense descartar-lo, això és molt important perquè els astròcits en cultiu alliberen factors tròfics i altres components necessaris per la viabilitat de les cèl·lules microglials. A continuació rentem els pous amb PBS 1X a 37°C, per a eliminar restes de medi amb FBS que podrien inactivar l'acció de la tripsina. Finalment afegim Tripsina 0.25% diluïda  $\frac{1}{4}$  entre 30-40 min a l'incubador, anem controlant al microscopi.

A continuació, afegim DMEM:F12 + FBS 10% a cada pou per a neutralitzar l'acció de la Tripsina, aspirem i fem un rentat amb 1ml de DMEM:F12 + FBS 10%. Finalment, sembrem les cèl·lules en un volum final de medi preparat de la següent manera,  $\frac{1}{2}$  medi condicionat (que hem recollit anteriorment) +  $\frac{1}{2}$  medi fresc (DMEM:F12, FBS 10%, P/S). El tractament de les cèl·lules es realitza entre 24h i 48h després de la tripsinització ja que la viabilitat de les cèl·lules microglials en cultiu no acostuma a sobrepassar les 72h.

## Tractaments

---

En aquest estudi es va realitzar el tractament de les cèl·lules amb el LPS (*Escherichia coli* 055: B5), com a model d'inflamació *in vitro*, amb l'objectiu d'activar el receptor TLR-4 en la membrana cel·lular de forma específica. Aquest tractament es va realitzar a una concentració de 10 ng / mL, durant períodes de temps entre 5 minuts i 24 hores.

A part del tractament central que era el LPS, també es van realitzar tractaments addicionals:

Es van utilitzar inhibidors farmacològics específics de proteïnes MAPKs: l'inhibidor 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofeniltio)butadiè (U0126), per inhibir ERK1/2; l'inhibidor trans-4-[4-(4-fluorofenil)-5-(2-metoxi-4-pirimidinilo)-1H-imidazol-1-il] ciclohexanol (SB239063), per inhibir p38; i l'inhibidor (1,9-cd) pirazol-6(2H)-ona (SP600125), per inhibir JNK. Es va utilitzar dimetilsulfòxid com a vehicle, i es van addicionar al medi de cultiu 30 minuts abans del tractament amb el LPS.

L'inhibidor de l'activitat del proteasoma (MG132), es va utilitzar DMSO com a vehicle, i es van addicionar al medi de cultiu 15 hores abans del tractament amb el LPS.

L'inhibidor de la COX-1, 5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-trifluorometilpirazole (SC-560), es va utilitzar DMSO com a vehicle, i es van addicionar al medi de cultiu 30 minuts després del tractament amb el LPS.

L'inhibidor de la COX-2, N-methanesulfonamide [cyclohexyloxy-4-nitrofenil] (NS-398), que es va dissoldre en solució salina a pH 13, i es van addicionar al medi de cultiu 3 hores després del tractament amb el LPS.

La prostaglandina PGE<sub>2</sub>, es va dissoldre en etanol 100%, i es van addicionar al medi de cultiu 3 hores després del tractament amb el LPS.

L'inhibidor de la PLA<sub>2</sub> citosòlica, la trifluorometilcetona (AACOCF<sub>3</sub>), es va dissoldre en DMSO, i es van addicionar al medi de cultiu 30 minuts després del tractament amb el LPS.

L'agonista del receptor EP4, ONO-4819, es va dissoldre en etanol 100%, i es van addicionar al medi de cultiu 3 hores després del tractament amb el LPS.



Les concentracions màximes finals, en el medi de cultiu, de DMSO i d'etanol van ser del 0,25% y 0.0045%, respectivament. En tots els tractaments es va comprovar que l'addició del vehicle sol no modificava els resultats obtinguts.

<b>Producte</b>	<b>Concentració final</b>	<b>Vehicle</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referència</b>
<b>AACOCF3</b>	2 µM	DMSO	Calbiochem	100109
<b>LPS</b>	10 ng/ml	PBS (1X)	Sigma-Aldrich	L6529
<b>LPS ultrapur</b>	10 ng/ml	PBS (1X)	InvivoGen	06B24-MT
<b>MG132</b>	10 µM	DMSO	Calbiochem	474790
<b>NS398</b>	3 µM	salí pH13	Tocris Bioscience	0942
<b>ONO-4819</b>	100 nM	Etanol	Cayman Chemical	13618
<b>PGE2</b>	1-10 ng/ml	Etanol	Sigma-Aldrich	P5640
<b>SB239063</b>	25 µM	DMSO	Tocris Bioscience	1962
<b>SC560</b>	10 nM	DMSO	Calbiochem	565610
<b>SP600125</b>	10 µM	DMSO	Calbiochem	420119
<b>U0126</b>	25 µM	DMSO	Calbiochem	662005

☐

**Taula M3. Llistat de productes amb que s'han realitzat els diferents tractaments.**

## Injecció de LPS en rosegadors

---

Les rates i els ratolins utilitzats van ser anestesiats amb isofluorà vaporitzat en oxigen a una concentració del 4% i es van col·locar en una plataforma estereotàxica mantenint el pla anestèsic amb el mateix compost però a una concentració del 1.5%. Un cop col·locats a l'aparell es va procedir a realitzar una incisió longitudinal a la línia mitja del cap i es va dissecar la pell i el periosti per deixar al descobert el crani i identificar clarament les sutures i els punts bregma i lambda. En base a les coordenades dels l'atles Paxinos i Watson (1986) es va identificar la zona de injecció sobre l'ós parietal i es va practicar una trepanació per poder introduir l'agulla. Un cop trepanat el crani, mitjançant l'aparell estereotàxic i seguint les coordenades abans esmentades es va introduir l'agulla fins l'estriat dret i es va injectar la solució de LPS tal i com es detalla a continuació. En el cas de les rates, es va injectar 5 µl de LPS 1 µg/ml en solució salina a una velocitat màxima de 0.5 µl/min. Les coordenades que es van utilitzar va ser Bregma: 0.5 mm anteroposterior, 3 mm lateral, i 5 mm ventral.

En el cas dels ratolins, es va injectar 0,7 µl de LPS 1 µg/ml en solució salina a una velocitat màxima d'injecció de 0.1 µl/min. En aquest cas, les coordenades que es van utilitzar van ser Bregma: 0.5 mm anteroposterior, 2 mm lateral, i 3 mm ventral, d'acord amb el atlas de Paxinos i Watson (1986). Finalitzada la injecció es va esperar 10 minuts abans de retirar l'agulla, i un cop retirada es va suturar la pell mitjançant punts de sutura simple amb seda de 4/0. Els animals es van col·locar a les seves respectives gàbies amb accés a aigua i menjar *ad libitum*, on van romandre fins al moment del sacrifici. Transcorregudes 8 hores des de l'administració del LPS, els animals van ser anestesiats altre vegada i perfosos per punció cardíaca amb solució salina heparinitzada per eliminar la sang dels vasos del cervell. A continuació, es va obtenir el cervell i es va dissecar l'estriat ipsilateral i contralateral. El teixit cerebral es va mantenir congelat a -80 ° C fins al moment de realitzar els assaigs de RT-PCR. Grups addicionals d'animals es van processar per immunohistoquímica tal i com es detalla més endavant.

## Anàlisi de l'expressió i fosforilació de proteïnes

---

### Western Blot

---

El Western-Blot és un mètode per detectar l'expressió o modificació de proteïnes específiques a partir d'una mescla complexa per a obtenir dades qualitatives i semiquantitatives de l'extracte proteic.

El primer pas és la separació de les macromolècules segons el seu pes molecular per mitjà de gels d'electroforesi. En segon lloc, les proteïnes es transfereixen a una segona matriu, una membrana de nitrocel·lulosa o PVDF. Després, es bloqueja la membrana per evitar les possibles unions inespecífiques dels anticossos primaris que s'usaran posteriorment per a detectar les proteïnes d'interès, a la seva superfície. Posteriorment, la membrana s'incuba amb un anticòs específic per a la proteïna que es vol detectar (anticòs primari). A continuació, s'elimina l'excés d' anticòs primari per mitjà de diversos rentats amb tampó T-TBS i la membrana s'exposa a un altre anticòs (anticòs secundari) que reconeixerà la porció específica d'espècie present a l'anticòs primari. Quan la detecció es fa per quimioluminescència, l'anticòs secundari porta unit un enzim peroxidasa que s'utilitza en conjunció amb un agent luminescent i la reacció produeix luminescència en proporció a la quantitat de proteïna. S'exposa un film fotogràfic amb la membrana, i la intensitat del senyal es quantifica per densitometria. La intensitat de la senyal es correlaciona amb la quantitat d' antigen en la superfície de la membrana.

### Extracció de proteïnes

---

#### Extracció de proteïnes totals

Recollim el medi de cultiu i fem un rentat amb PBS (1x) fred. Col·loquem la placa sobre un suport amb gel i procedim a recollir les mostres. És important realitzar la recollida de mostres en fred per a evitar la possible degradació de les mostres, així com l'activació d'e proteases i/o fosfatases. En segon lloc, afegim un volum adient de tampó

## Materials i mètodes

RIPA directament a la placa. A continuació recollim els extractes cel·lulars donant uns cops secs a la placa, per a facilitar que les cèl·lules es desenganxin de la superfície de la placa, i rasant el fons de la placa amb l'ajuda de la pipeta per assegurar-nos de recuperar tot l'extracte. Els extractes proteics obtinguts es soniquen 2 vegades no consecutives durant 10 segons per a acabar de llisar les cèl·lules i obtenir una solució proteica homogènia.

### Extracció de proteïnes nuclears

L'extracció de proteïnes nuclears es va dur a terme amb el kit *Nuclear extract kit* (Active Motif), seguint les instruccions recomanades pel fabricant.

### **Determinació de la concentració de proteïnes**

---

La determinació de la concentració de proteïnes es fa seguint el mètode de Bradford descrit al 1976. El reactiu Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250) canvia el seu màxim d'absorció des de 465nm a 595 quan interacciona amb els enllaços peptídics.

### Recta patró

En primer lloc preparem una solució patró d' Albúmina Sèrica Bovina (BSA, Sigma Chem.) 0.2 mg/mL. A partir d' aquesta solució es prepara una corba patró amb diferents concentracions conegudes de BSA, que compararem amb les mostres experimentals per a determinar la concentració de proteïna total de cada mostra. Així, a partir de la solució mare de BSA preparem diferents dilucions en aigua Milli-Q segons la taula següent:

<b>µg proteïna/mL</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>20</b>
<b>BSA (0.2mg/mL) (µl)</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b>H2O (µl)</b>	<b>800</b>	<b>795</b>	<b>790</b>	<b>780</b>	<b>760</b>	<b>740</b>	<b>720</b>	<b>700</b>
<b>Reactiu de Bradford (1X)</b>	<b>200 µl a cada pou</b>							

**Taula M4. Recta patró per al càlcul de la concentració de proteïna d'una mostra.**

**Mostres experimentals:**

Preparem les mostres mesclant 3µL d'extracte proteic en 800µL d'aigua en diferents tubs d' Eppendorf.

**Adició del reactiu de Bradford i lectura:**

Quan es tenen les mostres i la recta patró a punt s'addicionen 200µL de reactiu Bradford. Agitem i incubem durant 15 minuts a temperatura ambient. A continuació, es mesura l'absorbància a 595nm. La concentració de proteïnes de cada mostra es calcula interpolant el valor d'absorbància de la mostra a la recta patró de BSA que es prepara a cada assaig.

**Electroforesi en gel d'acrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE)**

Es una tècnica per separar las proteïnes en funció de la longitud de la cadena polipeptídica, massa molecular, modificacions postraduccionalis i altres factors. El SDS és un detergent aniònic que desnaturalitza les proteïnes (sense alterar els enllaços disulfur) fins que adquireixen la seva estructura primària, i per altra banda, proporciona una càrrega negativa a les proteïnes en proporció a la seva massa. D' aquesta manera, les proteïnes queden carregades negativament i es separen únicament en funció del seu tamany.

### **Preparació de les mostres:**

Després de determinar la concentració de proteïnes, es calcula el volum de mostra necessari per carregar 25µg de proteïna. S'afegeix aigua per ajustar totes les mostres al mateix volum. El tampó de càrrega està concentrat 3x i conté ditiotreitòl (DTT) o 2-mercaptoetanol ( $\beta$ -mercaptoetanol) que contribueix a la desnaturalització de les proteïnes reduint els enllaços disulfur. Es porta a 1x amb el volum de mostra. Escalfem les mostres amb el tampó de càrrega a una temperatura de 100 °C durant 5 minuts, per a facilitar el procés de desnaturalització.

### **Preparació dels gels de poliacrilamida:**

Per fer l'electroforesi s'ha utilitzat el kit *Mini-Protean* de BioRad.

S'utilitzen dos gels de poliacrilamida, un gel separador, que separarà les proteïnes en funció del seu tamany, i per sobre, un gel apilador, amb porus grans de poliacrilamida (4%). El gel apilador es prepara a pH 6,8, dues unitats de pH per sota del pH del tampó d'electroforesi. Fent córrer la mostra en aquestes condicions s'aconsegueix que les proteïnes s'agrupin i entrin al gel separador a la vegada. El gels es preparen per 1 o 2 gels segons la taula M5.

Un cop els gels han polimeritzat es col·loquen en la cubeta d'electroforesi que s'omple amb el tampó d'electroforesi 1X. Les mostres es carreguen en els pous del gel amb una xeringa *Hamilton*. Reservem un carril per carregar el marcador de pes molecular (*Precision Plus Protein Standards*, BioRad). Es connecta la cubeta a la font i les proteïnes es fan córrer a 100 volts fins que s'observa que el front arriba al final del gel. El tampó de càrrega porta un colorant, el Blau de Bromofenol, per poder observar com avança el front.

### **Transferència per electroblotting**

Per tal que les proteïnes siguin accessibles a la detecció amb l'anticòs es transfereixen des del gel a una membrana de PVDF (per *Polyvinylidene fluoride*) (Immobilon, Millipore). El gel d'acrilamida es posa en contacte amb la membrana i mitjançant el pas

de corrent elèctric les proteïnes migren cap a la membrana, mantenint la mateixa organització que tenien en el gel. Per tal que les proteïnes quedin unides a la membrana és necessari activar-la. L'activació de la membrana de PVDF es fa posant-la 2 minuts en metanol, i un minut en aigua fins que s'equilibra (segons el protocol d'Immobilon). Muntem la transferència posant les esponges, el paper Whatman, el gel i la membrana en contacte. La transferència es realitza a 100 volts durant 90 minuts. El temps de transferència també es pot ajustar al tamany de la proteïna que volem detectar, doncs, proteïnes petites transferiran més ràpidament cap a la membrana.

% Acrilamida	6%	8%	10%	12%	15%	STACKING
<b>Solució 1</b>	4	4	4	4	4	-
(mL)	6	6	6	6	6	-
<b>Acrilamida</b>	1.6	2.16	2.68	3.2	4	0.225
(mL)	2.4	3.24	4.02	4.8	6	0.45
<b>Solució 2</b>	-	-	-	-	-	0.975
(mL)	-	-	-	-	-	1.95
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2.4	1.84	1.32	0.8	-	0.775
(mL)	3.6	2.76	1.98	1.2	-	1.55
<b>PSA 13%</b>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02
(mL)	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.04
<b>TEMED</b>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05
(mL)	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.01
<b>Volum Total</b>	8	8	8	8	8	2
(mL)	12	12	12	12	12	3

2

Taula M5. Fórmules per a la preparació de gels de poliacrilamida.

Després de la transferència, la membrana es desactiva incubant-la novament amb metanol i es deixa assecar. Seguint el protocol *Fast System* (Immobilon), no és necessari bloquejar amb llet les membranes de PVDF i les membranes desactivades s'incuben directament amb l'anticòs primari.

### Immunoblotting

L'anticòs primari diluït en tampó T-TBS s'incuba amb la membrana durant tota la nit en agitació a 4 °C. Després de la incubació es fan 2 rentats amb T-TBS durant 15 minuts per eliminar l'excés d'anticòs. A continuació, la membrana s'exposa amb un anticòs secundari que reconeix la regió específica d'espècie de l'anticòs primari. Per això els anticossos secundaris s'anomenen: *anti-mouse*, *anti-rabbit* etc. segons l'espècie que reconeixen.

### Detecció

Després d'hibridar amb l'anticòs secundari que porta unit l'enzim peroxidasa, la membrana s'incuba amb 2mL de la solució luminol i 40µL de la solució *enhancer* durant un minut. La detecció de la llum produïda per la reacció de la peroxidasa es realitza posant en contacte la membrana amb una pel·lícula fotogràfica dins d'un casset.

### Anàlisi per densitometria

L'anàlisi de la densitat de les bandes s'ha realitzat utilitzant el *software* Quantity One (BioRad). La densitat de la banda es calcula a partir del ràtio entre la densitat de banda de la proteïna en estudi i la densitat de banda d'una proteïna control de càrrega, com la  $\beta$ -tubulina, actina o GAPDH.



SOLUCIÓ/TAMPÓ	PREPARACIÓ
Solució 1	0,75M Tris base (PM=229,12), pH 8,8 amb HCl
	0,2% Dodecil Sulfat de Sodi (SDS) en aigua Milli-Q
Solució 2	30% Acrilamida Bis Solution, 37,5:1 (BioRad)
Solució 3	0,25M Tris base (PM=229,12), ajustar a pH 8,8
	0,2% Dodecil Sulfat de Sodi (SDS) en aigua Milli-Q
Persulfat amònic	13% de persulfat amònic
TEMED:	TEMED (Sigma)
Tampó electrolític	25mM Tris-base (PM=229,12), no s'ajusta a pH
	192mM glicina (PM=75,07) en aigua destil·lada
Tampó de transferència	25mM Tris-base, no s'ajusta a pH
	192mM glicina (PM=75,07)
	20% v/v Metanol, en aigua destil·lada
	0,5M NaPi (pH 7) = 0,5M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 0,5M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	20% glicerol
Tampó de càrrega	4% Dodecil Sulfat de Sodi (SDS)
	10% DTT (2,2-ditiotreitòl)
	0,05% de Blau de Bromofenol, en aigua destil·lada
	0,02M Tris HCl, ajustar a pH 7,5
	0,150M NaCl
Tampó T-TBS	0,05% Tween 20, en aigua destil·lada
	1,25mM Luminol Na
Luminol	0,03% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	0,1M Tris HCl, ajustar a pH 8,6-8,7
Solució enhancer	11mg Àcid p-OH-cumàric en 10mL DMSO

Taula M6. Preparat de les solucions necessàries per a realitzar l'assaig de WB.

---

## Immunocitoquímica

---

La immunocitoquímica és la utilització d'anticossos específics primaris per a la localització de pèptids o proteïnes en una cèl·lula. Els anticossos units poden ser visualitzats mitjançant la utilització de diferents mètodes. Un d'ells és la utilització d'anticossos secundaris units a sondes fluorescents que permeten la seva visualització mitjançant Microscòpia de fluorescència o Microscòpia Confocal.

### Fixació de les cèl·lules

Després del tractament dels cultius cel·lulars, s'aspira el medi de cultiu i les cèl·lules es fixen en una solució de PFA al 4% durant 10-20 minuts a temperatura ambient.

### Permeabilització de les membranes

Seguidament es fan diversos rentats amb PBS (1X) i es permeabilitza la membrana de les cèl·lules fixades utilitzant una solució de tritó al 0.5% en PBS. Aquest pas és important si la proteïna que es vol detectar és intracel·lular, d'aquesta manera es facilita l'entrada dels anticossos a l'interior cel·lular.

### Bloqueig d' unions inespecífiques

Posteriorment s'utilitza una solució de bloqueig per a evitar o disminuir les possibles unions inespecífiques dels anticossos utilitzats durant l'assaig. La solució de bloqueig es prepara en PBS(1X) amb un 3% de sèrum. El sèrum que s'addiciona e la solució de bloqueig s'escull en funció de l'espècie de l'animal a partir de la qual s'hagi purificat l'anticòs secundari que s'utilitzarà en el procediment.

### **Incubació amb l'anticòs primari**

Posteriorment es prepara una dilució adient de l'anticòs primari específic contra la proteïna que es vol detectar i les cèl·lules s'incuben en aquesta solució durant tota la nit a una temperatura de 4 °C.

### **Incubació amb l'anticòs secundari marcat**

Al dia següent es renten les cèl·lules amb PBS(1x) i es prepara una dilució adient de l'anticòs secundari que reconeixerà l'anticòs primari que s'ha utilitzat en el pas anterior. Aquest anticòs secundari porta unida a ell una molècula fluorescent Alexa, que al ser excitada amb una longitud d'ona determinada emetrà fluorescència que es detecta per microscòpia.

---

## **Immunohistoquímica**

---

### **Perfusió dels animals i obtenció dels talls histològics**

Els animals van ser perfosos a través del cor amb sèrum salí seguit de paraformaldehid (PFA, 4%) en tampó fosfat (pH 7,4). Posteriorment els cervells obtinguts es van postfixar durant tota la nit amb la mateixa solució fixadora a 4°C. Al dia següent es va procedir a eliminar el PFA 4% i es van mantenir a 4°C immersos en tampó fosfat fins al moment d'utilitzar-los. De cada cervell es van obtenir seccions coronals de 30 µm de gruix utilitzant un vibràtom. Les seccions obtingudes es van conservar en solució crioprotectora -20°C fins al moment de realitzar l'assaig immunohistoquímic.

### **Immunohistoquímica de les seccions pel procés de flotació**

En el procés de flotació els talls es recullen i processen en recipients especialment dissenyats: cilindres oberts per la base. En cada recipient es poden processar diverses seccions. Totes les incubacions i rentats es fan en agitació constant, en un agitador rotatori o orbital per assegurar la màxima penetració i homogeneïtat de tinció. Un cop obtinguts els talls i abans d'iniciar les incubacions amb els anticossos s'han de fer diverses incubacions i rentats per tal de facilitar la penetració dels anticossos i disminuir el marcatge inespecífic.

### **Bloqueig de peroxidases endògenes**

En primer lloc cal eliminar les peroxidases endògenes de la mostra, el teixit dels animals és molt ric en peroxidases que poden interferir en el resultat final. Per a eliminar-les, els talls o seccions s'introdueixen en una solució de peròxid d'hidrogen al 3% i metanol al 10 % en PBS (1X), durant 25 minuts. Després de la incubació es realitzen diversos rentats en PBS (1X) i posteriorment 3 rentats de 5 minuts en una solució de Tritó X100 al 0.5% en PBS per a permeabilitzar el teixit.

### **Bloqueig de unions inespecífiques**

Posteriorment s'utilitza una solució de bloqueig per a evitar o disminuir les possibles unions inespecífiques dels anticossos utilitzats durant l'assaig, ocupant els llocs d'unió a IgG que hi ha en els teixits. El bloqueig es realitza incubant els talls en una solució de bloqueig en PBS(1X) amb un 3% de sèrum, un 0.2% de tritó X100 i un 0.2% de gelatina.

### **Incubació amb l'anticòs primari**

Posteriorment es prepara una dilució adient de l'anticòs primari específic contra la proteïna que es vol detectar i les cèl·lules s'incuben en aquesta solució durant tota la nit a una temperatura de 4 °C. La solució d'incubació amb l'anticòs conté un 0.1% de sèrum, un 0.2% de tritó X100 i un 0.2% de gelatina.

### **Incubació amb l'anticòs secundari**

Al dia següent es renten les cèl·lules amb PBS(1X) i es prepara una dilució adient d' un anticòs secundari biotinitat, que reconeixerà l'anticòs primari que s'ha utilitzat en el pas anterior. La incubació es realitza a temperatura ambient durant 1 hora. La solució d'incubació amb l'anticòs conté un 0.1% de sèrum, un 0.2% de tritó X100 i un 0.2% de gelatina. Com a anticòsos secundaris es va utilitzar anticòsos monoclonals o policlonals de cavall biotinitats, específics contra la IgG de ratolí.

### **Incubació amb el complex avidina-peroxidasa**

Després de diversos rentats les seccions es van incubar en una solució amb un 1% del complex avidina-biotina-peroxidasa, utilitzant el kit ABC (Vector Laboratories), seguint les recomanacions del fabricant.

### **Revelat amb diaminobenzidina**

La reacció es va visualitzar amb 0,05% diaminobenzidina (Sigma) en peròxid d'hidrogen al 0,03% en PBS. El revelat es va realitzar a temperatura ambient durant un temps variable, dependent de l'anticòs utilitzat, que podem controlar a través de comprovacions en el microscopi. Quan s'assoleix el contrast desitjat, la reacció s'atura amb diversos restats amb PBS. El precipitat que s'obté és de color marró.

### **Revelat per doble immunohistoquímica**

A continuació es va realitzar un segon assaig immunohistoquímic per a colocalitzar un segon antigen, repetint els passos corresponents a les incubacions amb l'anticòs primari i secundari que s'han descrit anteriorment, amb la diferència que el marcatge de l'anticòs secundari ha de ser diferent a la diaminobenzidina per a poder distingir els dos marcatges.

El revelat es va realitzar en una solució de dihidroclorur de benzidina al 0,01% i al 0,025% de nitroprussiat sòdic e tampó fosfat a pH6. Finalment s'observa un precipitat

de color blau intens que es distingeix fàcilment del precipitat marró de la diaminobencidina.

Anticòs secundari	Dilució	Aplicació	Casa comercial
ECL Rabbit IgG, HRP-Linked (ab') <sub>2</sub> Fragment	1:2000	WB	Amersham, (Ref. NA934V)
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:4000	WB	Bio-Rad, (Ref. 170-6516)
Alexa Fluor 488 (ab') <sub>2</sub> Fragment of Goat Anti-mouse IgG	1:1000	ICC	Invitrogen, (Ref. A-11017)
Alexa Fluor 488 (ab') <sub>2</sub> Fragment of Goat Anti-rabbit IgG	1:1000	ICC	Invitrogen, (Ref. A-11070)
Alexa Fluor 546 (ab') <sub>2</sub> Fragment of Goat Anti-mouse IgG	1:1000	ICC	Invitrogen, (Ref. A-11018)
Alexa Fluor 546 (ab') <sub>2</sub> Fragment of Goat Anti-rabbit IgG	1:1000	ICC	Invitrogen, (Ref. A-11071)

2

Taula M7. Llistat d'anticòs secundaris.

## Materials i mètodes

Anticòs	Epítop	Dilució	Aplicació	Casa comercial
Actina	Mouse monoclonal	1:100000	WB	SigmaAldrich (Ref. A5060)
COX-1	Mouse monoclonal	1:500	IHC	CaymanChemicals, (Ref. 160110)
COX-2	Mouse monoclonal	1:500	IHC	BD Bioscience, (Ref. 10203)
COX-2	Rabbit polyclonal	1:500	WB	CaymanChemicals, (Ref. 160126)
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Rabbit polyclonal	1:1000	WB	Cell Signalling, (Ref. 4377)
GFAP	Mouse monoclonal	1:500	ICC, IHC	Dako, (Ref. Z0334)
GFAP	Rabbit polyclonal	1:500	ICC, IHC	SigmaAldrich, (Ref. G3893)
GAPDH	Mouse monoclonal	1:1000	WB	
Iba-1	Rabbit polyclonal	1:1000	ICC, IHC	WakoPureChemicalIndustries, (Ref. 019-19741)
IκB-α	Rabbit polyclonal	1:1000	WB	SantaCruzBiotech., (Ref. Sc-371)
p-Ser <sup>396</sup> IRF3	Mouse monoclonal	1:1000	WB	Cell Signalling, (Ref. 4947S)
IRF3	Rabbit polyclonal	1:1000	WB	Cell Signalling, (Ref. 4962)
JAK1 (HR-785)	Rabbit polyclonal	1:500	WB	SantaCruzBiotech., (Ref. Sc-277)
JAK2 (HR-758)	Rabbit polyclonal	1:500	WB	SantaCruzBiotech., (Ref. Sc-278)
p-Thr <sup>183</sup> /Tyr <sup>185</sup> JNK	Rabbit polyclonal	1:1000	WB	Cell Signalling, (Ref. 9251)
NFκB p50	Goat polyclonal	1:1000	WB	SantaCruzBiotech., (Ref. Sc-1190)
NFκB p65	Rabbit polyclonal	1:1000	WB	SantaCruzBiotech., (Ref. Sc-372)
p-Thr <sup>180</sup> /Tyr <sup>182</sup> p38	Rabbit polyclonal	1:1000	WB	Cell Signalling, (Ref. 9211)
p-Tyr <sup>701</sup> STAT1	Rabbit polyclonal	1:1000	WB	Cell Signalling, (Ref. 9171)
STAT1	Mouse monoclonal	1:1000	WB	BD Bioscience, (Ref. 10186)
p-Tyr <sup>705</sup> STAT3	Rabbit polyclonal	1:1000	WB	Cell Signalling, (Ref. 9131)
TLR-4	Rabbit polyclonal	1:1000	WB	Abcam (Ref. ab13556)
TBP	Mouse monoclonal	1:1000	WB	Abcam, (Ref. 38238)
β-Tubulina	Mouse monoclonal	1:50000	WB	SigmaAldrich, (Ref. T4026)
VCAM-1	Goat polyclonal	1:5000	WB	SantaCruzBiotech., (Ref. Sc-1504)

2

Taula M8. Llistat d'anticosos primaris.

## Zimografia en gelatina

---

És una tècnica enzimàtica que serveix per a detectar l'activitat de determinades gelatinases, la gelatinasa A (MMP-2) i la gelatinasa B (MMP-9), detectant la degradació del substrat gelatina en gels de poliacrilamida.

### *Recollida de les mostres*

Es fan diversos rentat de les cèl·lules en cultiu, aquest pas és important perquè el sèrum que s'utilitza en el medi de cultiu conté MMPs que podrien interferir en el resultat final. Es recullen les cèl·lules en un tampó de lisi (RiPA+complete), i es soniquen les mostres. Els homogenats es centrifuguen a 1200 x g durant 5 minuts a 4 °C, per a eliminar els debris i es recull el sobrenedant en vials nous.

### *Extracció de les gelatinases de les mostres*

Es separa una quantitat de sobrenedant per a realitzar la quantificació de proteïna de la mostra, mitjançant un assaig de Bradford. També es pot separar part de la mostra per a realitzar un assaig de WB.

La resta del sobrenedant s'utilitza per a fer la zimografia en gelatina.

Les mostres s'incuben amb 25 µl de gelatina safarosa 4B (Pharmacia) de gelatina, durant 1 hora a 4 °C. Posteriorment es separen les gelatinases adherides a les perles de safarosa mitjançant una incubació amb un tampó d'elució durant 30 minuts a 4 °C. Posteriorment es centrifuguen les mostres i es guarda el sobrenedant a -80 °C.

### *Preparació del gel d'acrilamida amb gelatina*

Es prepara un gel d'acrilamida al 10%, afegint gelatina a una concentració final de 1mg/ml.



### *Preparació de les mostres per electroforesi*

Es carreguen en un gel un volum determinat de mostra (segons l'assaig Bradford es carrega la mateixa quantitat de proteïna a cada pou), i s'afegeix un volum igual (1:1) de tampó de càrrega per zimografies.

També es carrega un estàndard de gelatinases, a partir d'una barreja de MMP-2 i MMP-9 (CC073, Chemicon International, Inc.), com a control positiu; i un marcador de pes molecular.

Finalment es carreguen les mostres en el gel preparat i es corre el gel d'acrilamida durant 1 hora, a 100 V.

### *Incubació i tinció del gel*

Agafem el gel i fem diversos rentats, fem un primer rentat amb H<sub>2</sub>O destil·lada, seguit de 3 rentats més de 15 minuts de durada en una solució de tritó (X-100) al 2,5%, i finalment tornem a rentar el gel en H<sub>2</sub>O per a eliminar el tritó. Després dels rentats incubem el gel en una solució d'incubació durant 42 hores en una estufa a 37 °C. Posteriorment el gel s'incuba en una solució de tinció amb blau tripa en agitació suau i constant.

### *Escanejat del gel*

L'anàlisi de la densitat de les bandes s'ha realitzat utilitzant el *software* Quantity One (BioRad). En aquests tipus de gels, la zona on s'ubica la proteasa apareix com una zona més clara degut a que ha degradat la gelatina. Aquesta degradació es revela tenyint el gel amb colorants que tinguin afinitat per proteïnes, observant-se una zona que no es tenyeix o es tenyeix poc.

SOLUCIÓ/TAMPÓ	PREPARACIÓ
	80mM Tris-HCl (pH 6.8)
<b>Tampó de càrrega</b>	4% SDS
<b>zimografia</b>	10% Glicerol
	0.01% Blau de Bromofenol
	50mM Tris-HCl (pH 7.6)
<b>Tampó d'incubació</b>	10mM CaCl <sub>2</sub>
<b>zimografia</b>	0.02% NaN <sub>3</sub>
	0.1% Amidó Black
<b>Tampó de tinció</b>	10% Àcid acètic
	30% Metanol, en aigua destil·lada
<b>Tampó de destinció</b>	10% Àcid acètic
	30% Metanol, en aigua destil·lada

Taula M9. Fórmula de les solucions necessàries per l'assaig de zimografia en gelatina.

## Silenciament gènic: RNAs d'interferència

---

El silenciament gènic mitjançant ARNs d'interferència s'indueix a través de molècules petites d'ARN de doble cadena d'uns 21-27 nucleòtids denominades siRNAs (*small interfering RNA*). És un fenomen que es dona de forma natural en l'organisme, i està implicat en el desenvolupament i en la defensa contra agents infecciosos. Diferents mecanismes cel·lulars provoquen la separació de les dues cadenes del siRNA, aleshores la cadena antisentit del siRNA pot unir-se a una cadena d'ARNm de manera específica per complementaritat de bases, provocant que el complex resultant sigui reconegut i degradat.

Els siRNAs poden ser introduïts artificialment en l'organisme per tal de silenciar un gen específic. Qualsevol gen del que se sàpiga la seqüència pot ser la diana d'un siRNA dissenyat a mida amb la seqüència complementària a la d'aquest gen, de forma que cada siRNA és altament específic per a la seqüència de nucleòtids diana al que degrada.

### Transfecció amb Oligofectamina

La transfecció es va realitzar quan els cultius havien assolit una densitat aproximada de 70-80% . En primer lloc es van preparar dos vials, en el primer es va preparar la dilució del reactiu Oligofectamina (Invitrogen) a una concentració final de 4µl/ml en 50µl de medi Opti-MEM sense sèrum i es va incubar durant 5 minuts. Paral·lelament, en un vial diferent es va preparar la dilució del siRNA per a obtenir una concentració final de 100 nM en 50µl de medi Opti-MEM, també sense sèrum. Després de preparar les dilucions es mesclaven els dos vials (Vt=100µl) i la barreja s'incubava durant 20-30 minuts. Durant la incubació s'aspirava el medi de creixement de les cèl·lules que es volien transfectar i s'afegia medi DMEM:F12 fresc sense sèrum. Després de la incubació s'afegia un volum adient dels complexos formats als cultius cel·lulars. Al dia següent s'addicionava medi fresc DMEM:F12 amb sèrum. El tractament dels cultius es realitza 2-3 dies després de la transfecció.

Proteïna	Espècie	Producte	Referència
IFN- $\beta$	rata	ON-TARGETplus SMARTpool, rató IFN $\beta$ 1, NM_019127	L-094752-01-0010
JAK1	rata	ON-TARGETplus SMARTpool, rató JAK1, XM_342872	L-101621-01
JAK2	Rata	ON-TARGETplus SMARTpool, rató JAK2, NM_031514	L-088340-01
NF $\kappa$ B	Rata	ON-TARGETplus SMARTpool, rató p65, NM_199267	L-0800033-01
Stat1	Rata	ON-TARGETplus SMARTpool, rató STAT1, NM_001034164	L-080050-01
TLR4	rata	ON-TARGETplus SMARTpool, rató TLR4, NM_019178	L-090819-00

?

**Taula M10. Llistat dels siRNAs utilitzats en aquest treball, Thermo Fisher Scientific Dharmacon.**

## Anàlisi de l'Expressió gènica: RT-PCR

---

L'anomenada PCR a temps real és una tècnica que permet amplificar i quantificar una molècula d'ADN determinada simultàniament. La quantitat pot ser un valor absolut de còpies o una quantitat relativa quan es va normalitzar a la entrada de ADN o gens d'expressió constitutiva que actuen com a patró de normalització.

### Extracció de l'ARN

Per a l'extracció de l'àcid ribonucleic (ARN) total dels astròcits en cultiu es va utilitzar el kit *Pure Link™ RNA Mini Kit* (Ambion, Invitrogen), seguint les instruccions recomanades pel fabricant.

Posteriorment, es va quantificar l'ARN amb un espectrofotòmetre NanoDrop (ND-1000 *spectrophotometer*), es van mesurar les absorbàncies a 260nm, 280nm i 230 nm, i es va comprovar la puresa de l'ARN obtingut amb la mesura dels ràtios 260/280 proper a 2, i 260/230 proper a 1.8.

### Transcripció inversa (RT) o retrotranscripció

A partir de l'ARN aïllat es va sintetitzar ADN complementari mitjançant l'enzim *M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant* (Promega).

En cada reacció de transcripció inversa es va utilitzar: 1µg d'ARN aïllat, 1.6 unitats de RNase OUT™, 20 ng d' Oligo(dT)<sub>15</sub> primer, en un volum final de 14 µl d'aigua MilliQ estèril. Aquesta barreja s'escalfa a 70°C durant 5 minuts, i després es refreden les mostres ràpidament en gel durant 5 minuts més. A continuació s'afegeixen 200 unitats de l'enzim *M-MLV Reverse Transcriptase*, una concentració final de 50 µM d'una barreja de dNTPs, 5 µl del tampó indicat pel correcte funcionament de l'enzim, i es porta tot a un volum final de 25 afegint aigua MilliQ estèril, i la nova barreja s'incuba 50 minuts a 50 °C. Passat aquest temps la reacció s'inactiva incubant la mescla a 70°C durant 15 minuts.

L' *Oligo(dT)<sub>15</sub> primer* és un polímer de deoxitimidines que es va utilitzar com a encebador per amplificar únicament l'ARN missatger, ja que suposa aproximadament un 2% del total de l'ARN aïllat inicialment, les deoxitimidines de l'encebador hibridaran amb la cua d'adenines que posseeixen els ARNs missatgers.

### Real-Time PCR

Es va utilitzar el sistema *iCycler iQ™ Multi-Color Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad), i el SYBR GreenER (Invitrogen), que és un fluorocrom que s'uneix a l'ADN de doble cadena a mida que aquest es va sintetitzant. En comparació amb altres mètodes existents, l'ús de SYBRGreen té la limitació que també pot intercalar-se en productes de PCR amplificats de manera inespecífica, que poden influir en la mesura de fluorescència final que correspon a l'amplificació del gen diana. L'especificitat i sensibilitat d'aquest mètode estaran determinades per la qualitat dels encebadors utilitzats en la reacció.

Cada reacció de PCR es va realitzar per triplicat en un volum final de 12 µl utilitzant 6 µl de SYBR GreenER (Invitrogen), 0.625 µM de cada encebador, i 2 µl de cDNA procedent de la reacció de transcripció inversa. Paral·lelament, es prepara una recta estàndard per a cada gen que es vol analitzar. Es va analitzar l'expressió de diferents gens com a possibles controls d'expressió (HPRT1, SDHA, YWHAZ i RPL14) i es va escollir el gen control RPL14, que va mostrar la millor estabilitat després del tractament amb LPS.

Les condicions d'amplificació utilitzades van ser les següents: un primer pas d' 1 min a 50 ° C, un segon pas de desnaturalització i activació de la polimerasa d' ADN de 8 minuts i 30 segons a 95 ° C, seguit de 40 cicles d'amplificació, que contenen de 15 segons a 95 °C, i 30 segons a 60 °C. Posteriorment, es van analitzar les corbes de fusió de cada cicle per a garantir l'absència de productes no específics. La quantificació es va realitzar mitjançant la normalització de Ct (*cycle threshold*) dels gens diana, respecte els valors de les Ct del gen control, i es va analitzar segons el mètode de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak i Schmittgen, 2001).

La llista dels encebadors utilitzats es presenta en les taules M11 i M12. Els encebadors utilitzats van ser dissenyats en els límits exó-intró per a cada gen d'interès, amb l'ajuda

del programa Primer3, per a excloure la possible amplificació d'ADN gnòmic. Els encebadors es van adquirir de IDT (Conde, Espanya).

Rat	Gen	Primer Sequence 5' → 3'	Accesion number
	<b>β-Actina</b>	F: AACCTTCTTGCAGCTCCTC R: CTGACCCATACCCACCAT	NM_031144.2
	<b>CD11b</b>	F: TTGGGAGATGTGAATGGAG R: ACTGATGCTGGCTACTGATG	NM_012711
	<b>COX-2</b>	F: GATTGACAGCCCACCAACTT R: CGGGATGAACTCTCTCCTCA	NM_017232
	<b>Erg-1</b>	F: ACAACCTACGAGCACCTG R: AGCCACTGACTAGGCTGAA	NM-012551
	<b>IL-15</b>	F: AACTGAGGCTGGCATCCAT R: GAGAAAGCAGTTCATTGCAG	NM_13129.2
	<b>IL-27</b>	F: CCCAATGTTTCCCTGACCTTCC R: ATTGCCACAGCTGCTCCCTCTC	XM_002725687
	<b>INF-β</b>	F: GAGGCAGCTGAATGGAAGG R: GAATGGCAAAGGCAGTGTAAC	NM_019127.1
	<b>IP-10</b>	F: GGCCATAGGAAAATTGAAATC R: ATTGTGGCAATGATCTCAACAT	NM_0139089
	<b>MHC-II</b>	F: GAGACCATCTGGAGACTTG R: LATCTGGGGTGTGTTGGA	NM_053529
	<b>MMP-9</b>	F: TATTGGAAGTTCTCGAATCAC R: LAAGTCGAATTTCCAGATACG	NM_031055.1
	<b>RPL14</b>	F: TCTTTGCCTATGTCAGAGGA R: ATAGGTATCTTAATTCGAGTCCC	NM_022949
	<b>SOCS-1</b>	F: TCCGCACCTTCCGCTCCCACTCT R: GCCCATGCACGCTCAGG	NM_145879
	<b>TLR-4</b>	F: GTTGATGGAAAAGCCTTGA R: CCTGTGAGGTCGTTGAGGTT	NM_019178
	<b>TNF-α</b>	F: GGGCCACCACGCTCTTCTGTC R: TGGGCTACGGGCTTGTCACCTCG	MN_012675.3

?

?

Taula M11. Llistat d'encebadors de rata utilitzats en *Real-Time PCR*.

Mouse genes	Primer Sequence 5' 3'	Accession number
<b>TNF-a</b>	F: GGGCCACCACGCTCTTCTGTG R: GGGCTACGGGCTTGCTACTCG	NM_013693
<b>Cox-2</b>	F: CACTTCAAGGGAGTCTGGA R: AGTCATCTGCTACGGGAGGA	NM_011198.3
<b>Cox-1</b>	F: TGCTGGGGCAGTGTGGAG R: GGGGCTGAGTAGCCCGTG	NM_008969.3
<b>IL-6</b>	F: ATGGATGCTACCAAAGTGA R: TCTGAAGGACTCTGGCTTTG	NM_031168
<b>MMP-9</b>	F: CTTCTCTGGACGTCAAATGTG R: AAGAATTTGCCATGGCAG	NM_013599.2
<b>MMP-3</b>	F: CATGGAGCCAGGATTTCCCAGGA R: TGCCATAGCACATGCTGAACAAAGCA	NM_010809.1
<b>mPGES-1</b>	F: AGCCAGATGAGGCTGCGGA R: AGCAAGGCGTGGGTTTCAGC	NM_002415.2
<b>PGIS</b>	F: GTGGAGGCTCACACGCAC R: CCGGGCCTGCATCTCCTCT	NM_008968
<b>TS</b>	F: ACACGGGAGGCAGCACAGG R: GGCCAGCTCCAAAGGGCAG	NM_0011539.3
<b>PGDS</b>	F: TGGTCCTCCTGGGTCTCTTGGGAT R: GTAGAGGGTGGCCATGCGGA	NM_008963.2
<b>LOX5</b>	F: ACCAGTTCCTGGCTGCCCC R: GCAGGCAGCTGGCGGTACAT	NM_009662.2
<b>epoxigenasa</b>	F: GGTGTGTGATCTGGTCCGTA R: CACTTCTTCAGCCACTGCC	NM_008898
<b>CD11B</b>	F: AAGCAGCTGAATGGGAGGAC R: GAATGACCCCTGCTCTGTCT	NM_001082960
<b>RPL14</b>	F: GCTTTAGTGGATGGACCCT R: ATTGATATCCGCCTTCTCCC	NM_025974

?

Taula M12. Llistat d'encebadors de ratolí utilitzats en *Real-Time* PCR.



## Anàlisi de l'activitat transcripcional de NFκB

---

La determinació de l'activitat transcripcional de NFκB es va dur a terme amb el kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega), seguint les instruccions recomanades pel fabricant. En l'assaig es mesura l'expressió simultània de dos enzims individuals dins d'un únic sistema.

En l'assaig es va utilitzar el vector reporter pNFκB-Luc, dissenyat pel control de l'activació de la via de transducció de senyal NFκB, que contenia la seqüència de cDNA que codifica per l'enzim *firefly Luciferase (Pyralis Photinus)* sota control d'un promotor *TATA-like* amb diverses còpies de la seqüència de consens de NFκB fusionades a ell. També es va utilitzar un segon vector, pRL-CMV que contenia la seqüència de cDNA que codifica per l'enzim *Renilla Luciferase (Renilla reniformis)* sota control de la regió promotora del citomegalovirus (CMV).

### Transfecció dels vectors amb Lipofectamina

La transfecció es va realitzar quan els cultius havien assolit una densitat aproximada de 70-80%. En primer lloc es van preparar dos vials, en el primer es va preparar la dilució del reactiu Lipofectamina a una concentració final de 4μl/ml en 50μl de medi Opti-MEM sense sèrum i es va incubar durant 5 minuts. Paral·lelament, en un vial diferent es va preparar la dilució del material genètic que es volia transfectar, 1μg del vector reporter pNFκB-luc i 1ng del vector control pRL-CMV en 50μl de medi Opti-MEM, també sense sèrum. Després de preparar les dilucions es mesclaven els dos vials (Vt=100μl) i la barreja s'incubava durant 20-30 minuts. Durant la incubació s'aspirava el medi de creixement de les cèl·lules que es volien transfectar i s'afegia medi DMEM:F12 fresc sense sèrum. Després de la incubació s'afegia un volum adient dels complexos formats als cultius cel·lulars. Al dia següent s'addicionava medi fresc DMEM:F12 amb sèrum.

### Assaig Luciferase

L'assaig es va dur a terme seguint les instruccions recomanades pel fabricant. En resum, cultius d'astròcits prèviament transfectats amb els vectors pNFκB-Luc i pRL-CMV, van ser tractats amb el LPS. Després del tractament es van recollir les mostres en un tampó adequat i es va mesuren les activitats dels enzims luciferases *firefly* i Renilla. En primer lloc es va addicionar el Reactiu II (LAR II) a cada mostra, generant un senyal lluminós estable. Després de quantificar l'activitat de la luciferasa *firefly*, es va addicionar un segon reactiu en el mateix tub, el reactiu Stop & Glo, que actua aturant l'activitat de la luciferasa *firefly* i permetent l'activitat de la luciferasa Renilla. El reactiu Stop & Glo també produeix un senyal lluminós estable. Les lectures de les diferents activitats enzimàtiques es va realitzar amb un luminòmetre Oion II microplate luminometer (Berthold).

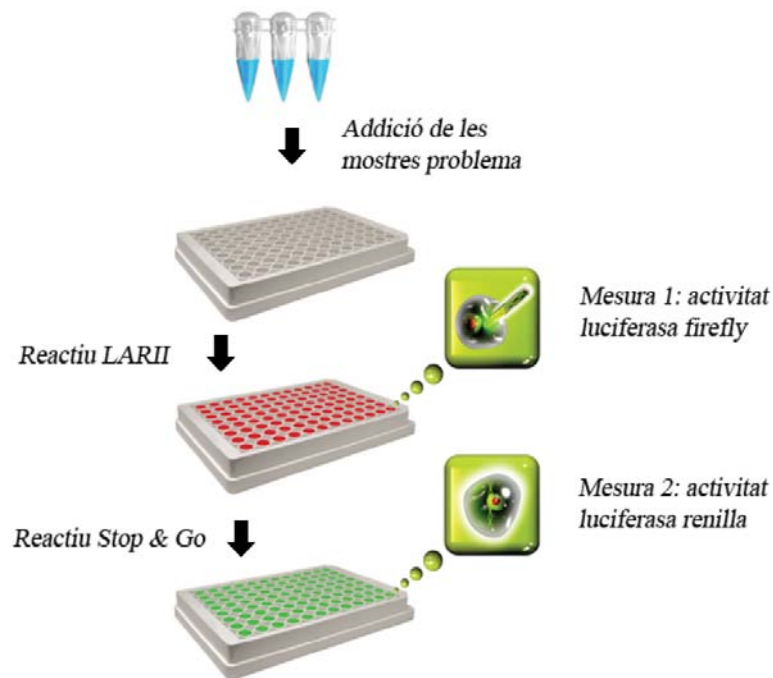


Figura M1. Esquema resum de la lectura de l'assaig luciferasa.

## Materials i mètodes

D'aquesta manera, l'expressió de l'enzim *firefly Luciferase* (pyralis Photinus) es correlacionava amb l'efecte de les condicions experimentals de l'estudi, ja que el gen es trobava sota control de la regió promotora de NFkB. L'expressió de l'enzim *Renilla Luciferase* actuava com a control intern, ja que el gen es trobava sota control d'un promotor constitutiu. La normalització de l'activitat *firefly Luciferase respecte* a l'activitat del control intern *Renilla Luciferase*, minimitza la variabilitat experimental causada per les diferències en la viabilitat cel·lular o l'eficiència de transfecció.

Producte	Casa comercial	Referència
Vector p-NFkB-Luc	Clontech	631.904
Vector pRL-CMV	Promega	TB237
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega	TM040
Lipofectamina	Invitrogen	18324
Orion II Microplate Luminometer	Bioscience Technology	1089

?

Taula M13. Material utilitzat en l'assaig luciferasa.

## Anàlisi de l'activitat proteica per ELISA

### Mesura de la concentració dels prostanoids PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> i TxB<sub>2</sub>

La mesura dels prostanoids PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> i TXA<sub>2</sub> alliberats en el medi de cultiu es va dur a terme per separat amb kits d'EIA (Enzyme Immunoassay), seguint les instruccions del fabricant.

La PGI<sub>2</sub> té una vida mitjana bastant curta, d'uns 60 minuts en plasma sanguini, i d'uns 2-3 minuts en una solució tamponadora, cosa que dificulta la mesura d'aquesta PG en el laboratori. La mesura de la concentració de la PGI<sub>2</sub> en els medis de cultiu, així com en el cas d'altres mostres biològiques, es realitza mesurant la 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, que s'obté amb la hidratació no enzimàtica de la prostaciclina PGI<sub>2</sub>, i s'ha vist que és molt estable.

El TXA<sub>2</sub> també té una vida mitjana molt curta, d'uns 37 segons, en mostres fisiològiques, cosa que dificulta la mesura d'aquesta PG en el laboratori. La mesura de la concentració de la TXA<sub>2</sub> en els medis de cultiu, així com en el cas d'altres mostres biològiques, es realitza mesurant la TXB<sub>2</sub>.

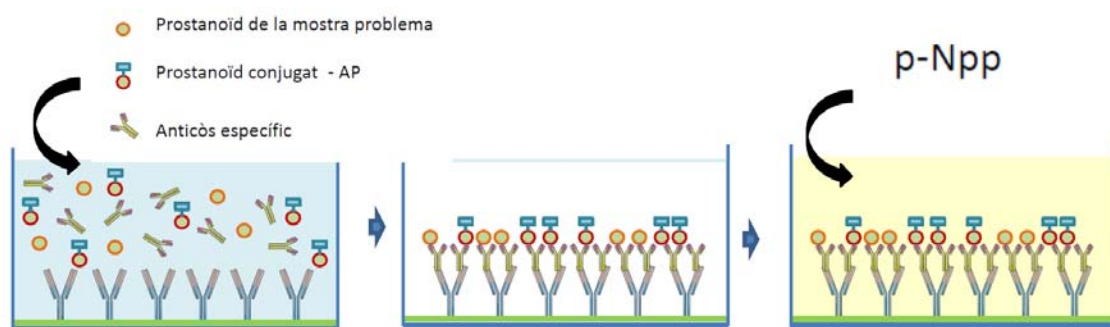


Figura M2. Assaig d'ELISA competitiu prostanoid.

La determinació quantitativa dels diferents prostanoid es va realitzar mitjançant un assaig immunològic competitiu. En l'assaig es va utilitzar un anticòs policlonal per

enllaçar, de manera competitiva, el prostanoid de la mostra problema. Es va dur a terme la incubació simultània de la mostra problema amb una concentració coneguda del mateix prostanoid marcat amb una molècula de fosfatasa alcalina unida a ella de forma covalent. Posteriorment es va eliminar l'excés de reactius mitjançant diversos rentats, i es va afegir la solució amb el substrat p-nitrofenilfosfat. Després d'un temps d'incubació la reacció enzimàtica s'atura amb l'addició d'una solució de fosfat de sodi. Es fa una mesura de densitat òptica (D.O.) de les mostres en un lector de microplaques a 405 nm, on la intensitat colorimètrica serà inversament proporcional a la concentració de cada prostanoid.

---

### Mesura de la concentració de LTC<sub>4</sub>

---

La determinació de la concentració de les citocines TNF- $\alpha$  i IL-6 alliberades en el medi de cultiu es va mesurar per separat amb kits d'ELISA específics, seguint les instruccions del fabricant. La determinació quantitativa del Leucotrié C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) es va realitzar mitjançant un immuno-assaig competitiu, basat en la competició entre el LTC<sub>4</sub> de la mostra problema amb el LTC<sub>4</sub> conjugat amb l'enzim acetilcolinesterasa (AChE), que s'afegeix a una concentració coneguda i constant, per a unir-se a un anticòs específic contra LTC<sub>4</sub> que afegim també de forma exògena. En l'assaig es va utilitzar un anticòs monoclonal per enllaçar l'anticòs contra LTC<sub>4</sub> afegit. Després d'una incubació simultània es va eliminar l'excés de reactius mitjançant diversos rentats, i es va afegir el substrat de l'enzim AChE, el reactiu d'Ellman. Els pous adquireixen una coloració groga. Es fa una mesura de densitat òptica (D.O.) de les mostres en un lector de microplaques a 412 nm, on la intensitat colorimètrica serà inversament proporcional a la concentració de LTC<sub>4</sub>.

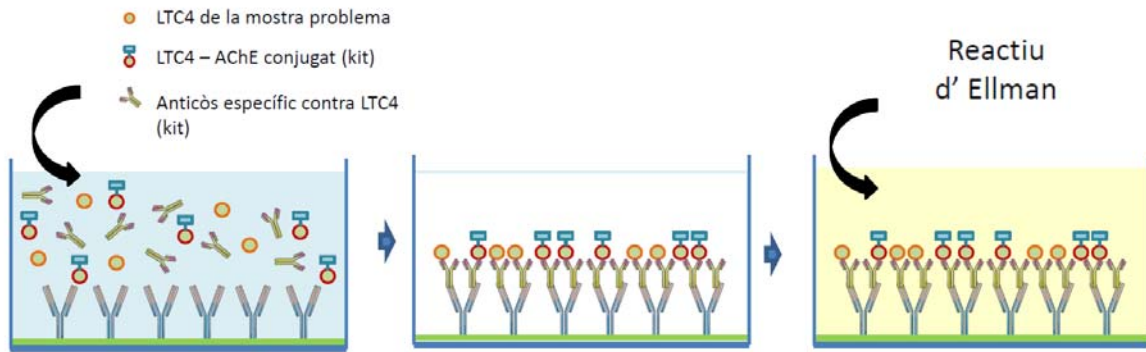


Figura M3. Assaig d'ELISA competitiu LTC4.

### Mesura de la concentració de les citocines INF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ i IL-6

La determinació de la concentració de les citocines TNF- $\alpha$  i IL-6 alliberades en el medi de cultiu es va mesurar per separat amb kits d'ELISA específics de tipus *sandwich*, seguint les instruccions del fabricant. En resum, es va fixar l'anticòs de captura, específics per a la citocina, en la base dels pouets d'una placa de 96 pous. Després dels rentats adients es va afegir la mostra problema, i paral·lelament dilucions seriades d'una citocina comercial de concentració coneguda per a establir la corba estàndard. Posteriorment es van realitzar incubacions seriades amb l'anticòs de detecció (conjugat amb biotina), l'enzim peroxidasa de detecció *Avidin-HRP*, i la solució substrat de tetrametilbencidina. Finalment es va aturar la reacció i es va realitzar la lectura de la placa a una longitud d'ona de 450 nm.

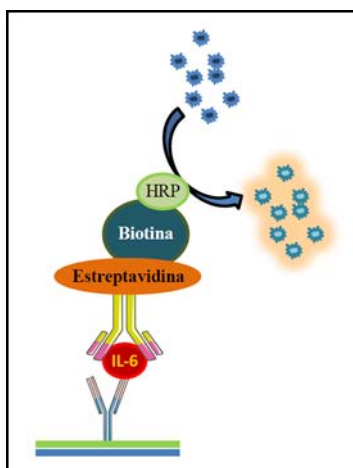


Figura M4. Assaig d'ELISA en *sandwich* de la citocina IL-6.

## **Assaig de l'activitat histona acetiltransferasa de p300/CBP per immunoprecipitació**

---

L'activitat histona acetiltransferasa (HAT) de la proteïna p300 es va determinar amb el kit *p300/CBP Immunoprecipitation HAT Assay Kit* (# 17-284, Millipore, Temecula, CA, EUA), seguint les instruccions del fabricant.

Cultius d'astròcits van ser exposats a LPS durant 2 hores en presència o absència de l'inhibidor de la fosforilació de p38 SB239063. Es van recollir les cèl·lules i es van obtenir els extractes nuclears utilitzant el kit Nuclear extract kit (#40010, Active Motif).

Es van utilitzar 100µg d'extractes nuclears que es van incubar 5 µg d' un anticòs específic contra p300. Paral·lelament, 100µg de les mateixes mostres es van incubar amb un anticòs anti-tubulina (Sigma) del mateix isotip, i es van utilitzar com a controls negatius.

Els immunocomplexes formats es van incubar amb Proteïna G unida a perles d'agarosa. Després de la incubació es va procedir al rentat i aïllament de les perles d'agarosa, que posteriorment es van tornar a incubar amb la solució d'assaig HAT, composta per la Histona H4, acetil-CoA i acetil-CoA marcat radioactivament amb triti ([<sup>3</sup>H]Ac-CoA 0.25mCi/ml). Després de la incubació es van fixar la proteïna en tires de paper de filtre amb àcid tricloracètic. Posteriorment, les tires es van introduir en vials de centelleig i es va quantificar la radioactivitat emesa (DPM) en un comptador de centelleig-® (Beckman).

## **Determinació del grau de fosforilació dels residus de serina S468 i S536 de NFκB**

---

El grau de fosforilació de determinats residus de serina en el factor de transcripció NFκB es va determinar amb el kit d' ELISA (FACE NFκB p65 <sup>TM</sup> Profiler, amb motius Actiu, CA, EUA), seguint les instruccions del fabricant.

En resum, els astròcits es van cultivar en plaques de 96 pous i després del tractament amb el LPS, les cèl·lules van ser rentades i fixades amb formaldehid al 4% durant 20 minuts. Posteriorment, les cèl·lules van ser tractades amb una solució amortidora, per suprimir l'activitat de la peroxidasa endògena, i es van incubar amb anticossos monoclonals específics contra els residus de serina S468 i S536 de la subunitat p65 de NFκB, així com de NFκB total, durant la nit a 4 ° C. La unió dels anticossos primaris es va detectar mitjançant la incubació amb un anticòs secundari conjugat a l'enzim amb activitat peroxidasa, i amb la posterior adició del substrat TMB. La reacció va ser aturada amb àcid sulfúric 2N i la densitat òptica D.O. es va mesurar a 450 nm en un lector de plaques espectrofotomètric (Labsystems IEMS lector).

Proteïna	Kit	Casa comercial	referència
IFN-β	Mouse Interferon beta ELISA kit	VeriKine™	42400-1
TNF-α	Rat TNF-α ELISA Kit	Diaclone	860.040.048
TNF-α de ratolí	Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience	88-7324-88
IL-6 de ratolí	Murine IL-6 ELISA kit	Diaclone	861.020.005
6-ceto-prostaglandina F1α	6-keto-Prostaglandin F1α Enzyme Immunoassay Kit	Assay Dessigns	900-004
TxB <sub>2</sub>	TXB <sub>2</sub> ELISA kit	Assay Dessigns	900-002
PGE <sub>2</sub>	High Sensitivity Prostaglandin E2 Enzyme Immunoassay Kit	Assay Dessigns	900-001
LTC <sub>4</sub>	Cysteinyl Leukotriene Express EIA kit	Cayman Chemicals	1000929
NFκB total p- S468 i p- S536	FACE NFκB p65™ Profiler	Actif Motif	101490
Activitat HAT de p300	p300/CBP Immunoprecipitation HAT Assay Kit	Millipore	17-284

2

Taula M14. Llistat dels kits d'ELISA utilitzats.



## Anàlisi estadístic

---

L'anàlisi estadístic dels resultats es va realitzar amb el programa GraphPad (GraphPad Software Inc.). Per l'anàlisi estadístic de les dades es va utilitzar el test de variància One-way (ANOVA), i la prova *Student's T-test* després de verificar la distribució normal de les dades. En el cas de l'ANOVA, es van realitzar tests post-hoc de Benferroni.

En tots els casos es va considerar una  $p < 0.05$  com a estadísticament significativa.

# *Resultats*



---

## **Treball 1: Estudi de les diferents vies de senyalització iniciades pel receptor TLR-4 en resposta al LPS en cèl·lules astrocitàries**

---

En el següent estudi s'ha utilitzat el LPS, que és l'activador típic del receptor TLR-4, en cultius d'astròcits corticals, per investigar les vies de senyalització iniciades per aquest receptor. També s'ha volgut estudiar l'alliberament de mediadors proinflamatoris que poden exercir efectes paracrins en les cèl·lules veïnes, així com efectes autocrins que puguin promoure la reactivitat astrogliàlia.

El següent treball recull els objectius 1 i 2, i part dels resultats que es mostraran estan publicats en un article científic que s'adjunta en l'annex N° 1.

---

### **Determinació de la puresa dels cultius**

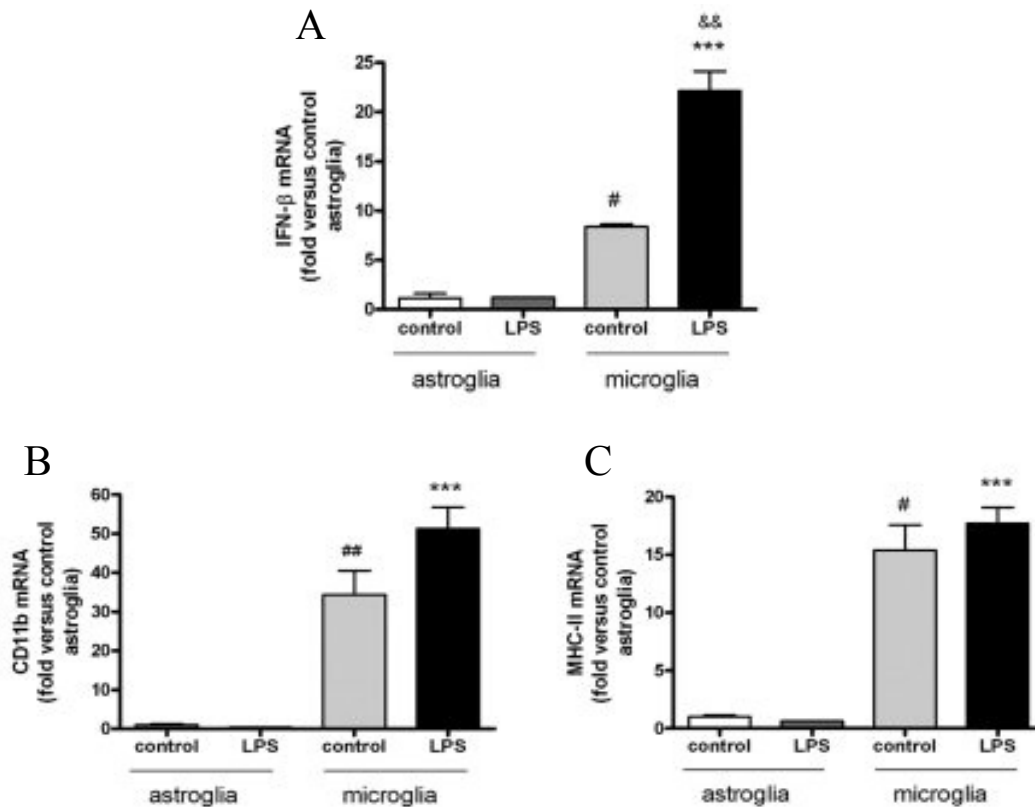
---

Donada la importància de la puresa dels cultius astrocitaris en el nostre model, es va buscar a través de diferents tècniques experimentals la presència de microglia contaminant.

Es va mesurar l'expressió gènica dels marcadors microglials CD-11b i el MHC-II, en diversos cultius d'astròcits utilitzats durant l'estudi per RT-PCR a temps real, i es van comparar els valors d'expressió dels mateixos marcadors en cultius enriquits en cèl·lules microglials. Es va observar que els cultius d'astròcits mostraven valors d'expressió gairebé nuls de marcadors microglials (fig. 1 B-C).

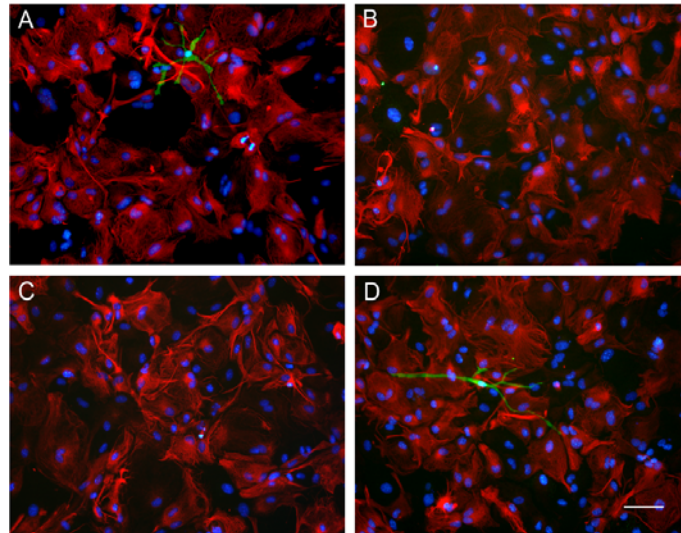
Amb l'objectiu d'esbrinar la contribució de les poques cèl·lules microglials que podien quedar en els cultius astrocitaris, i donat que s'havia observat que els cultius d'astròcits utilitzats, no produïen INF- $\beta$  en resposta al LPS, també es va mesurar l'expressió gènica d' INF- $\beta$  per RT-PCR, en ambdós tipus de cultius cel·lulars. Es va observar que els cultius d'astròcits mostraven valors d'expressió gairebé nuls d' INF- $\beta$ , mentre que els

cultius microglials presentaven valors basals elevats i aquests s'incrementaven fortament en resposta al LPS (fig. 1A).



**Figura R1. Expressió gènica de diferents marcadors microglials en cultius d'astròcits corticals.** Cultius primaris d'astròcits i de microglia corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després de LPS. En els gràfics es pot observar una molt baixa expressió dels marcadors microglials en els cultius d'astròcits. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el LPS astroglial; && $P < 0.01$  respecte el control microglial; ## $P < 0.01$  i # $P < 0.05$  respecte el control astroglial.

A més, també es va realitzar contatges cel·lulars a partir de preparacions immunocitoquímiques de fluorescència de doble marcatge, amb la detecció de la proteïna GFAP, com a marcador astrocitari, i la proteïna Iba-1, com a marcador microglial. Es van comptar 24 camps de 3 cultius diferents i es va estimar que el percentatge de contaminació de cèl·lules de la microglia en els cultius d'astròcits va ser de  $0,77 \pm 0,49\%$ .



**Figura R2. Immunocitoquímica d'un cultiu d'astròcits.** Cèl·lules de cultius d'astròcits de ratolí es van fixar amb PFA 4% i es va realitzar un assaig immunocitoquímic contra el marcador astrocítari GFAP (vermell) i el marcador microglial Iba-I (verd), i marcatge nuclear amb Hoechst (blau) per a ressaltar el nucli cel·lular. Les imatges reflecteixen un marcatge majoritari de GFAP. Escala de la barra = 30  $\mu$ m.

---

### Activació de la via dependent de MyD88

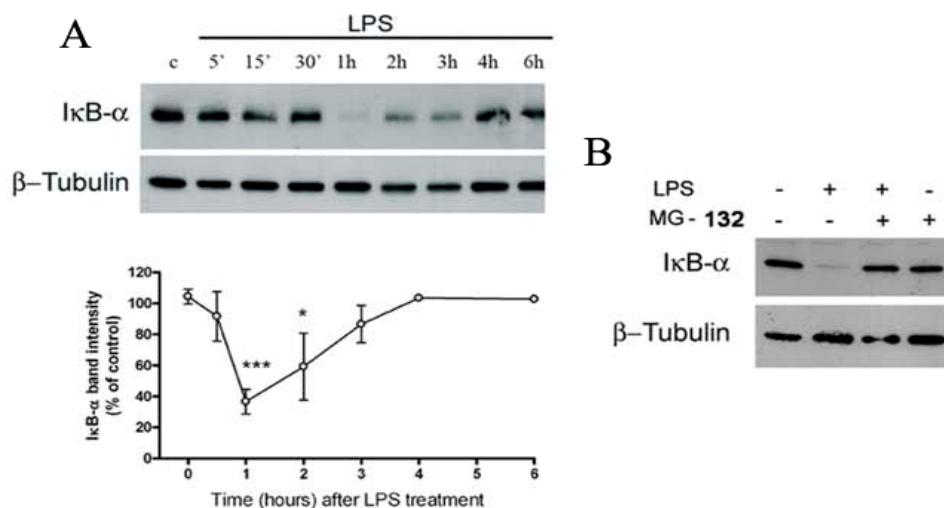
---

Com ja s'ha explicat anteriorment amb més detall, una de les vies principals activada per tots els receptors de tipus Toll, menys per TLR-3, és la via dependent de MyD88 que està descrita principalment en monòcits/macròfags. En aquesta via el domini intracel·lular del receptor Toll, un cop activat per la unió amb el seu lligand, interacciona amb la proteïna adaptadora MyD88 i s'inicia així una cascada de senyalització que portarà a l'activació del factor de transcripció NF $\kappa$ B i a l'expressió dels gens proinflamatoris sota el seu control.

Aquest treball es va iniciar amb l'estudi de la via dependent de MyD88 i de l'activació del factor de transcripció NF $\kappa$ B en resposta a l'estimulació del receptor TLR-4. En primer lloc, es va mesurar la degradació de la subunitat inhibidora I $\kappa$ B- $\alpha$  en resposta al tractament amb el LPS. En condicions fisiològiques I $\kappa$ B- $\alpha$  es troba unida al factor de transcripció NF $\kappa$ B, emmascarant les senyals de localització nuclear (NLS) que aquest conté. Això fa que NF $\kappa$ B quedi segrestat en el citoplasma cel·lular en un estadi inactiu. No obstant, l'activació del receptor TLR-4, provoca la fosforilació de I $\kappa$ B- $\alpha$  a través de

complex proteic IKK, i aquesta fosforilació provoca: la dissociació del complex I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF $\kappa$ B, la degradació de I $\kappa$ B- $\alpha$  per la via del proteasoma, permetent així la translocació nuclear de NF $\kappa$ B i l'activació dels seus gens diana.

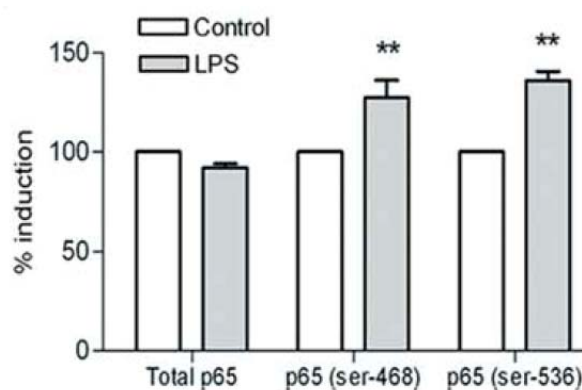
En el nostre model es va observar que el LPS provocava la degradació I $\kappa$ B- $\alpha$  que era evident 1 hora després del tractament. No obstant, la degradació era transitòria, ja que l'expressió de la proteïna es recuperava a 4 hores després de l'inici del tractament (fig. 3A). A més, es va comprovar que efectivament la degradació de I $\kappa$ B- $\alpha$  que observàvem en els nostres cultius era dependent de l'activitat del proteasoma (fig. 3B), ja que el tractament amb l'inhibidor farmacològic del proteasoma MG132 evitava la degradació de I $\kappa$ B- $\alpha$ .



**Figura R3. El LPS provoca la degradació transitòria de I $\kappa$ B- $\alpha$ .** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ml). Posteriorment es van recollir les mostres a diferents temps, en un tampó de lisi adequat per analitzar l'expressió d' I $\kappa$ B- $\alpha$  mitjançant la tècnica de Western blotting (WB). Es va utilitzar la  $\beta$ -Tubulina com a control de càrrega i es va quantificar la intensitat de cada banda, els valors estan expressats com a percentatge respecte del control. (A) WB de I $\kappa$ B- $\alpha$  després a diferents temps després del tractament amb el LPS. (B) WB de I $\kappa$ B- $\alpha$  després 2h després del tractament amb el LPS, en presència o absència de l'inhibidor MG-132 (10 $\mu$ M) afegit 15 hores abans del tractament amb el LPS. El gràfic mostra el valor mig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  i \*\* $P < 0.05$  respecte el control(c).

La degradació de la subunitat inhibidora I $\kappa$ B- $\alpha$  observada indicava l'activació del factor de transcripció NF $\kappa$ B. Per a comprovar-ho es van realitzar diferents abordatges experimentals.

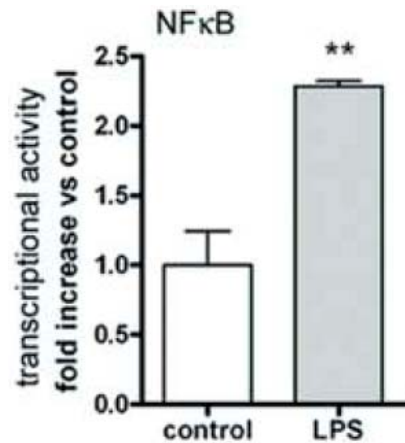
NFκB s'activa per fosforilació en diferents residus de serina, com Ser-276, Ser-468, Ser-529 i Ser-536. Aquestes fosforilacions, particularment la Ser-468, tenen un paper clau en la regulació de la seva activitat transcripcional, i estan associades amb la translocació nuclear, el reclutament de CBP i l'activitat d'unió a l'ADN. Així doncs, en primer lloc es va estudiar el grau de fosforilació de NFκB en diferents residus de serina mitjançant un assaig FACE-ELISA, i es va observar un augment significatiu de la fosforilació dels residus Ser-536 i Ser-468 en resposta al LPS (fig. 4).



**Figura R4. Fosforilació dels residus ser-468 i ser-536 de NFκB en resposta al LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml) durant 2 hores. El gràfic mostra un augment en el grau de fosforilació dels residus ser-468 i ser-536 de NFκB. La quantificació es va dur a terme per mitjà d'un assaig d'FACE-ELISA. Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\* $P < 0.01$  respecte el control.

També es va mesurar l'activitat transcripcional relativa de NFκB mitjançant un assaig luciferasa, en el que es van transfectar cultius d'astròcits de rata amb un vector reportador de l'activitat transcripcional de NFκB (pNFκB-Luc). Aquest assaig permet quantificar l'expressió de la proteïna luciferasa, que és proporcional a l'activitat transcripcional de NFκB. Els resultats van mostrar que el tractament amb el LPS provocava un augment significatiu de l'activitat luciferasa respecte el control sense LPS en els cultius d'astròcits (fig. 5).

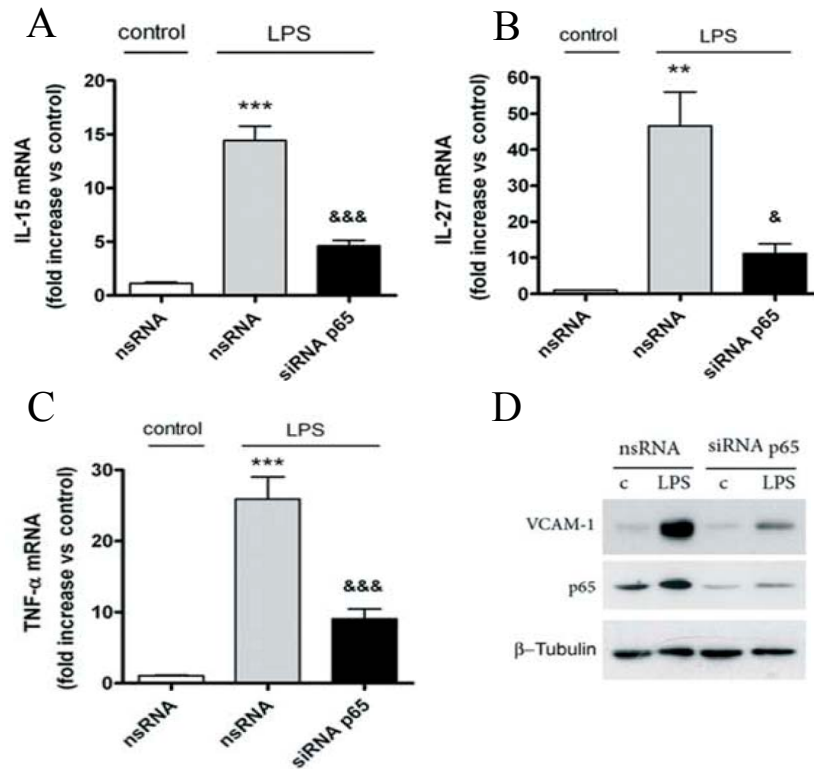




**Figura R5. NFκB mostra activitat transcripcional després del tractament amb el LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser transfectats amb el vector pNFκB-Luc, 24 hores abans del tractament amb el LPS (10 ng/ml). El gràfic mostra un augment en l'activitat transcripcional de NFκB per mitjà de la mesura de l'activitat luciferasa, 4 hores després del tractament amb el LPS. Els valors obtinguts estan normalitzats pels nivells de renilla, i estan expressats com a augment respecte del control. Els valors del gràfic expressen el percentatge d'inducció després de 2,5h d'exposició a LPS respecte dels valors control.  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\* $P < 0.01$  respecte el control.

També es va avaluar l'activitat transcripcional de NFκB, mesurant l'expressió de diferent gens diana, com els gens de les interleucines IL-15, IL-27 i de TNF- $\alpha$  per RT-PCR, així com l'expressió de la proteïna VCAM-1 per WB (fig. 6). En tots els casos vam observar que el tractament amb el LPS induïa l'expressió d'aquests gens.

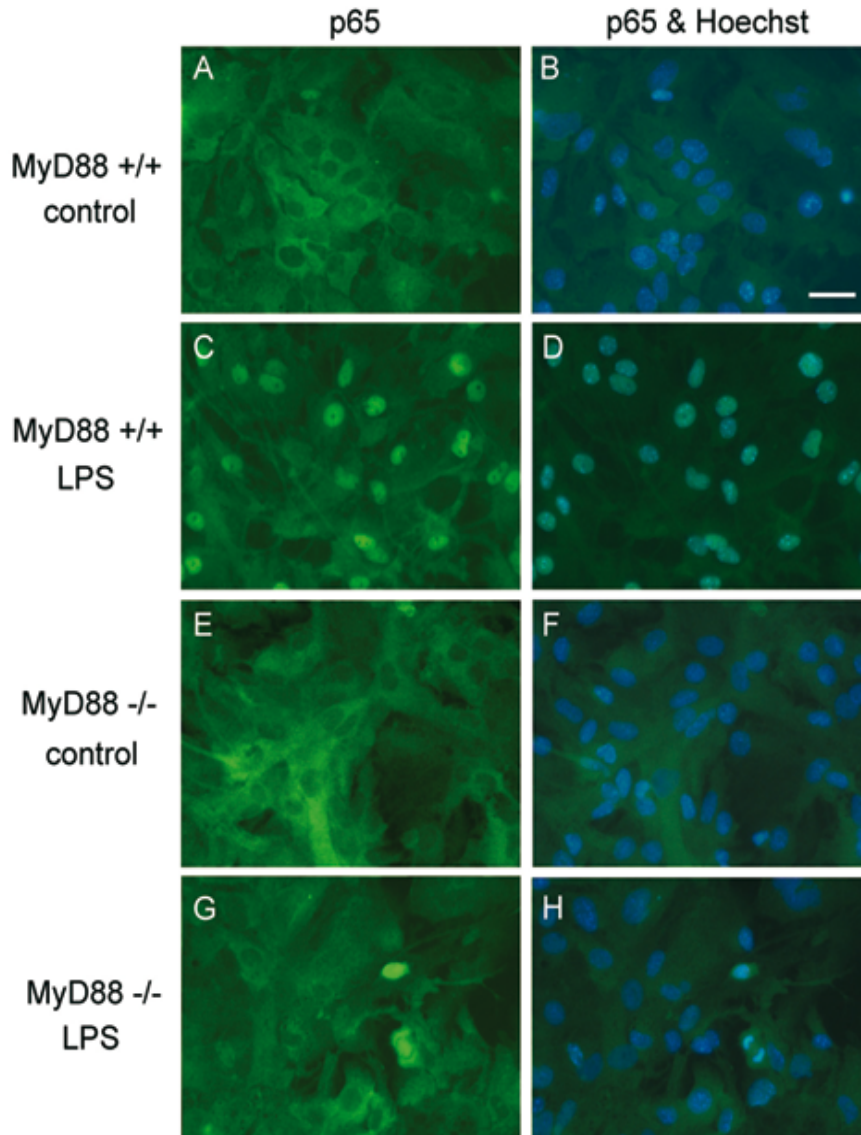
A més, per a confirmar que els efectes del LPS depenien de NFκB, també es van utilitzar cultius d'astròcits transfectats amb RNAs d'interferència de tipus *small-interfering RNA* (siRNA) contra l'ARNm de la subunitat p65 de NFκB. Es va veure que en aquelles cèl·lules on s'havia silenciat l'expressió de p65, mostraven un augment menor en l'expressió dels gens testats en resposta al LPS.



**Figura R6. El tractament amb el LPS incrementa l'expressió de gens regulats per NFκB.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ml) durant 4 hores. Alguns cultius van ser transfectats amb siRNAs contra la subunitat p65 de NFκB (siRNA p65), o amb un siRNA inespecífic sense capacitat de silenciament, *Non-silencing RNA* (ns) com a control. (A-C) Anàlisi de l'expressió gènica de les interleucines IL-15, IL-27, i TNF-α per RT-PCR, 4 h després del LPS. D) Anàlisi de l'expressió de la proteïna VCAM-1 i p65 per WB 8 h i 2 h després del tractament amb LPS. Es va utilitzar la β-Tubulina com a control de càrrega. El gràfic mostra el valor mitjà de diferents experiments independents  $n = 3-11$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  i \*\* $P < 0.01$  respecte el control (ns); i &&& $P < 0.001$  i & $P < 0.05$  respecte el LPS (ns).

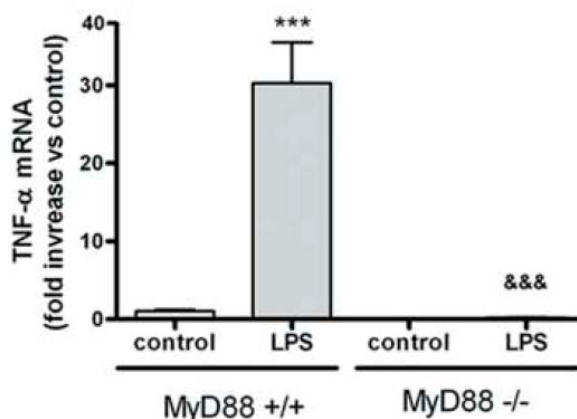
Per a confirmar que l'activació de NFκB que s'havia observat era conseqüència de l'activació de la via dependent de MyD88, es van realitzar tractaments amb LPS en cultius d'astròcits procedents de ratolins de fenotip salvatge (*wild type*, WT) i ratolins deficients (*knock-out*, KO) en la proteïna adaptadora MyD88. En primer lloc es va estudiar la localització cel·lular de NFκB per tècniques d'immunocitoquímica (ICC), on es va marcar la subunitat p65 (verd) amb un anticòs específic, i els nuclis cel·lulars (blau) amb el reactiu de Hoechst. En el cas dels astròcits WT, les imatges mostraven una localització citoplasmàtica del factor de transcripció NFκB en astròcits controls (fig. 7 A,B), mentre que aquest translocava al nucli en els astròcits tractats amb el LPS (fig. 7 C,D). No obstant, en el cas dels astròcits KO per MyD88, no s'observava la

translocació nuclear de NF $\kappa$ B després del LPS (fig. 7 G,H), i aquest quedava retingut en el citoplasma cel·lular (fig. 7 E,F).



**Figura R7. La translocació nuclear de NF $\kappa$ B 2hores després de l'estimulació amb LPS és dependent de l'activació de la via de MyD88.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolí WT i KO per MyD88 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml), i es van fixar amb PFA al 4% 2h després del tractament. Les cèl·lules es van processar per a realitzar un assaig immunocitoquímic contra la subunitat p65 (verd) de NF $\kappa$ B, i marcatge nuclear amb Hoechst (blau) per a ressaltar el nucli cel·lular. En els astròcits MyD88 $^{-/-}$  p65 queda retinguda en el citoplasma cel·lular, tal i com s'observa en les cèl·lules controls no tractades amb el LPS. Escala de la barra = 30  $\mu$ m.

També es va mesurar l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  en aquests cultius i vam observar que el LPS no induïa l'expressió de TNF- $\alpha$  (fig. 8) en cultius KO per MYD88.



**Figura R8.** L'expressió gènica de TNF- $\alpha$  depèn de l'activació de la via de MyD88. Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolí WT i KO per MyD88 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Paral·lelament es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius 4h després del tractament, per a fer mesures d'expressió gènica de TNF- $\alpha$  per RT-PCR. No es va detectar l'expressió de TNF- $\alpha$  en resposta a LPS en cultius d'astròcits de ratolins KO per MyD88. Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3-11$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control. &&&  $p < 0.001$  respecte a LPS.

Així doncs, els resultats obtinguts en el nostre model indicaven que el tractament amb el LPS activava la via dependent de MyD88, induint la degradació de la proteïna inhibidora I $\kappa$ B- $\alpha$ , permetent l'activació i translocació al nucli del factor de transcripció NF $\kappa$ B, i finalment activant l'expressió gènica de diversos gens proinflamatoris sota control d'aquest factor de transcripció.

---

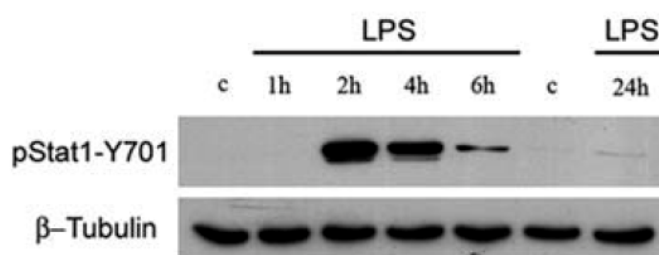
### Estudi de l'activació de la via TRAM/TRIF

---

Una altra de les vies activades pels receptors Toll és la via anomenada TRAM/TRIF, que s'anomena així perquè en aquest cas la via de senyalització s'activa per la interacció de les proteïnes TRAM i TRIF en el domini intracel·lular del receptors TLR-4, iniciant una cascada de senyalització que porta a l'activació del factor de transcripció IRF-3 i a l'expressió de INF- $\beta$ . Diversos estudis han descrit que l' INF- $\beta$  que es secreta després del tractament amb el LPS actua sobre receptors específics i activa la via *Janus kinase* (JAK/STAT) en monòcits i macròfags (Biswas et al., 2007), i que un efecte

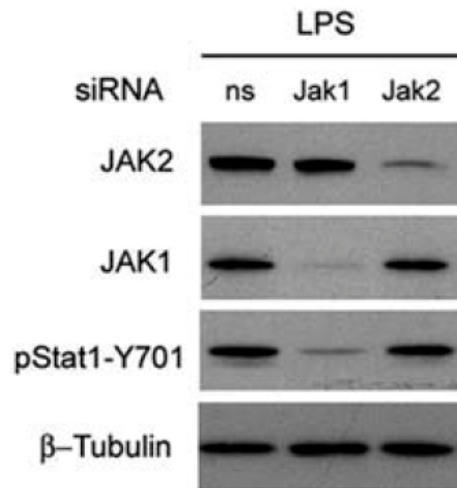
característic d'aquesta via és la fosforilació de STAT-1 induïda per INF- $\beta$  (Tishchakov et al., 2002).

En base a aquestes dades, vam assajar la fosforilació de la proteïna STAT-1 en el residu tirosina 701 (pSTAT-1<sup>Tyr701</sup>) a diferents temps després del tractament amb el LPS. En efecte vam observar una fosforilació transitòria retardada que es feia evident 2 hores després del tractament amb el LPS, però no abans, i que es mantenia fins a les 6 hores (fig.9).



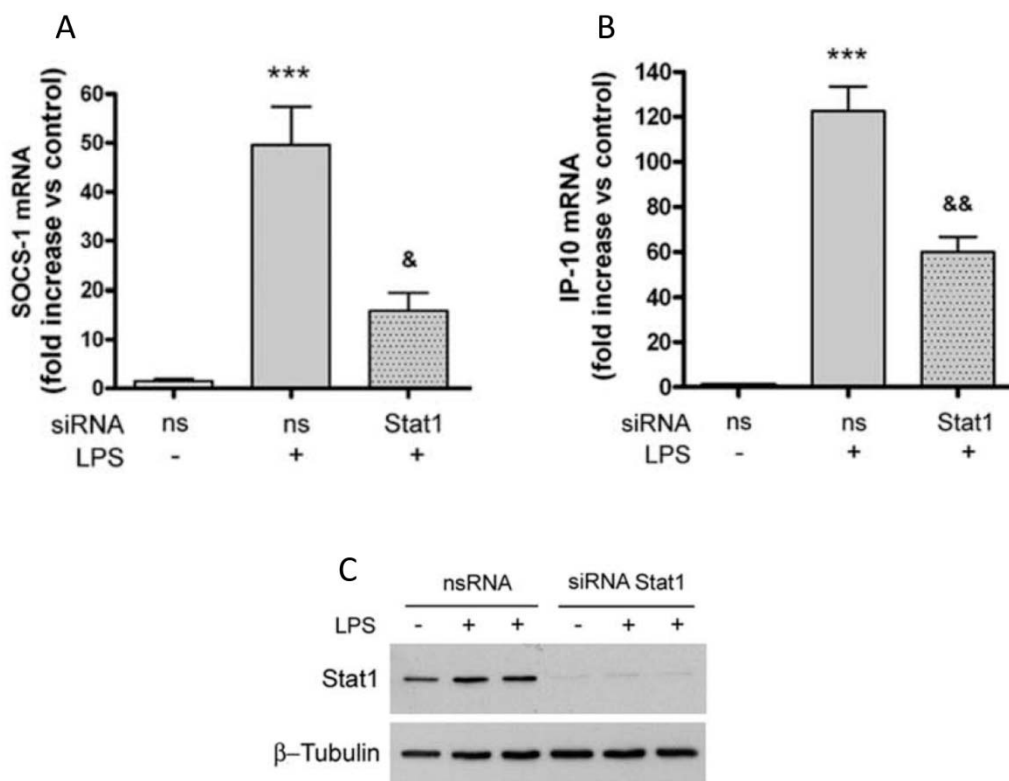
**Figura R9. El tractament amb el LPS provoca la fosforilació transitòria de la proteïna STAT-1.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es van recollir mostres per analitzar l'expressió i fosforilació de la proteïna STAT-1 en el residu de tirosina 701, mitjançant la tècnica de Western blotting. Es va utilitzar la  $\beta$ -Tubulina com a control de càrrega. Es va observar que el LPS induïa la fosforilació transitòria retardada de STAT-1 en el residu de Tyr-701 (pSTAT-1-Y701).

Posteriorment, i amb l'objectiu d'identificar la proteïna JAK responsable de la fosforilació de STAT-1, es va dur a terme el silenciament de les proteïnes cinases JAK1 i JAK2 per mitjà de siRNAs específics en cultius d'astròcits de rata. Els resultats van mostrar que el silenciament de la proteïna JAK1 impedia la fosforilació de STAT-1, mentre que el silenciament de JAK2 no tenia cap efecte (fig. 10). Per tant, la proteïna JAK1 era la cinasa responsable de la fosforilació de STAT1 que havíem observat, confirmant així que la via JAK1/STAT1 s'activava en resposta al LPS en els nostres cultius.



**Figura R10. La fosforilació de STAT-1 induïda per el LPS és depenent de la proteïna Jak1.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser transfectats amb siRNAs contra Jak1 i JAK2, tractats amb LPS (10 ng/ ml) durant 2h. Posteriorment es van recollir mostres per analitzar l'expressió de les proteïnes JAK1 i JAK2, així com la fosforilació de la proteïna STAT-1 en el residu de tirosina 701 per WB. Es va observar que el silenciament de Jak2 no implicava cap canvi en la fosforilació de STAT-1, mentre que el silenciament de Jak1 evitava completament la fosforilació de STAT-1. Es va utilitzar la  $\beta$ -Tubulina com a control de càrrega.

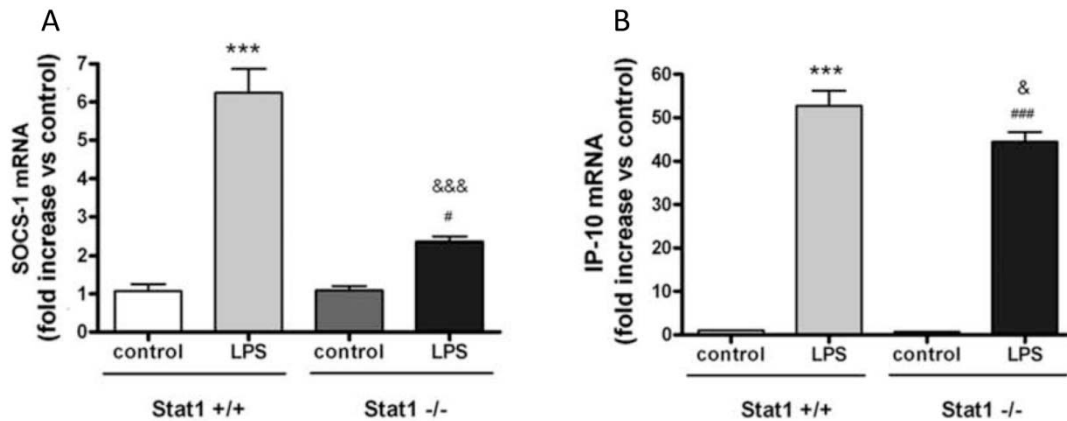
Adicionalment, vam assajar l'activitat transcripcional de STAT-1 mesurant l'expressió de diversos gens sota el seu control, gens com el lligand 10 de les quimiocines '*chemokine (C-X-C motif) ligand 10*' (IP-10) i el supressor de les senyals de citocines '*suppressor of cytokine signaling-1*' (SOCS-1), per RT-PCR a temps real. L'expressió d'aquests gens augmenta 4 hores després del tractament amb LPS en cultius d'astròcits de rata, i el silenciament d'STAT-1 a través de siRNAs va disminuir l'augment observat (fig. 11 A-B).



**Figura R11. STAT-1 contribueix a la reducció de SOCS-1 i IP-10 pel LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser transfectades amb siRNAs contra la proteïna STAT-1 (si-STAT-1) i tractats amb LPS (10 ng/ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després de LPS. Els gràfics mostren que els nivells d'expressió dels gens SOCS-1 i IP-10 augmenten 4h després del tractament amb LPS, però la seva expressió es veu reduïda quan es silencia STAT-1 usant siRNAs. Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  respecte els respectius controls; &&&  $P < 0.001$ , &&  $P < 0.01$  i &  $P < 0.05$  respecte el LPS (Stat-1WT); i ###  $P < 0.001$  i #  $P < 0.05$  respecte el control (STAT-1 KO).

Per a confirmar els resultats obtinguts es van realitzar tractaments amb el LPS en cultius de ratolins WT i KO per STAT-1 (fig. 12). Els resultats mostraven que efectivament el tractament amb LPS en cultius d'astròcits de ratolí WT augmentava l'expressió de SOCS-1, tal i com havíem observat anteriorment en cultius d'astròcits de rata (fig. 11), mentre que el mateix tractament en cultius KO per STAT-1 no provocava la inducció de l'expressió d'aquests gens (fig. 12A) i IP-10 (fig. 12B). No obstant, a diferència dels cultius d'astròcits de rata, en els cultius KO per STAT1 (soca 129.S6.SvEv), la inducció de IP-10 només es veia atenuada, mentre que la inducció de SOCS-1 es veia totalment impedita. Aquestes dades suggerien que l'expressió de determinats gens

proinflamatoris podria estar influenciada pel fons genètic dels animals a partir dels quals obtenim els cultius, i que fins i tot podria haver importants diferències interespecífiques.



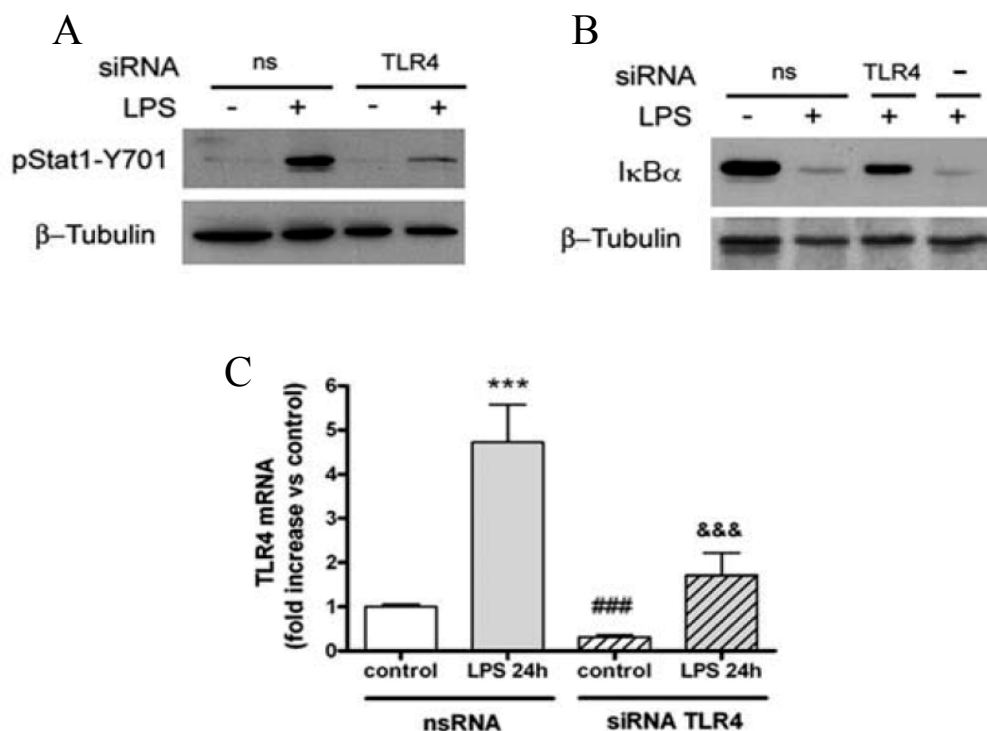
**Figura R12. STAT-1 contribueix a la reducció de SOCS-1 i IP-10 pel LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolí WT i KO per STAT-1 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). En aquests cultius, l'expressió de SOCS-1 (A) també es veu fortament reduïda, i l'expressió de IP-10 (B) es veu atenuada. Els símbols indiquen: \*\*\*  $P < 0.001$  respecte els respectius controls; &&&  $P < 0.001$ , &&  $P < 0.01$  i &  $P < 0.05$  respecte el LPS (Stat-1WT); i ###  $P < 0.001$  i #  $P < 0.05$  respecte el control (Stat-1 KO).

Per a comprovar que l'activació de STAT-1 que observàvem era deguda a l'activació del receptor TLR-4. Es van utilitzar cultius d'astròcits corticals de rata on s'havia silenciat el receptor TLR-4 mitjançant la transfecció de les cèl·lules amb siRNAs contra TLR-4 (fig. 13). Es va assajar la fosforilació de STAT-1 (pSTAT-1<sup>Tyr701</sup>), en aquestes cèl·lules i es va observar que en presència del siRNA específic contra TLR-4 no s'observava la fosforilació de la proteïna STAT-1, i que per tant, l'activació de STAT-1 es donava com a resposta de l'activació del receptor TLR-4 pel LPS (fig. 13A).

De la mateixa manera, i per a comprovar que la degradació de la subunitat inhibidora I $\kappa$ B- $\alpha$  que havíem observat anteriorment (fig.3) era conseqüència de l'activació del receptor TLR-4, també es va assajar la seva expressió en els cultius on s'havia realitzat el silenciament de TLR-4. Tal i com s'esperava, en els cultius on s'havia realitzat el silenciament de TLR-4, no es va observar la degradació de I $\kappa$ B- $\alpha$  (fig. 13B),



demostrant així que la degradació de la subunitat inhibidora es donava com a conseqüència de l'activació del receptor TLR-4 activat pel LPS.



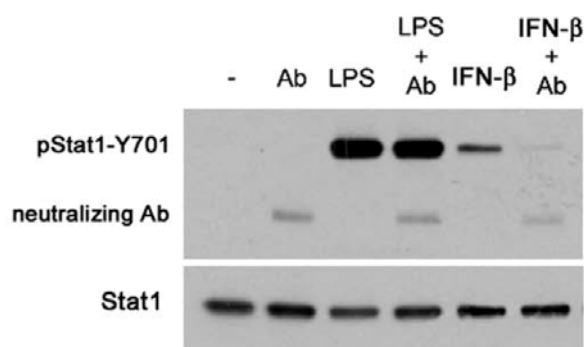
**Figura R13. La fosforilació de STAT-1 i la degradació de IκB-α tenen lloc com a conseqüència de l'activació del receptor TLR-4.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser transfectats amb siRNAs contra el receptor TLR-4 (si-TLR-4) i tractats amb LPS (10 ng/ml). (A-B) Posteriorment es va analitzar la fosforilació de la proteïna STAT-1 en el residu de tirosina 701, i l'expressió de IκB-α, per WB. Es va observar que el silenciament de TLR-4 impedia la fosforilació de la proteïna STAT-1, així com la degradació de la subunitat inhibidora IκB-α. Es va utilitzar la β-Tubulina com a control de càrrega. (C) També es va realitzar l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 24h després de LPS. El gràfic mostra un silenciament eficient de TLR-4. Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control; &&& $P < 0.001$  respecte el LPS; i ###  $P < 0.001$  respecte el control (ns).

Després de comprovar que la via JAK/STAT s'activava en resposta al tractament amb el LPS, i que aquesta activació depenia del receptor TLR-4, encara s'havia de verificar si l'activació de la via era dependent de l'acció de IFN-β.

Per esbrinar aquest punt, es van tractar cultius d'astròcits corticals de rata amb un anticòs bloquejant, específic per IFN-β, per a impedir els efectes de la seva activitat.

Vam observar que la presència de l'anticòs bloquejador en els cultius tractats amb LPS no modificava la fosforilació observada de STAT-1 (fig. 14).

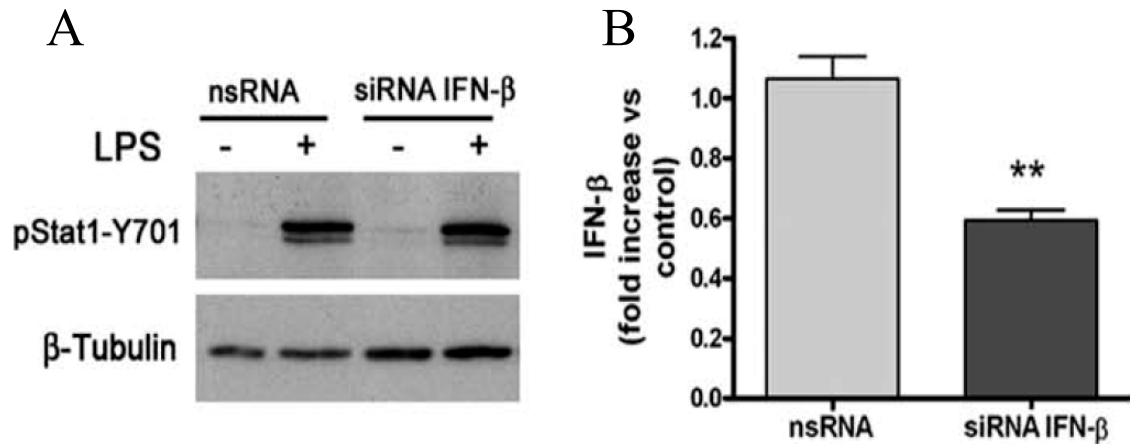
Per a comprovar l'eficiència de l'anticòs que estàvem utilitzant, vam tractar cultius d'astròcits amb IFN- $\beta$  exogen, induint la fosforilació de STAT-1 (fig. 14), i vam observar que quan adicionàvem l'anticòs bloquejant en aquests cultius, aquest impedia la fosforilació de STAT-1 (fig. 14), cosa que demostrava que el anticòs bloquejant era efectiu.



**Figura R14. La fosforilació de STAT-1 després del tractament amb LPS no depèn d'INF- $\beta$ .** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml) o IFN- $\beta$  exogen, durant 2h. Alguns cultius també es van tractar amb un anticòs bloquejador de IFN- $\beta$  (100 ng / ml) 30 minuts abans dels tractaments amb el LPS o amb el IFN- $\beta$  exogen. Posteriorment es van recollir mostres per analitzar la fosforilació de la proteïna STAT-1 en el residu de tirosina 701 per WB. Es va utilitzar la  $\beta$ -Tubulina com a control de càrrega.

Per acabar de confirmar els resultats anteriors, es va assajar la fosforilació de STAT-1 (pSTAT-1<sup>Tyr701</sup>) en cultius tractats amb LPS on s'havia realitzat el silenciament de IFN- $\beta$  amb un siRNA específic. Tal i com s'esperava, la fosforilació de STAT-1 no es va veure modificada en els cultius on s'havia realitzat el silenciament (fig. 15A). També en aquest cas es va comprovar l'eficiència del silenciament de IFN- $\beta$  en els cultius d'astròcits, es va mesurar l'expressió gènica d'IFN- $\beta$  per RT-PCR a temps real. Vam comprovar que l'expressió de l'ARN missatger de IFN- $\beta$  disminuïa en els astròcits on s'havia realitzat el silenciament gènic (fig. 15B).

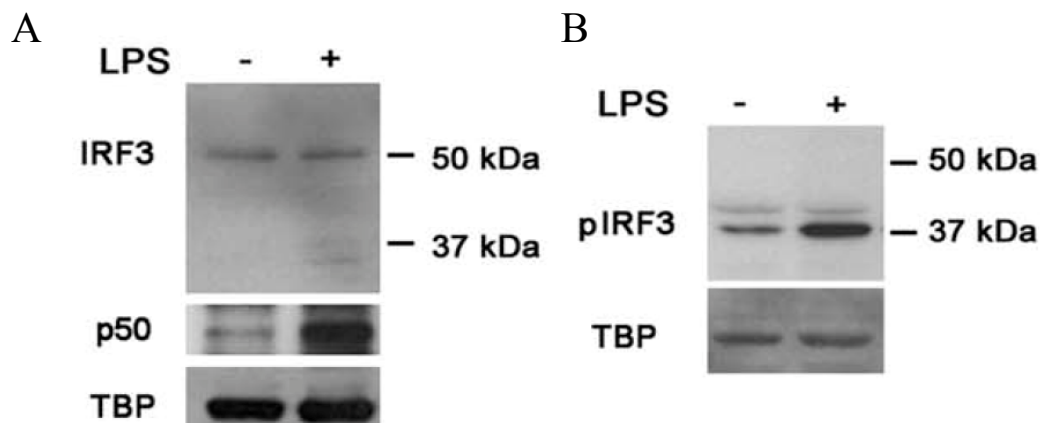
Els resultats amb l'anticòs bloquejant i amb el silenciament de IFN- $\beta$ , havien demostrat que en astròcits l'IFN- $\beta$  no era determinant per l'activació de STAT-1 induïda pel LPS.



**Figura R15. La fosforilació de STAT-1 és independent d' IFN- $\beta$  en astròcits.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser transfectats amb siRNAs contra IFN- $\beta$  (si-IFN $\beta$ ) i tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va analitzar la fosforilació de la proteïna STAT-1 en el residu de tirosina 701 per WB. (A) La imatge mostra com la fosforilació de STAT-1 no canvia amb el silenciament de IFN- $\beta$ . Es va utilitzar la  $\beta$ -Tubulina com a control de càrrega. (B) També es van realitzar extraccions d'ARNm per fer mesures de l'expressió gènica de IFN- $\beta$  per RT-PCR. En el gràfic s'observa un silenciament notable d'IFN- $\beta$ . El gràfic mostra el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\* $P < 0.01$  respecte el control.

Tal i com he comentat anteriorment, en altres tipus cel·lulars s'ha descrit que la via independent de MyD88, o via TRAM/TRIF, indueix l'expressió de IFN- $\beta$  a través de l'activació del factor de transcripció IRF-3, de manera que també vam comprovar l'estat de fosforilació de IRF-3. El procés d'activació d'IRF-3 és molt complex, estudis recents suggereixen que la fosforilació de IRF-3 en el residu de serina ser-386, així com la posterior dimerització i translocació nuclear d'aquest factor de transcripció, no són un factor determinant de la seva activitat transcripcional, ja que aquesta també es pot observar en absència d'aquesta fosforilació (Clemente et al., 2008).

Es van utilitzar extractes de proteïnes nuclears a partir de cultius d'astròcits de rata, i es va assajar l'expressió i fosforilació de IRF-3 en el residu de serina ser-386 per WB. Els resultats no mostraven un augment en la translocació nuclear de IRF-3 després del LPS (fig. 16A), però sí que vam veure una major fosforilació en el residu de ser-386 d'una forma truncada de IRF-3 (fig. 16B). Aquesta forma podria resultar d'un procés de *splicing* alternatiu, donat que es coneixen dues formes de *splicing* del gen de IRF-3 que s'han descrit en diferents línies cel·lulars (Kárpov et al., 2001; Marozin et al., 2008) i en hepatòcits (Zhai et al., 2008).

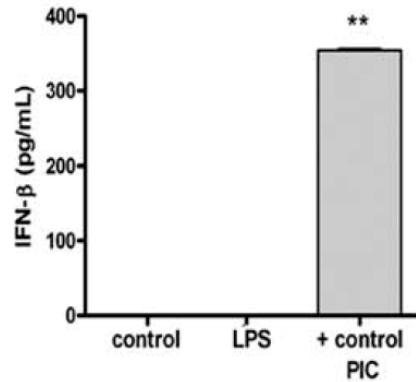


**Figura R16. El factor de transcripció IRF-3 no s'activa en cultius d'astròcits en resposta al LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va analitzar la fosforilació de la proteïna IRF-3 en el residu serina 386, per WB, a partir d'extractes nuclears. (A) La imatge mostra que el LPS no indueix cap canvi en el nivell d'expressió nuclear de IRF-3 (50kDa). (B) No obstant, el LPS indueix la fosforilació d'una variant curta d'IRF-3 (37kDa). Es va utilitzar la *TATA box binding protein* (TBP) com a control de càrrega.

Diversos estudis evidencien que aquesta variant de IRF-3 podria actuar com un regulador negatiu de la funció que realitza la forma no truncada de IRF-3 (Karpov et al, 2001; Zhai et al, 2008.). Atès que la variant truncada s'expressa en els astròcits de rata, es necessiten més estudis per esbrinar el seu paper real en aquestes cèl·lules.

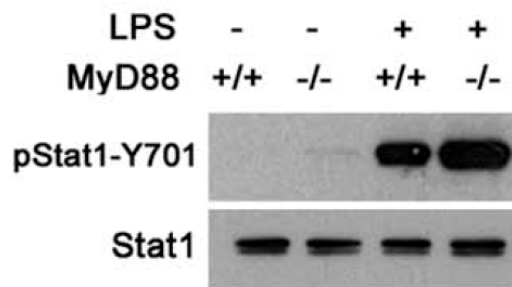
En conjunt, les dades presentades suggereixen que la fosforilació de STAT-1 en el nostre model és independent de MyD88, i es dona de forma independent de IFN- $\beta$ .

Donat que fins ara havíem realitzat aquestes comprovacions en cultius d'astròcits de rata, vam validar l'expressió de IFN- $\beta$  en resposta al LPS en cultius d'astròcits de ratolí. Vam analitzar el medi de cultiu d'astròcits tractats amb el LPS, utilitzant assajos d'ELISA, però no es va detectar un augment de la secreció de IFN- $\beta$  en el medi de cultiu en resposta al tractament (fig. 17).



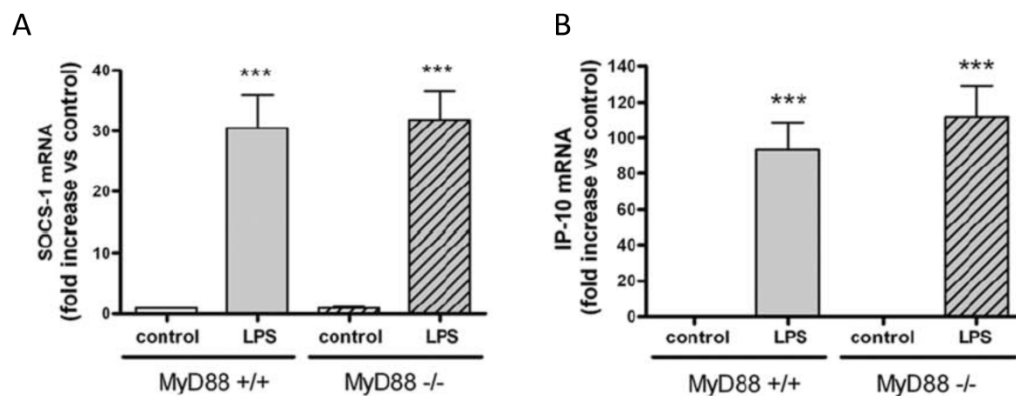
**Figura R17. El tractament amb LPS no provoca la secreció de IFN- $\beta$  en cultius d'astròcits corticals.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolí C57/Bl6 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml), i posteriorment es va mesurar la concentració d' IFN- $\beta$  utilitzant assajos d'ELISA, 8h després del LPS. El tractament amb ply-DI:DC (PIC) es va utilitzar com un control positiu que mostrava que les nostres cèl.lules sí que expressavem IFN- $\beta$  com a resposta a altres tractaments, però no al LPS. Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\* $P < 0.01$  respecte el control.

També vam comprovar que la fosforilació de STAT-1 (pSTAT-1<sup>Tyr701</sup>) induïda pel LPS fos independent de la via de MyD88. Es van realitzar tractament en cultius d'astròcits WT i KO per MyD88, però no es van veure canvis en la fosforilació de STAT-1 en relació a la manca de la proteïna adaptadora MyD88 (fig. 18).



**Figura R18. La fosforilació de Stat1 (pSTAT-1<sup>Tyr701</sup>) és independent de MyD88 en cultius d'astròcits corticals.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per MyD88 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va analitzar la fosforilació de la proteïna STAT-1 en el residu de tirosina 701, per WB. En la imatge es pot observar que la fosforilació de STAT-1 no varia entre astròcits WT i KO per MyD88. Es va utilitzar la  $\beta$ -Tubulina com a control de càrrega. Els gràfics mostren el valor mig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\* $P < 0.01$  respecte el control.

A més, es va comprovar que l'activitat transcripcional STAT-1 fos també independent de la proteïna MyD88 assajant l'expressió dels gens IP-10 i SOCS-1 en aquests mateixos cultius. Els resultats mostraven un augment en l'expressió gènica en resposta al LPS, i no s'observaven canvis entre els astròcits WT i KO per MyD88, evidenciant que la via dependent de MyD88 tampoc estava involucrada en la senyalització de STAT-1 (fig. 19).



**Figura R19. L'expressió dels gens SOCS-1 i IP-10 no està regulada per la via dependent de MyD88.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolí WT i KO per MyD88 van ser tractats amb LPS (10 ng/ml). Es van realitzar extraccions d'ARNm per fer mesures de l'expressió gènica per RT-PCR, 4h després de LPS. En els gràfics no s'observen diferències en l'expressió gènica de SOCS-1 ni de IP-10 en resposta al tractament amb el LPS. Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen:  $***P < 0.001$ , respecte els respectius controls.

Aquests resultats estan d'acord amb estudis previs que suggereixen la manca d'activació de la via TRAM/TRIF (o via independent de MyD88) després del LPS en diferents tipus cel·lulars com en neutròfils (Tamassia et al., 2007), cèl·lules de l'endoteli vascular (Harari et al., 2006), i també en astròcits (Krasowska-Zoladek et al., 2007). No obstant, nosaltres sí que veiem l'activació de la via JAK1/STAT1 de manera independent de la l'activació de IRF-3 i la inducció de IFN- $\beta$ , en resposta al LPS.

---

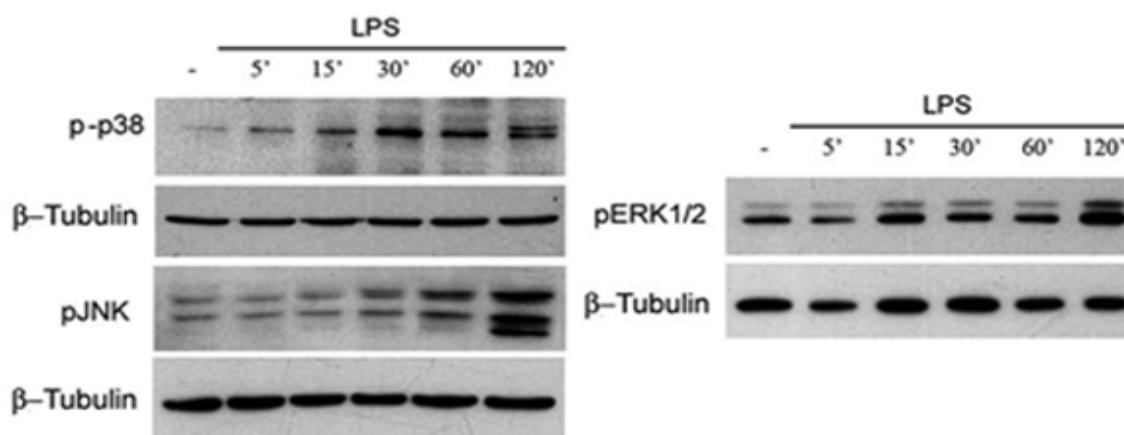
### Estudi de l'activació de la via de les MAPKs

---

Es coneix que la via de les *mitogen activated protein kinases* (MAPK) s'activa en resposta a la via dependent de MyD88, i que aquesta està implicada en la senyalització

induïda pel LPS en monòcits (Guha & Mackman, 2001). Per aquesta raó també vam estudiar l'activació i grau d'implicació de la via de les MAPK en el nostre model, així com la seva participació en les vies de senyalització que s'estaven estudiant.

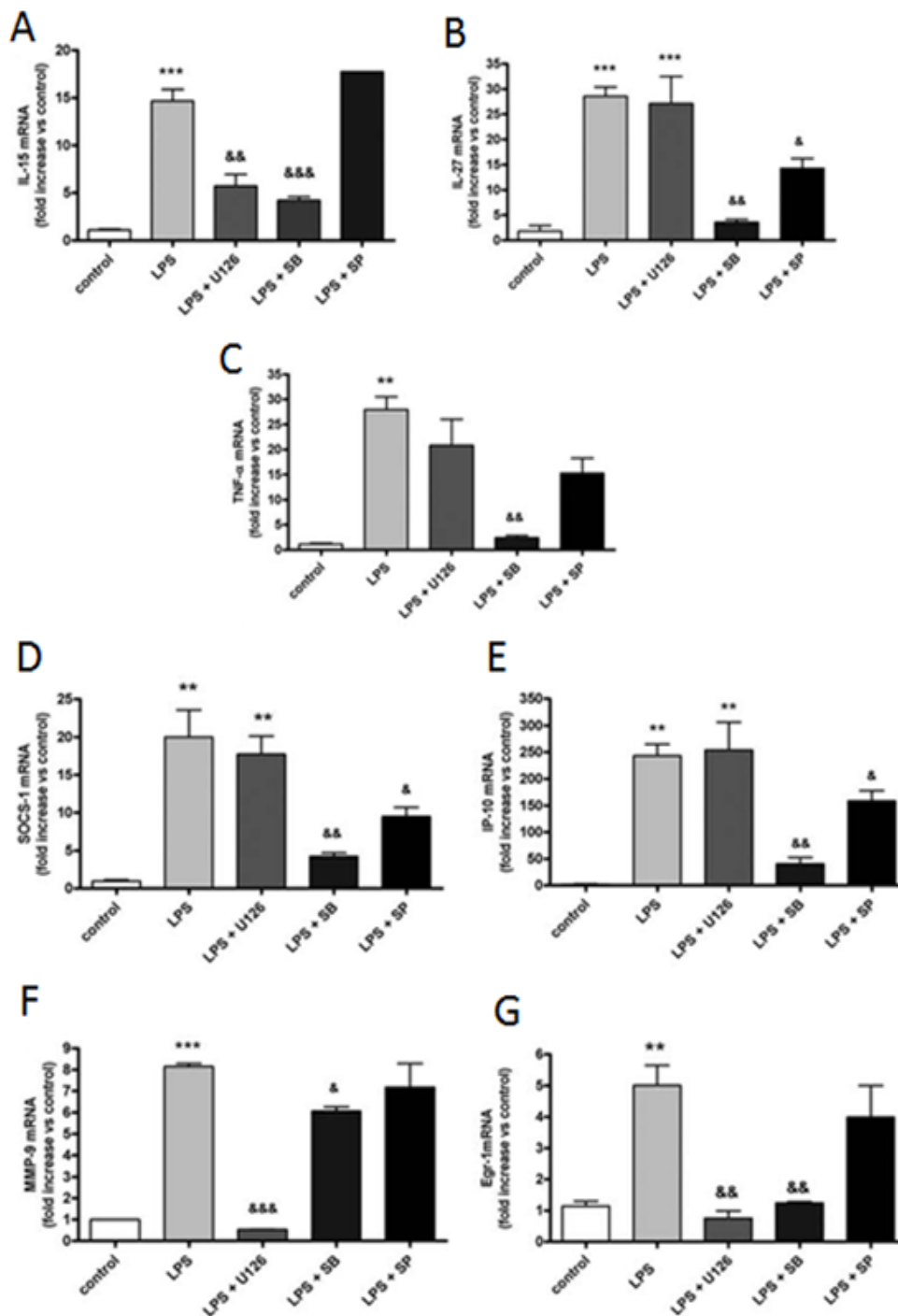
En primer lloc vam estudiar l'evolució temporal de la fosforilació de diferents membres de les MAPK, com la p38, *c-Jun NH2-terminal kinase* (JNK) i *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK1/2), després del tractament amb el LPS en cultius d'astròcits de rata. La fosforilació de p38 (fig. 20), es va observar 5 minuts després de l'exposició a LPS, i es va mantenir fosforilada fins a 30 minuts després, mentre que, comparativament, l'activació de ERK1/2 i JNK va ser més tardana (fig.20), entre 30 i 120 minuts després de l'adició del LPS.



**Figura R20. Inducció de la fosforilació de les proteïnes MAPK en resposta al LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va analitzar l'expressió i la fosforilació de les proteïnes p38, JNK i ERK1/2, per WB. Es va utilitzar la  $\beta$ -Tubulina com a control de càrrega.

A continuació, vam examinar quin era el paper de les MAPK en la transcripció gènica induïda pel LPS, dels gens testats anteriorment. La inhibició de l'activitat de p38 amb l'inhibidor farmacològic SB239063, disminuïa fortament l'expressió gènica de IL-15 (fig. 21A), IL-27 (fig. 21B), TNF- $\alpha$  (fig. 19C), i també dels gens dependent de STAT-1, SOCS-1 (fig. 21D) i IP-10 (fig. 21E). També va disminuir d'altres gens implicats en resposta a l'activació de TLR4, com ara la *early growth response-1* (EGR-1) (fig. 21F), i el gen de la metal·loproteïna de la matriu 9 (MMP-9), (fig. 21G). Aquests resultats

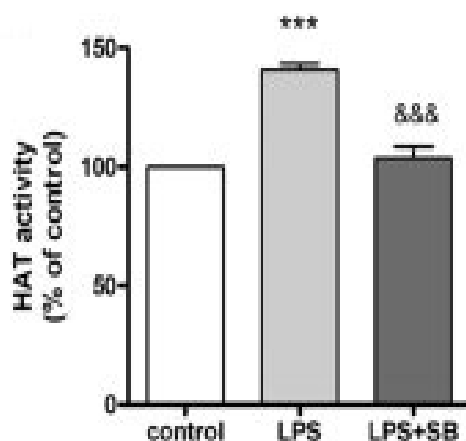
mostraven una important implicació de la MAPK p38 en la regulació de diferents gens proinflamatoris en aquest sistema.



**Figura R21. Implicació de la via de les MAPK en l'expressió gènica induïda pel LPS en astròcits de rata.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml) en presència o absència dels inhibidors de MAPK. U0126, SB239063 (SB), i SP600125 (SP), que inhibeixen l' ERK1/2, p38 i JNK, respectivament. Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després de LPS. Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  i \* $P < 0.05$  respecte el control; &&& $P < 0.001$ , && $P < 0.01$  i & $P < 0.05$  respecte el LPS.

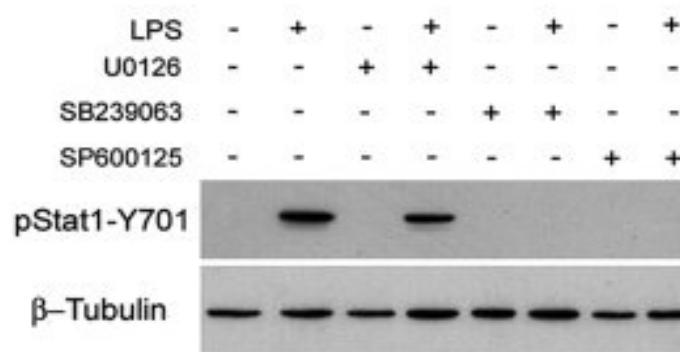


L'atenuació de l'expressió dels gens sota control de NFκB (IL-15, IL-27, TNF-α, Egr-1 i MMP-9), observada anteriorment en els cultius d'astròcits tractats amb l'inhibidor de p38 (fig. 21), podria ser atribuïble al fet que l'activitat transcripcional de NFκB requereix la proteïna p38, tal i com s'ha constatat en altres tipus cel·lulars (Carter et al., 1999). L'acció de p38 sobre NFκB es dona a través de la proteïna coactivadora P300, amb activitat acetiltransferasa (Saha et al., 2007). Per a comprovar que l'activitat de la proteïna P300 es pogués veure afectada en el nostre sistema, es van obtenir extractes nuclears d'astròcits tractats amb el LPS, i es va examinar l'activitat acetiltransferasa de P300 utilitzant l'assaig de l'activitat histona acetiltransferasa (HAT). Els resultats van mostrar un augment de l'activitat acetiltransferasa de la proteïna P300 en resposta al LPS, mentre que l'inhibidor de la p38 atenuava l'efecte (fig. 22). Aquest resultat recolzava la idea de que l'activitat nuclear acetiltransferasa de p300, que és dependent de p38, fos necessària per l'activitat transcripcional de NFκB induïda pel LPS en els nostres cultius d'astròcits.



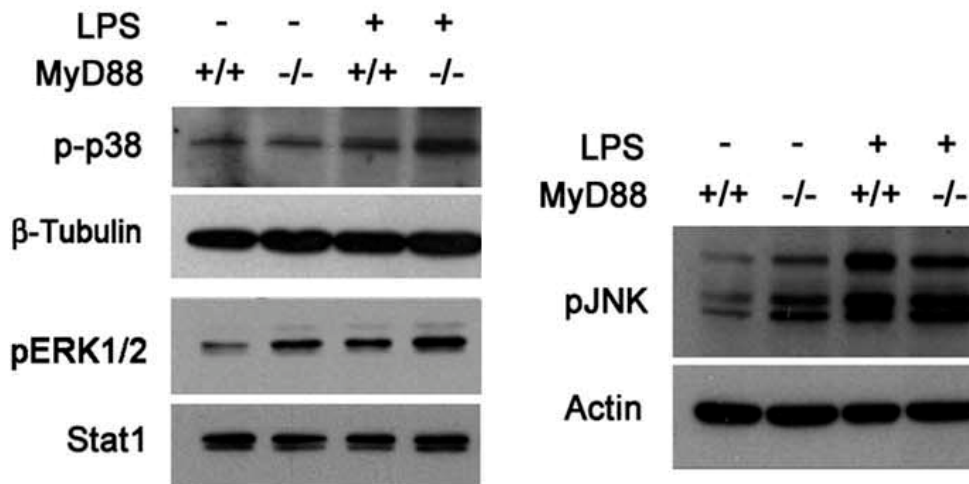
**Figura R22. Implicació de la MAPK p38 en l'activitat histona acetil transferasa (HAT) induïda pel LPS en astròcits de rata.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb l'inhibidor SB239063 (SB), i amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es van recollir les mostres per a realitzar l'assaig HAT 2h després del tractament. En el gràfic s'observa que el LPS incrementa l'activitat acetiltransferasa, i que l'inhibidor SB disminueix aquest efecte. Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control; &&& $P < 0.001$  respecte el LPS.

A continuació, es van utilitzar els inhibidors de les MAPKs per examinar la seva participació en l'activació de STAT-1 induïda pel LPS. Vam observar que la inhibició de les proteïnes p38 i JNK impedièen la fosforilació de STAT-1 en el residu tirosina-701 després del tractament amb el LPS (fig. 23), mentre que la inhibició de ERK1/2 no mostrava cap efecte sobre la fosforilació.



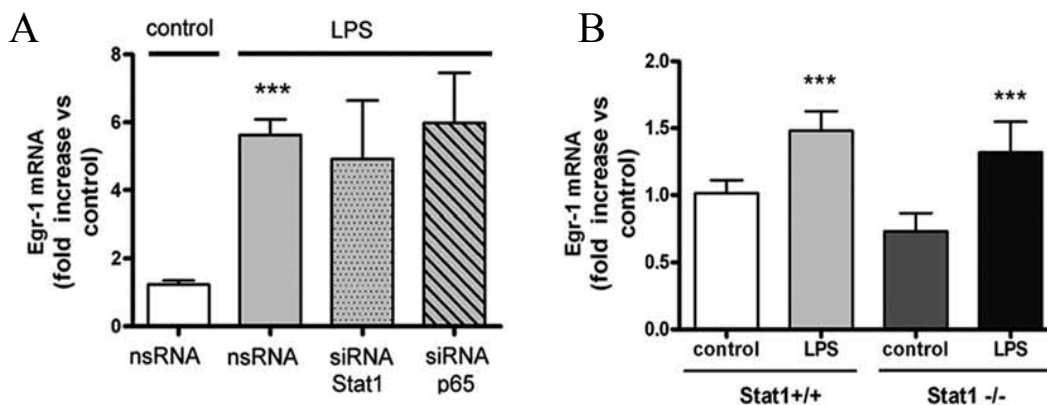
**Figura R23. Implicació de la via de les MAPK en la fosforilació de STAT-1 induïda pel LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml) durant 2h, en presència o absència (-) dels inhibidors de MAPK. U0126, SB239063 (SB), i SP600125 (SP), que inhibeixen l' ERK1/2, p38 i JNK, respectivament. Posteriorment es va analitzar la fosforilació de la proteïna STAT-1 en el residu de tirosina 701 (pStat1-Y701), per WB. La imatge mostra una inducció en la fosforilació de STAT-1 en resposta al LPS. Els inhibidors SB i SP impedeixen la fosforilació, mentre que U0126 no ho fa. Es va utilitzar la  $\beta$ -Tubulina com a control de càrrega.

El fet que determinades MAPKs estiguessin involucrades en la fosforilació de STAT-1, i que aquesta fosforilació fos independent de MyD88, va suggerir que l'activació d'aquestes MAPKs podia ser també, almenys en part, independent de MyD88. Per a confirmar aquesta observació, es va assajar la fosforilació de les proteïnes cinasa p38, JNK i ERK1/2 en resposta al LPS en cultius d'astròcits de ratolins WT i KO per MyD88, mitjançant la tècnica de WB. La fosforilació de p38, JNK i ERK en resposta al LPS en cultius deficientes en MyD88 va demostrar que l'activació de la via de les MAPKs pel LPS era, almenys en part, independent de MyD88.



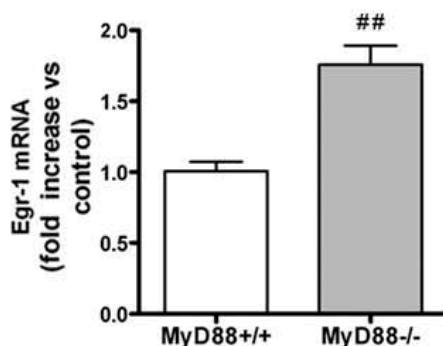
**Figura R24. L'activació de les MAPKs és independent de MyD88.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per MyD88 van ser tractats amb LPS (10 ng/ml) durant 2h. Posteriorment es va analitzar l'expressió i la fosforilació de les proteïnes p38, JNK i ERK1/2, per WB. Es va utilitzar la  $\beta$ -Tubulina, Actina i STAT-1 total com a controls de càrrega. Els gràfics mostren l'activació per fosforilació de les diferents MAPKs en resposta al tractament amb el LPS tant en astròcits WT com KO per MyD88.

Els resultats anteriors mostraven la participació de p38 i JNK en l'activació de STAT-1 induïda pel LPS, mentre que suggerien que ERK1/2 no estava involucrada en aquest procés. Per tal de validar aquesta observació, es va silenciar l'expressió de STAT-1 amb siRNA en astròcits de rata, i es va examinar l'expressió gènica de la proteïna EGR-1, normalment regulada per la MAPK ERK1/2. Els resultats van mostrar la inducció en l'expressió gènica de EGR-1 esperada en resposta al LPS, però no es van observar diferències significatives a conseqüència del silenciament de la subunitat p65 de NFkB, o STAT-1, mitjançant siRNAs. A més, i d'acord amb aquests resultats, l'expressió de EGR-1 induïda pel LPS en cultius KO per STAT-1 no va mostrar diferències respecte a la observada en els seus respectius WT.



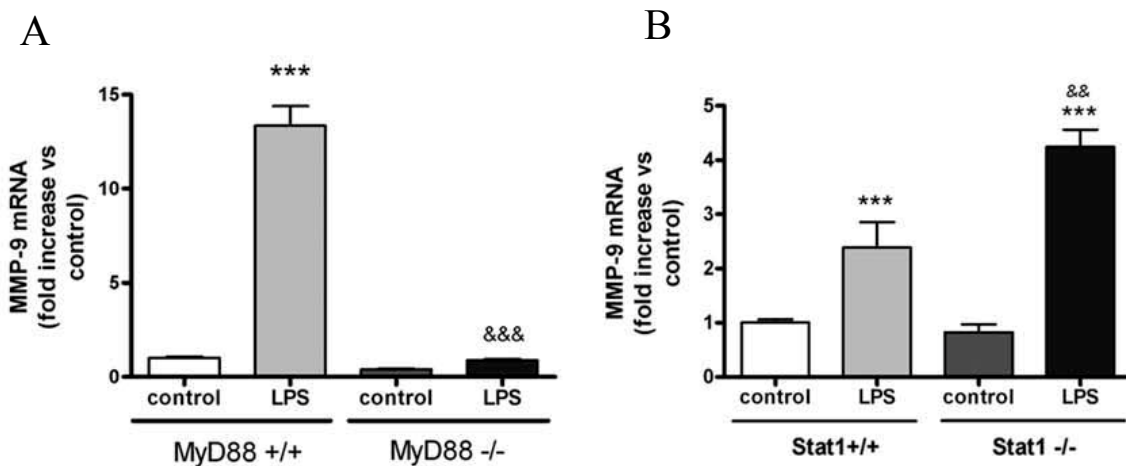
**Figura R25. L'expressió de Egr-1 en resposta al LPS no depèn de STAT-1.** (A) Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser transfectats amb siRNAs contra STAT-1 (siRNA-Stat1-1) i p65 (siRNA-p65), i es van tractar amb LPS (10 ng/ ml) durant 4h. Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica de EGR-1 per RT-PCR, 4h després de LPS. (A) Els gràfics mostren com ni el silenciament de STAT-1, ni de p65 influeixen en l'expressió gènica d'Egr-1. (B) També es van utilitzar cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per STAT-1, en els que tampoc es van observar diferències en l'expressió d'EGR-1 entre astròcits WT i KO. Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control.

No obstant, el mateix tractament en cultius d'astròcits de ratolins WT i KO de MyD88 va mostrar que l'expressió de Egr-1 en resposta al LPS en astròcits KO per MyD88 era superior en comparació amb el tractament en astròcits WT, la qual cosa podria suggerir una regulació negativa de EGR-1 per part de MyD88.



**Figura 26. L'expressió de Egr-1 en resposta al LPS augmenta en astròcits KO per MyD88.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT (MyD88+/+) i KO (MyD88-/-) per MyD88 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml) durant 8h. Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després de LPS. Es va observar un augment en l'expressió d'Egr-1 més elevada en astròcits MyD88-/. Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control i ##  $P < 0.01$  respecte el LPS (wt).

En examinar l'expressió del gen de la MMP-9, un altre gen dependent de l'activitat de ERK1/2 (veure figura 19) es va trobar que la inducció de l'expressió gènica en resposta al LPS era totalment dependent de MyD88. (fig. 25A) No obstant, i a diferència de Egr-1, també es va observar una inducció major de MMP-9 en resposta a LPS en cultius KO per STAT-1, en comparació amb el corresponent WT, (fig. 25B) suggerint una possible regulació negativa de STAT-1 sobre l'expressió de MMP-9.



**Figura R27. L'expressió de MMP-9 en resposta al LPS està regulada per MyD88 i STAT-1.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT (+/+) i KO (-/-) per MyD88 i per STAT-1 van ser tractats amb LPS (10 ng/ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica de MMP-9 per RT-PCR, 4h després de LPS. (A) El gràfic mostra com l'expressió de MMP-9 depèn totalment de MyD88. (B) En canvi, s'observa un augment de MMP-9 en astròcits KO per Stat1 (Stat1-/-). Els gràfics mostren el valor mitjà de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control; && $P < 0.01$  i &&& $P < 0.001$  respecte el LPS.

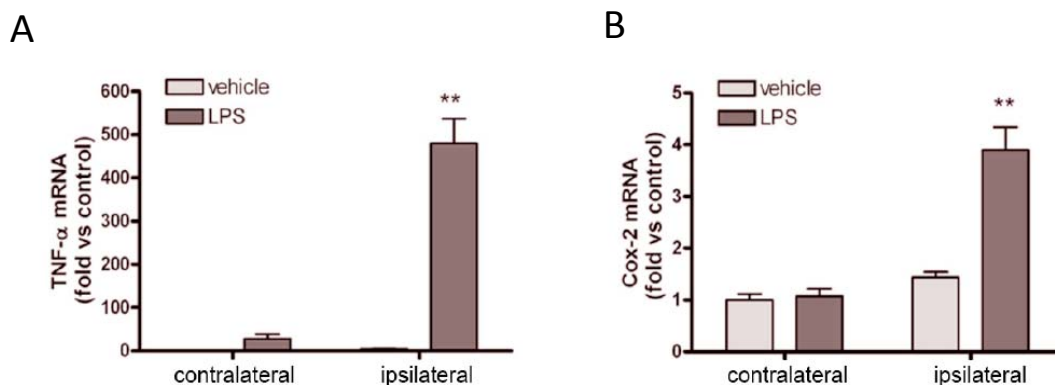
## Treball 2: Efecte de la COX-2 en la producció de prostanoids i en la resposta inflamatòria que es genera en astròcits per activació del receptor TLR-4

Donat que l'activació del receptor TLR-4 regula l'expressió de la COX-2 (Akundi et al., 2005; Hoozemans et al., 2002), estavem interessats en entendre millor els mecanismes moleculars pels quals la senyalització de TLR-4 estava involucrada en l'expressió de la COX-2 en aquest tipus cel·lular.

El següent treball recull els objectius 3, 4 i 5.

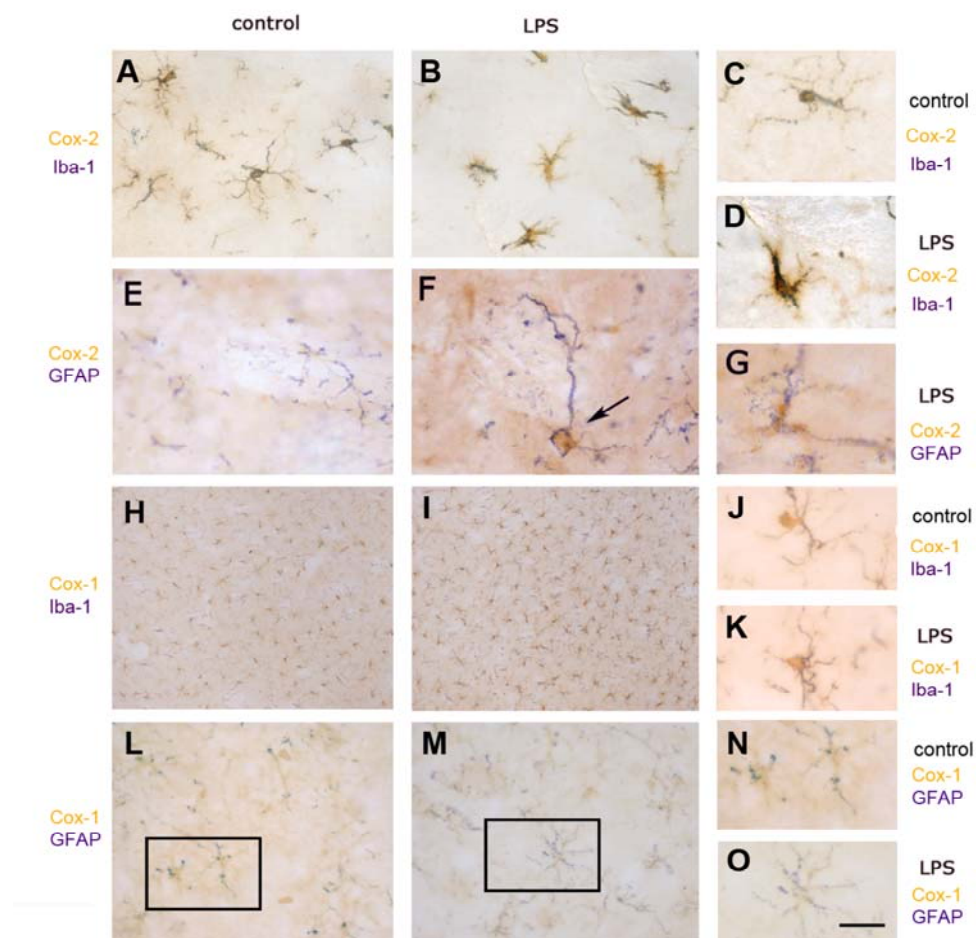
### Els astròcits expressen la COX-2 després de l'administració intracerebral de LPS

L'administració intraestriatal de LPS en rates Sprague-Dawley induïx l'expressió gènica de l'enzim COX-2 (fig. 28B), i de la citocina proinflamatòria TNF- $\alpha$  (fig. 28A), en l'hemisferi ipsilateral, 8h després del tractament amb el LPS.



**Figura R28.** Anàlisi de l'expressió gènica de COX-2 i de TNF- $\alpha$  en el cervell de rates injectades amb el LPS. Les rates van rebre una injecció intraestriatal de LPS o de vehicle (PBS), i el teixit cerebral es va obtenir 8 hores després de la injecció. Les rates injectades amb LPS (5 $\mu$ l, 1  $\mu$ g/  $\mu$ l) mostren un increment pronunciat en l'expressió de TNF- $\alpha$  i COX-2 en l'hemisferi ipsilateral en comparació a la dels animals que van rebre el vehicle, o en l'hemisferi contralateral. Els gràfics mostren el valor promig de n=3-4 animals per cada grup d'experimentació. Els símbols indiquen: \*\*\* $P$  < 0.001, \*\* $P$  < 0.01 i \* $P$  < 0.05, respecte del tractament amb el vehicle.

Es va assajar l'expressió proteïca de la COX-2, i també de la COX-1, utilitzant tècniques d'immunohistoquímica. Es va observar una forta inducció de la proteïna COX-2 en resposta a LPS, en astròcits i micròglia, 8 hores després del tractament (fig. 29). En canvi no s'observava una inducció de la proteïna COX-1 en resposta a LPS. No obstant això, la proteïna COX-1, s'expressava en condicions basals, preferentment en cèl·lules de la micròglia (fig. 29 I-K) i, en menor mesura, en cèl·lules astroglials (fig. 29 M-O).



**Figura R29. Immunohistoquímica contra les proteïnes COX-2 i COX-1 (marró) en el cervell de rates control (A, C, E, H, J, L, N) i tractades amb LPS (B, D, F, G, I, K, M.** La COX-2 és induïda pel LPS i colocalitza amb el marcador microglial Iba-1 (B, D) i astroglià GFAP ( F, G) (blau fosc / púrpura). La COX-1 s'expressa de forma predominant en cèl·lules de la micròglia (H, J), i en menor mesura en cèl·lules astroglials (LN), i no s'observen canvis en la seva expressió després de el LPS (I, K, M, O). Las zones indicades amb rectangles en L, M es magnifiquen en N, O, respectivament. Escala de la barra = 30  $\mu$ m (AG, JK, N, O), 60  $\mu$ m (L, M), i 120  $\mu$ m (HI). Les rates van rebre una injecció intraestriatal de LPS o de vehicle (PBS), i el teixit cerebral es va obtenir 8 hores després de la injecció.

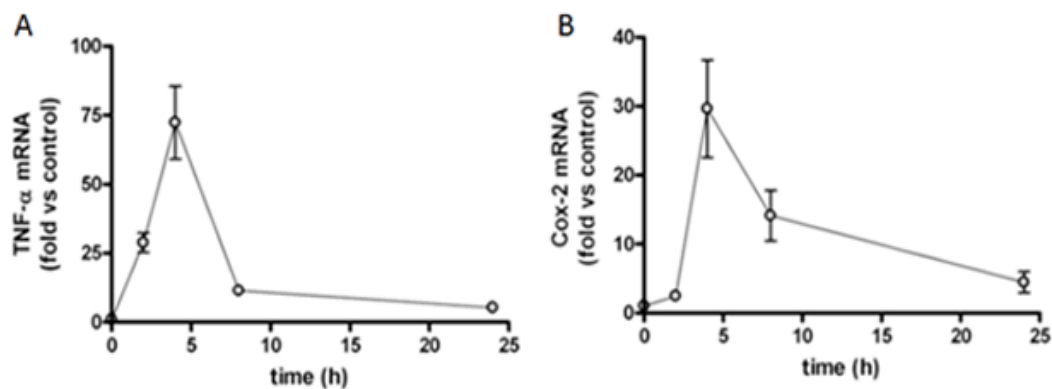
A continuació, es va realitzar un estudi *in vitro* en cultius de cèl·lules astroglials tractades amb el LPS per esbrinar els mecanismes subjacents a la inducció de la COX-2, i l'alliberació de prostanoids induïda per l'activació de TLR-4 en aquest tipus cel·lular. En primer lloc ens vam proposar estudiar la regulació de l'expressió de la COX-2 per la via dependent de MyD88, així com la contribució de la via de les MAPKs.

---

### Estudi de l'expressió de COX-2 regulada per la via dependent de MyD88

---

En cultius primaris d'astròcits corticals de rata el LPS induïa l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  (fig. 30A) i de la COX-2 (fig. 30B), tal i com s'havia vist *in vivo* (fig. 28A i 28B).

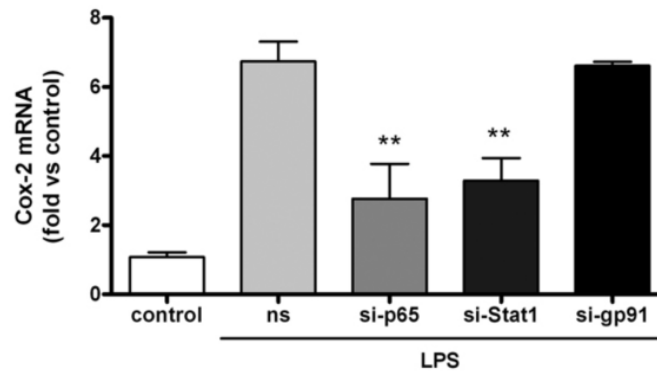


**Figura R30. Inducció de l'expressió gènica de COX-2 i de TNF- $\alpha$  en astròcits de rata en cultiu.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 2, 4, 8 i 24 hores després de LPS. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt.

El factor de transcripció NF $\kappa$ B estava involucrat en la inducció de l'ARNm de la COX-2, ja que el silenciament de la subunitat p65 de NF $\kappa$ B amb siRNAs específics, atenuava l'expressió gènica de la COX-2, mentre que no s'observava el mateix efecte quan es

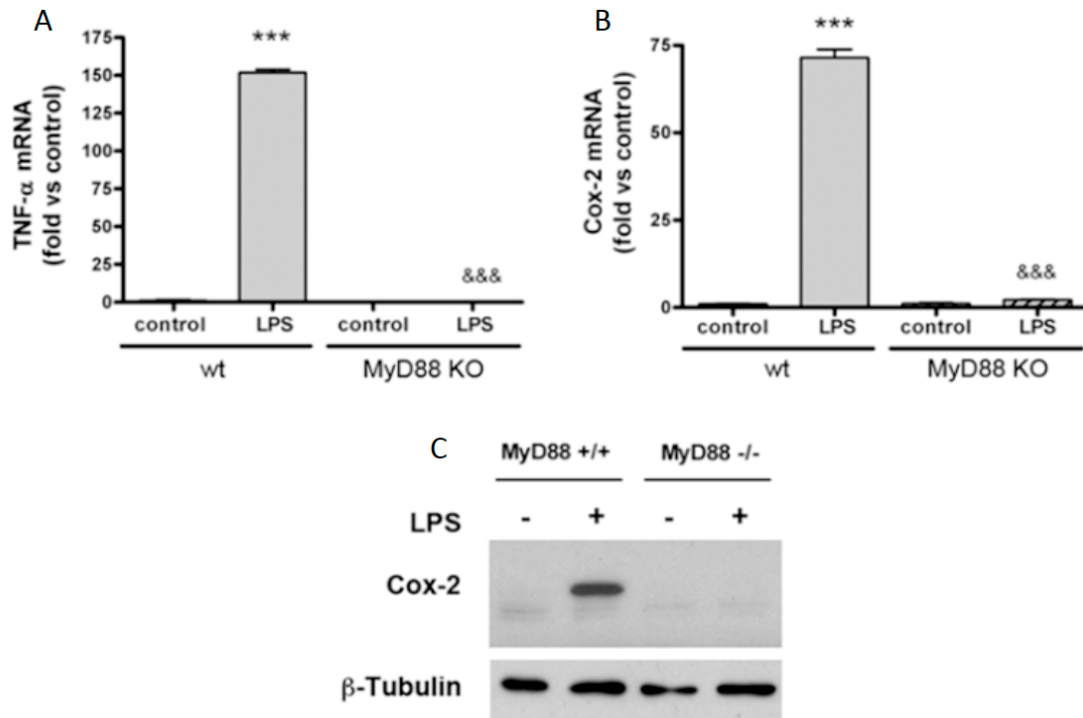


silenciaven altres gens no implicats en la via de senyalització de MyD88, com era el cas del gen gp91, que codifica per una subunitat del complex proteic NADPH oxidasa (fig. 31). La via JAK1/STAT-1 també estava involucrada en la regulació gènica de la COX-2, ja que el silenciament de STAT-1 amb siRNAs específics també atenuava l'expressió de la COX-2 (fig.31).



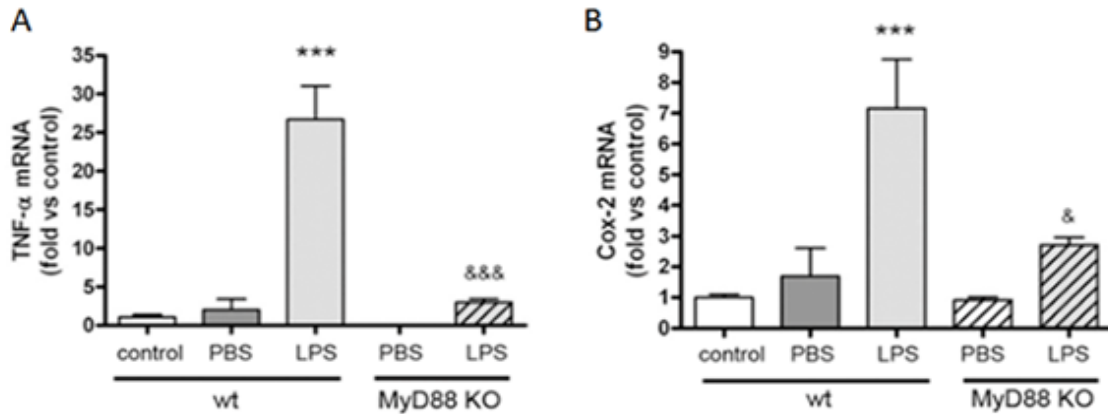
**Figura R31. La inducció de l'expressió de COX-2 és dependent de NFκB.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser transfectades amb siRNAs contra la subunitat p65 de NFκB (si-p65), la proteïna STAT-1 (si-Stat1) o la subunitat de la NADPH (si-gp91), i tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després de LPS. Com a control del silenciament es va utilitzar un siRNA sense capacitat de silenciament, *Non-silencing RNA* (ns). El gràfic mostra el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control; i \*\* $P < 0.01$  respecte el LPS(ns).

A continuació, es van utilitzar astròcits de ratolins deficients en MyD88, i els corresponents ratolins WT (C57/BL6), per a confirmar la implicació de la via dependent de MyD88 en l'expressió de la COX-2, ja que s'havia observat que el silenciament de p65 atenuava l'expressió de la COX-2 (veure fig. 31). Vam observar que en cèl·lules deficients per la proteïna adaptadora MyD88, el LPS no era capaç d'induir l'expressió gènica de TNF-α (fig. 32A), ni de la COX-2 (fig. 32B). De la mateixa manera, el LPS tampoc induïa l'expressió de la proteïna COX-2 en cultius deficients en MyD88 (fig. 32C). Demostrant que en astròcits la inducció de la COX-2 per LPS depèn de l'activació de la via MyD88 i de NFκB.



**Figura R32. L'expressió de COX-2 depèn de MyD88.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolí WT i KO per MyD88 van ser tractats amb LPS (10 ng/ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després de LPS. Els gràfics mostren que la inducció de l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  i de COX-2 no es produeix en els astròcits deficients en MyD88 (MyD88 KO, -/-), respecte als astròcits de tipus salvatge (wt, +/+). Així mateix, l'expressió de la proteïna COX-2, estudiada per WB 8 hores després de LPS, es detecta només en cèl·lules WT, però no en les cèl·lules deficients en MyD88. La proteïna  $\beta$ -tubulina es mostra com un control de càrrega. El gràfic mostra el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control, i &&& $p < 0.001$  respecte el control WT.

També es van realitzar aquestes comprovacions en ratolins deficients en MyD88 *in vivo*, després de 8h d'una administració intraestriatal de LPS (fig. 33). En aquest cas també es va observar una forta reducció de l'expressió de TNF- $\alpha$  (fig. 33A) i COX-2 (fig. 33B) en comparació amb els ratolins de tipus salvatge (WT), evidenciant la dependència de la via MyD88 també *in vivo*.

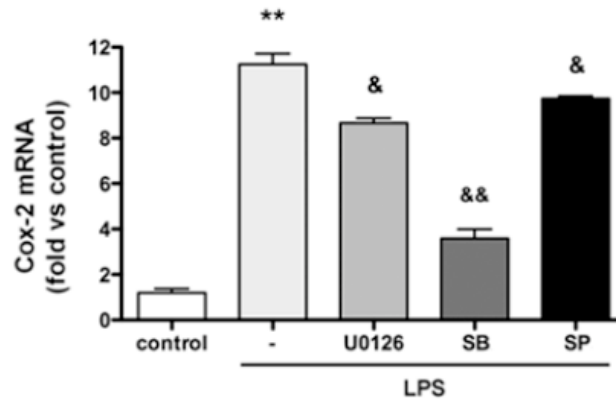


**Figura R33. L'expressió de COX-2 depèn de MyD88. Ratolins WT i KO per MyD88.** Ratolins WT i KO per MyD88 van rebre una injecció intraestriatal de LPS o de vehicle (PBS), i el teixit cerebral es va obtenir 8 hores després de la injecció. Els ratolins injectats amb LPS ( $5\mu\text{l}$ ,  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mostren un increment pronunciat en l'expressió de TNF- $\alpha$  i COX-2 en l'hemisferi ipsilateral en comparació a la dels animals que van rebre el vehicle (PBS), o en l'hemisferi contralateral. Els gràfics mostren el valor promig de  $n=3-4$  animals per cada grup d'experimentació. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  i \* $P < 0.05$ , respecte del tractament amb el vehicle.

### Implicació de la via de les MAPK en la regulació gènica de COX-2

Es va comprovar la possible implicació de la via de les MAPKs en l'expressió gènica de la COX-2, ja que s'havia descrit en altres cèl·lules (Guha i Mackman, 2001; Lamon et al. 2010). Per fer això, es van utilitzar els inhibidors específics de MAPKs: SB239063 (inhibidor de p38), U0126 (inhibidor d'ERK1/2) i SP600125 (inhibidor de JNK), per esbrinar quina era la contribució de cadascun dels membres de les MAPKs en la senyalització induïda per TLR-4 (fig. 34). Es va observar que les 3 MAPKs estudiades, p38, JNK i ERK 1/2 participaven en la inducció de l'expressió de la COX-2 en astròcits.

Aquests resultats evidenciaven l'important paper de les MAPKs en la regulació de la COX-2 després del tractament amb el LPS en astròcits, i la complexa regulació gènica d'aquest enzim.

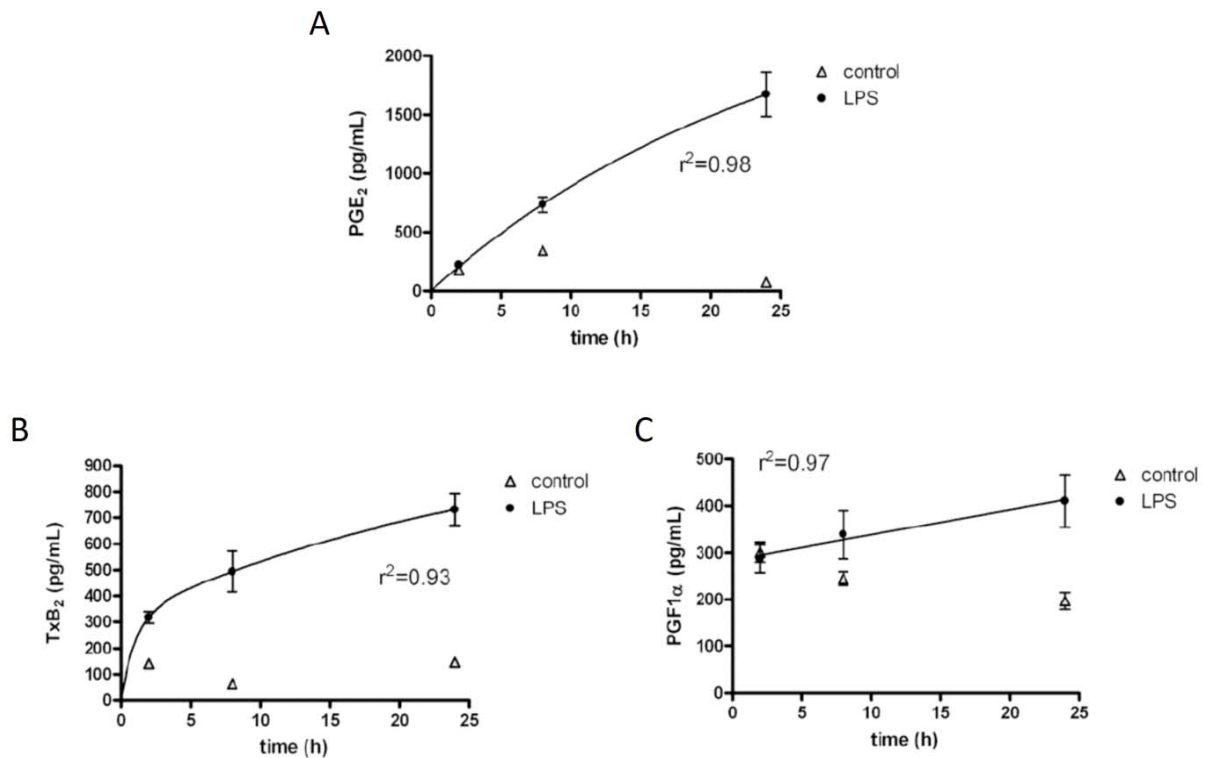


**Figura R34. Les MAPKs influencien l'expressió de COX-2.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml) en presència o absència (-) dels inhibidors de MAPKs. Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després de LPS. El gràfic mostra com la inducció de l'expressió gènica de COX-2 depèn de les vies de p38, ERK1/2 i JNK.. El gràfic mostra el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat:  $**P < 0.01$  respecte el control; i  $&&P < 0.01$  i  $&P < 0.05$ , respecte el LPS(-).

## Producció de prostanoids en resposta al LPS

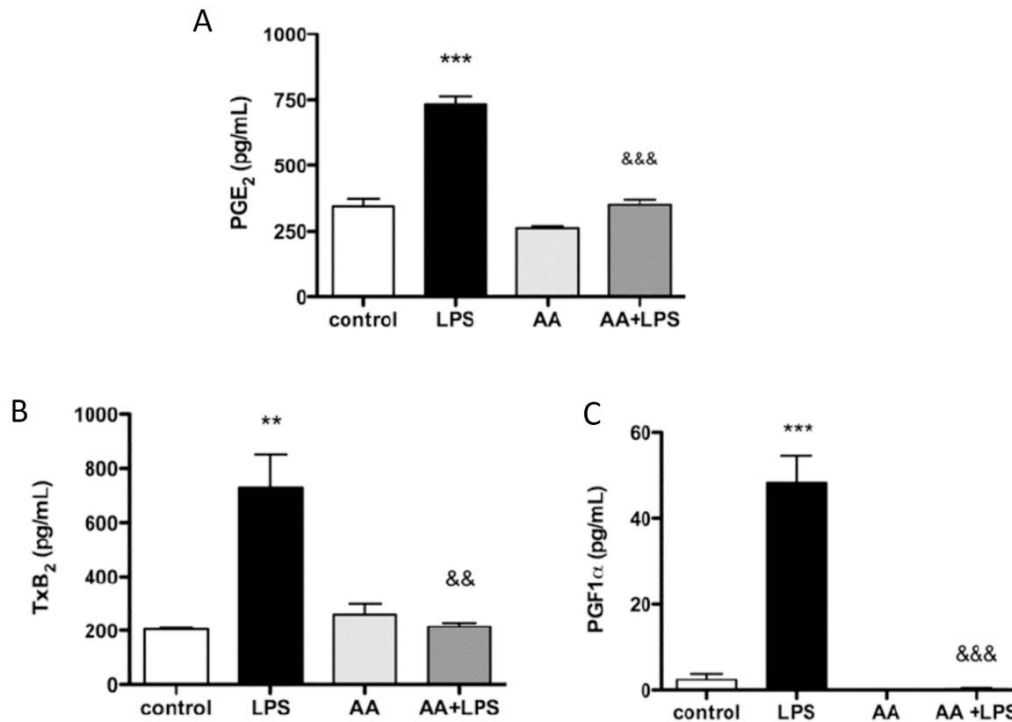
A continuació vam estudiar la producció dels metabòlits resultants de l'activitat de la COX-2. Com ja s'ha comentat en la introducció, els enzims COX metabolitzen l'àcid araquidònic (AA) a PGG<sub>2</sub>, i ràpidament a PGH<sub>2</sub>. I és a partir de la PGH<sub>2</sub>, que diferents enzims (sintases de prostaglandines) generen els diferents prostanoids, incloent la PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) i el tromboxà A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), entre d'altres.

Es va examinar el perfil de diversos prostanoids induïts pel LPS en el medi de cultiu d'astròcits de rata, utilitzant assajos d'ELISA. La producció de TxA<sub>2</sub> es va avaluar a través de la mesura de TxB<sub>2</sub>, ja que el TxA<sub>2</sub> té una vida mitjana de només uns pocs segons (Smith, 1989), i el TxB<sub>2</sub> és un metabòlit més estable. La PGI<sub>2</sub> també té una vida mitjana curta, de només uns pocs minuts en una solució tampó (Smith, 1989), en aquest cas la seva producció també es va anaitzar a través d'un altre metabòlit més estable, la 6-ceto-prostaglandina F<sub>1α</sub> (6-ceto-PGF<sub>1α</sub>). Els resultats van mostrar una alliberació important de PGE<sub>2</sub> al medi de cultiu cel·lular, a partir de 2h després del tractament amb el LPS, que augmentava fins a 24h (fig. 35A). El LPS també va augmentar la concentració de TxB<sub>2</sub> (fig. 35B) i, en menor mesura, de 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> (fig. 35C), ade les 8h i a les 24 hores.



**Figura R35. El tractament amb el LPS indueix la formació i secreció de prostanoïdes al medi de cultiu.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratna van ser tractats amb LPS (10 ng/ml), i posteriorment es va mesurar la concentració de prostanoïdes per mitjà d'assajos d'ELISA, a 2, 4 i 8 i 24 hores després del LPS. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 5$  per cada punt.

La fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ) s'activa en la isquèmia cerebral en resposta a elevades concentracions de calci intracel·lular. Existeixen tres isoformes de la  $PLA_2$ , la  $PLA_2$  citosòlica ( $cPLA_2$ ), la  $PLA_2$  intracel·lular ( $iPLA_2$ ) i la  $PLA_2$  secretada ( $sPLA_2$ ). Aquestes tres isoformes poden alliberar AA a partir dels fosfolípids de membrana, no obstant, s'ha vist que és la  $cPLA_2$  la fosfolipasa que juga un paper més rellevant en la isquèmia cerebral. Per això, es va utilitzar l'inhibidor de la  $cPLA_2$ , AACOCF3, per a esbrinar si la síntesi de prostanoïdes en els nostres cultius es devia a l'activitat de l'enzim  $PLA_2$ , i es va observar que efectivament, aquest inhibidor impedia totalment la producció de prostanoïdes (fig. 36). Per tant, la  $cPLA_2$  sembla ser la responsable de la mobilització i disponibilitat de l'AA a partir dels fosfolípids de membrana, en els nostres cultius tractats amb LPS.

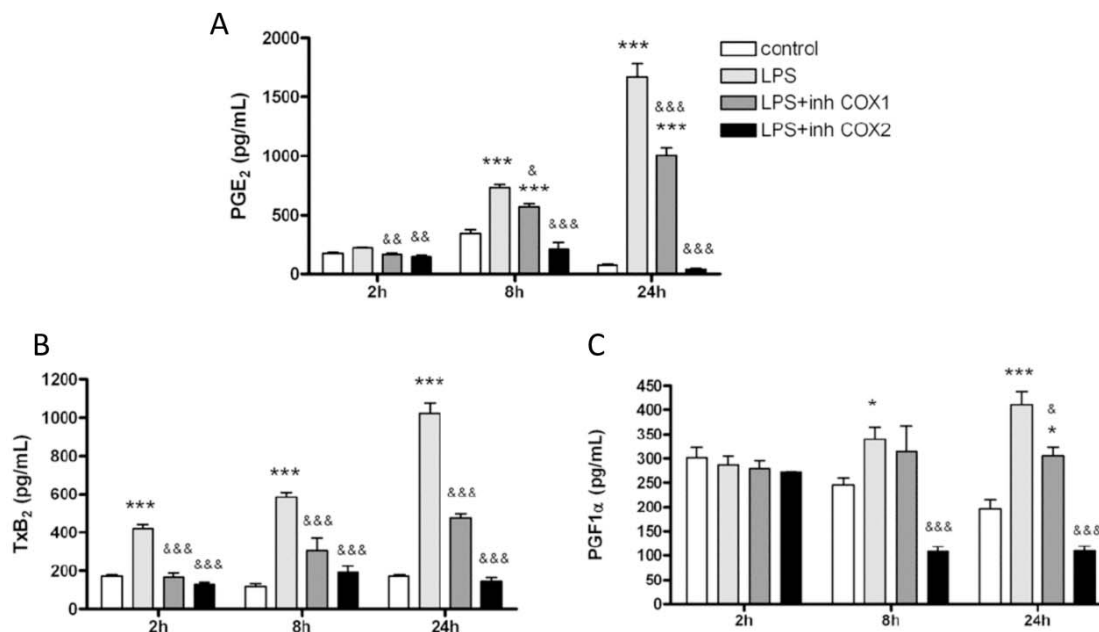


**Figura R36. El tractament amb l'inhibidor de la PLA2 AACOCF3 inhibeix completament la formació i alliberació de prostanoïds en el medi de cultiu.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb AACOCF3 (2 $\mu$ M) 1 hora abans del tractament amb el LPS (10 ng/ml), i posteriorment es va mesurar la concentració de prostanoïds per mitjà d'assajos d'ELISA, a 8 hores després del LPS. Es van assajar els nivells dels prostanoïds PGE<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub> i PGF<sub>1 $\alpha$</sub> . En els gràfics es pot observar clarament com en presència de l'inhibidor AACOCF3 (AA) els valors de tots els prostanoïds assajats són els mateixos que els valors controls sense tractament amb el LPS. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$  i \*\* $P < 0.01$  respecte el control, i &&& $p < 0.001$ , && $P < 0.01$  respecte el LPS.

## Estudi de l'enzim COX responsable de la síntesi de prostanoïds

Amb l'objectiu de discernir quin era el paper de cada isoforma de l'enzim COX en la síntesi de prostanoïds en cultius d'astròcits de rata, es van utilitzar inhibidors farmacològics, l'inhibidor de COX-1, SC-560 (10nM), i l'inhibidor de COX-2, NS-398 (3 $\mu$ M), i es va avaluar en cada cas l'alliberació de prostanoïds en el medi de cultiu.

El pretractament amb inhibidor NS-398, inhibia de forma molt eficient l'alliberació dels tres prostanoïds que s'estaven testant PGE<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub> i PGI<sub>2</sub>, mentre que la inhibició de la COX-1 amb el SC-506, només inhibia en part la generació de prostanoïds després del tractament amb LPS (fig. 37).

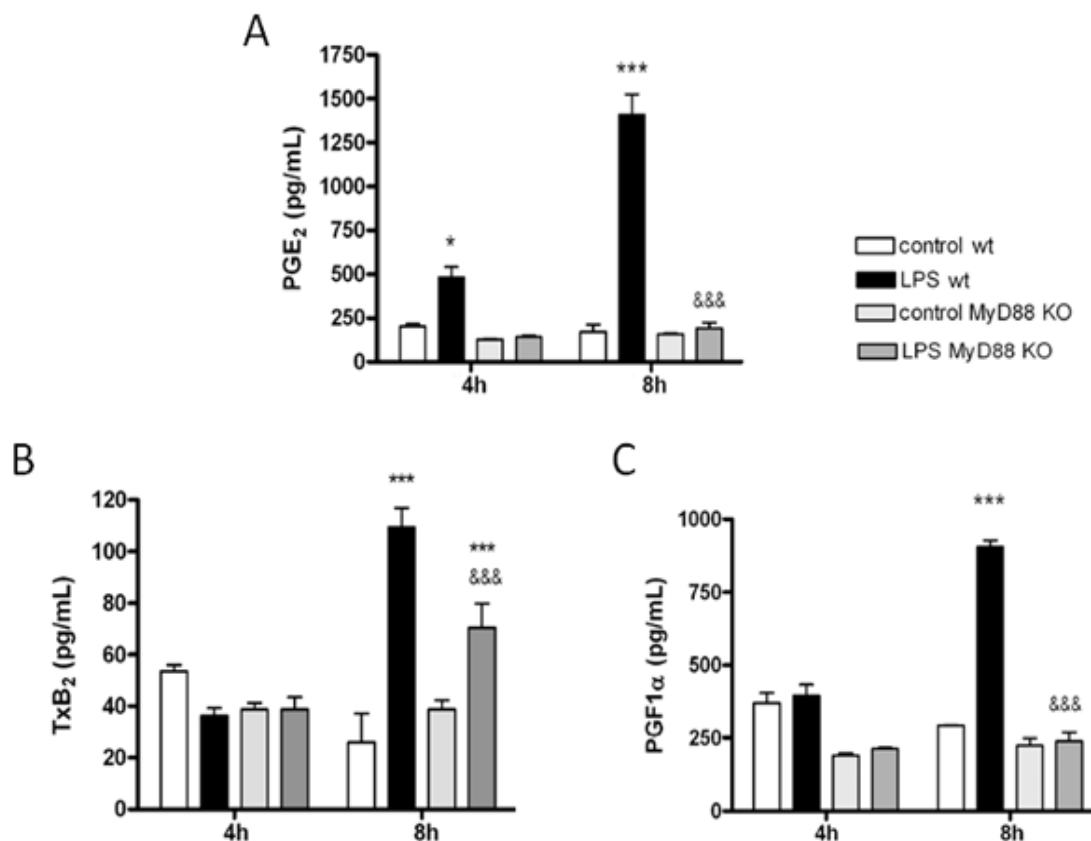


**Figura R37. NS-398 inhibeix la formació i alliberació de prostanoids.** Cultius primaris d'astròcits corticals de rata van ser tractats amb LPS (10 ng/ml), i posteriorment es va mesurar la concentració de prostanoids per mitjà d'assajos d'ELISA, a 2, 8 i 24 hores després del LPS. Es van assajar els nivells dels prostanoids PGE<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub> i PGF1- $\alpha$ . En el gràfic s'observa que el pretractament amb l'inhibidor de COX-2, NS-398 (3  $\mu$ M) redueix fortament la producció i alliberació de prostanoids en el medi de cultiu, en resposta al tractament amb LPS. El pretractament amb l'inhibidor de la COX-1, SC-560 (10nM), només aconsegueix atenuar la producció de prostanoids observada. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  i \* $P < 0.05$  respecte el control; &&& $P < 0.001$ , && $P < 0.01$  i & $P < 0.05$  respecte el LPS.

Aquests resultats suggerien que la COX-2 era el principal mediador de la producció de prostanoids en resposta al tractament amb LPS en els nostres cultius, però assenyalava una petita contribució de la COX-1. No obstant, hi ha estudis que mostren que l'inhibidor SC-560 pot exercir efectes inhibitoris no específics sobre la COX-2 (Brenneis et al., 2006). Aquesta possible inhibició de la COX-2 podria explicar per què es trobaven efectes inhibitoris parcials de SC-560 en la producció de prostanoids després de LPS en el nostre sistema.

Anteriorment s'ha demostrat que la inducció de COX-2 per LPS s'inhibia en cèl·lules deficientes en la proteïna adaptadora MyD88 (fig. 31A-B), per tant també es va assajar la producció de prostanoids en aquests cultius per a confirmar l'activitat predominant de COX-2 en la síntesi de prostanoids en el nostre sistema. Es va observar que la manca de MyD88 reduïa significativament la producció de prostanoids després del tractament

amb LPS (fig. 38 A-C). Això donava suport a la idea de que la COX-2 era la isoforma de la COX responsable de la síntesi de prostanoids.

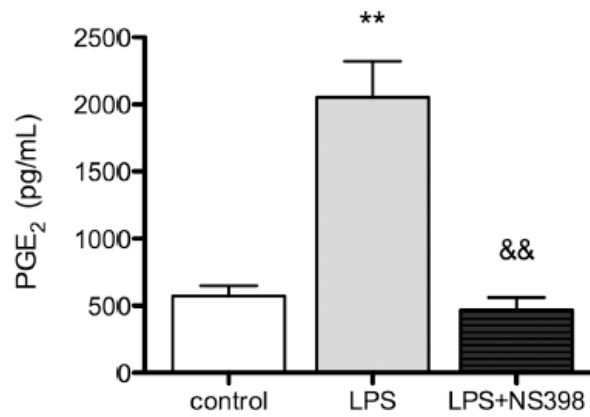


**Figura R38. La inducció de prostanoids en resposta a el LPS depèn de l'activació de la via dependent de MyD88.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolí van ser tractats amb LPS (10 ng/ml), i posteriorment es va mesurar la concentració de prostanoids per mitjà d'assajos d'ELISA, a les 4 i 8 hores després del LPS. En els gràfics es pot veure com la producció de prostanoids es veu fortament atenuada en les cèl·lules deficientes en MyD88. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  i \* $P < 0.05$  respecte el control; &&& $P < 0.001$ , && $P < 0.01$  i & $P < 0.05$  respecte el LPS.

Atès que aquests estudis es van dur a terme en cultius enriquits en astròcits, es va voler comprovar si la COX-2 també actuava com a mediador principal en la producció de prostanoids en cultius de cèl·lules de la micròglia.

Els resultats mostraven que l'inhibidor NS-398 impedia la producció de la PGE<sub>2</sub> induïda pel LPS també en aquest tipus cel·lular (fig. 39), evidenciant que la COX-2 intervenia de forma predominant en la producció de prostanoids en resposta al LPS, tant en cèl·lules de la micròglia com en cèl·lules astroglials.

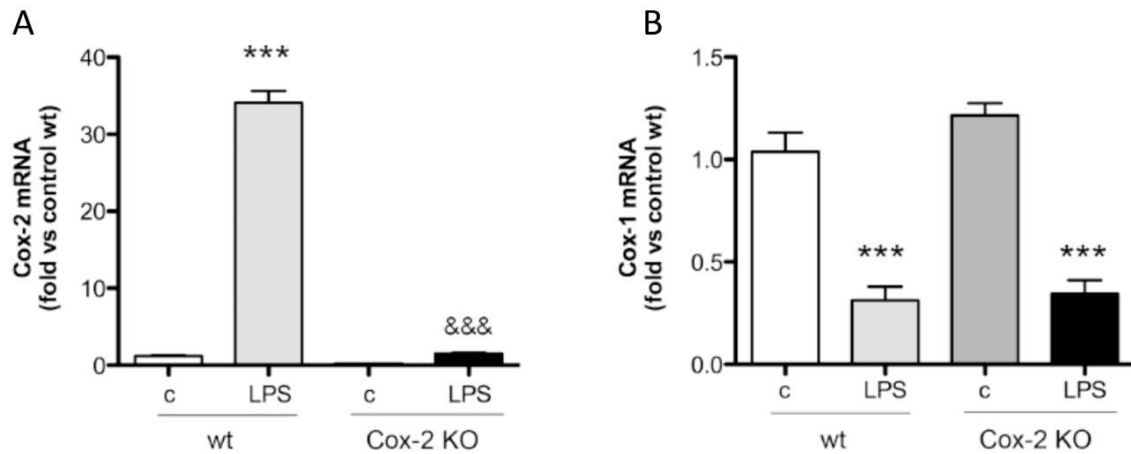




**Figura R39.** La producció de PGE<sub>2</sub> induïda pel LPS en la microglia se suprimeix també en presència de NS-398. Cultius primaris de cèl·lules de la microglia van ser tractats amb NS-398 (3μM) 1 hora abans del tractament amb el LPS (10 ng/ ml), i posteriorment es va mesurar la concentració de la PGE<sub>2</sub> per mitjà de l'assaig d'ELISA corresponent, 8 hores després del LPS. En el gràfic es pot veure clarament com la presència de l'inhibidor de la COX-2, NS-398 (n = 3), suprimeix la producció de PGE<sub>2</sub> induïda per LPS en la microglia. El gràfic mostra el valor promig de diferents experiments independents, n = 3 per cada punt. Hem considerat: \*\*P < 0.01 respecte el control; i &&P < 0.01 respecte el LPS.

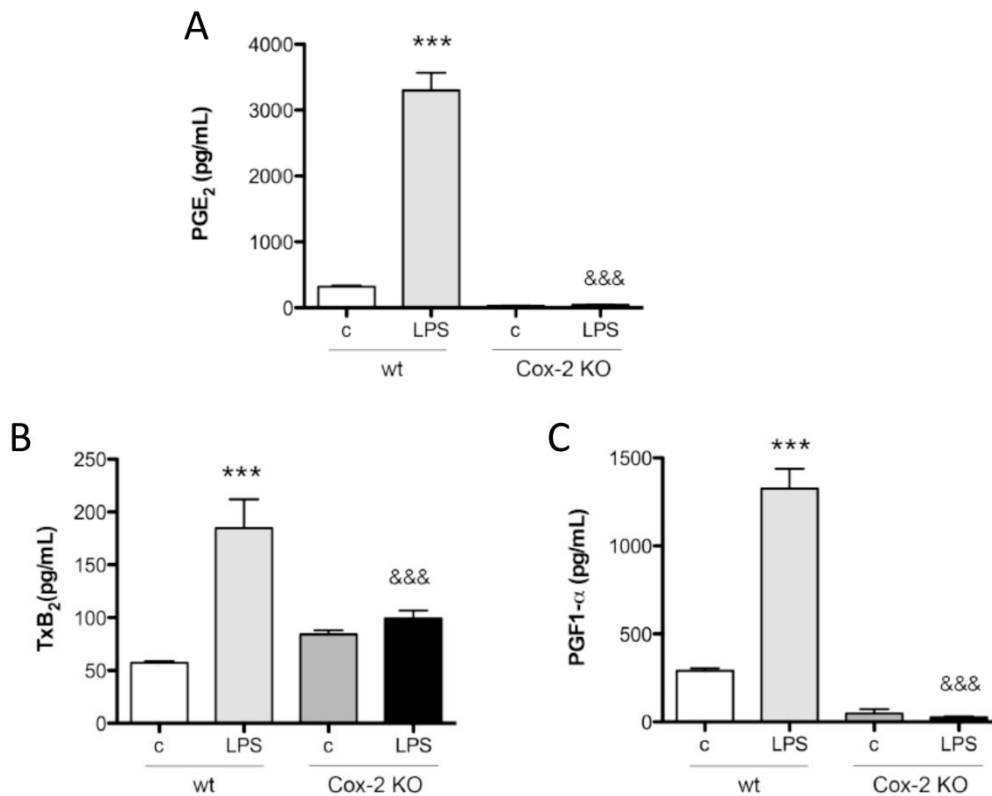
Donat que el tractament amb inhibidors farmacològics pot no ser del tot específic, es va decidir utilitzar cultius d'astròcits corticals obtinguts a partir de ratolins deficientes en COX-1 i en COX-2, i els seus corresponents controls WT, amb l'objectiu de validar els resultats anteriors.

Es va comprovar que el LPS induïa l'expressió gènica de la COX-2 en astròcits WT per COX-2 (fig. 40A), i que aquesta inducció no s'observava en els astròcits deficientes (KO). A més, també es va mesurar l'expressió gènica de COX-1 en aquests cultius, per a descartar que la COX-1 pogués actuar compensat la manca de l'enzim COX-2. No obstant, el que es va observar va ser que el LPS provocava una disminució en l'expressió de la COX-1 (fig. 40B).



**Figura R40. El tractament amb LPS redueix l'expressió gènica de COX-1.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després del tractament amb el LPS. En els gràfics es pot observar com el LPS induïx l'expressió gènica de COX-2 en cultius d' astròcits WT però no en els COX-2 KO, mentre que redueix l'expressió gènica de COX-1 en ambdós tipus de cèl·lules. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 4-6$ . Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control.

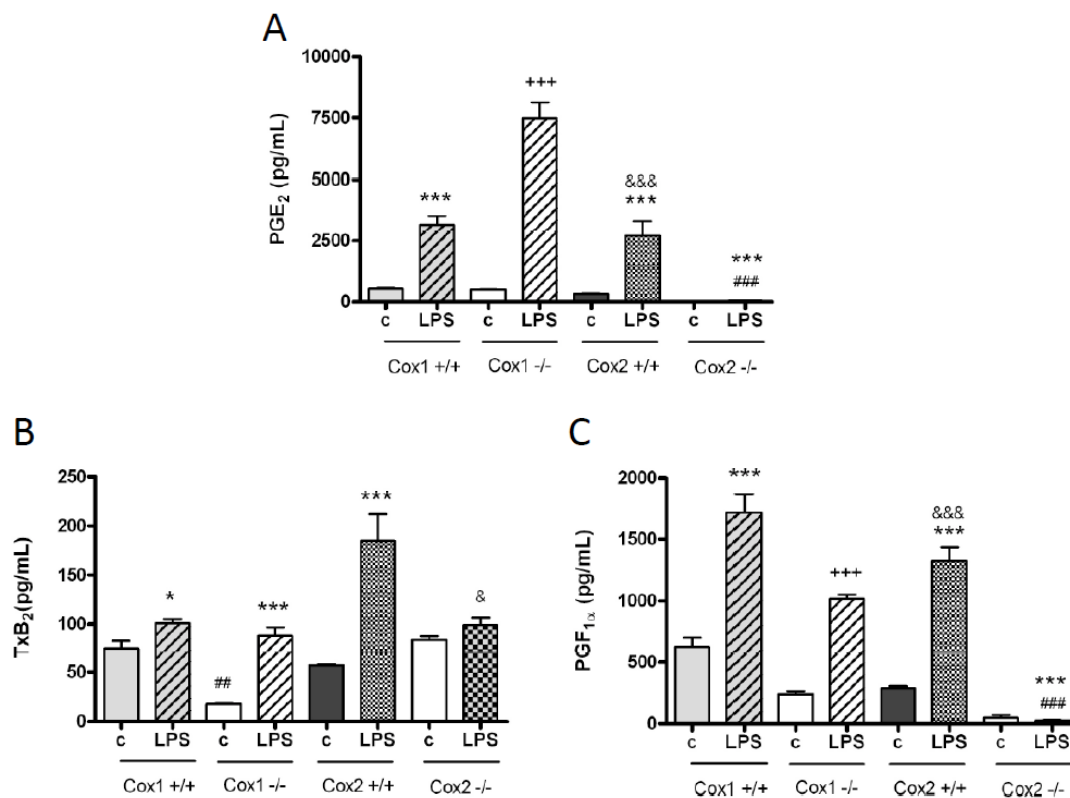
També es va observar que el tractament amb el LPS en els astròcits deficients en COX-2, no era capaç d'induir la producció dels prostanoids testats anteriorment, la PGE<sub>2</sub> (fig. 41A), el TxA<sub>2</sub> (fig. 41C) i la PGI<sub>2</sub> (fig. 41B), de forma significativa.



**Figura R41. El producció de prostanoïds depèn de COX-2.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ml), i posteriorment es va mesurar la concentració de prostanoïds per mitjà d'assajos d'ELISA, 8 hores després del LPS. Els gràfics mostren una forta producció de PGE<sub>2</sub> principalment, així com de TxB<sub>2</sub> i PGF1- $\alpha$ , en resposta a LPS en astròcits WT. No obstant, en els astròcits KO per COX-2 tractats amb LPS la producció de prostanoïds és similar als corresponents valors dels controls. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 4-6$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  i \* $P < 0.05$  respecte el control; &&& $P < 0.001$ , && $P < 0.01$  i & $P < 0.05$  respecte el LPS.

Per tal de comprovar que l'elevada producció de prostanoïds observada era conseqüència de l'acció de la COX-2 i no de la COX-1, es va decidir utilitzar cultius d'astròcits corticals obtinguts a partir de ratolins deficients en COX-1, i els seus corresponents controls WT. Es va mesurar l'alliberació dels prostanoïds testats en aquests cultius i es va observar que la manca de COX-1 no variava significativament la producció de prostanoïds en resposta al LPS (fig. 42).

En conjunt, aquestes resultats mostraven que la producció de prostanoïds en astròcits en resposta al tractament amb LPS, era deguda principalment a l'acció de la COX-2.



**Figura R42. El producció de prostanoids depèn de COX-2.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 i per COX-1, van ser tractats amb LPS (10 ng/ml), i posteriorment es va mesurar la concentració de prostanoids per mitjà d'assajos d'ELISA, 8 hores després del LPS. Els gràfics mostren que el paper de COX-1 en la producció de prostanoids, i principalment de la PGE<sub>2</sub>, és significativament menor en comparació amb la COX-2. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 4-6$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  i \* $P < 0.05$  respecte el control; &&& $P < 0.001$ , && $P < 0.01$  i & $P < 0.05$  respecte el LPS.

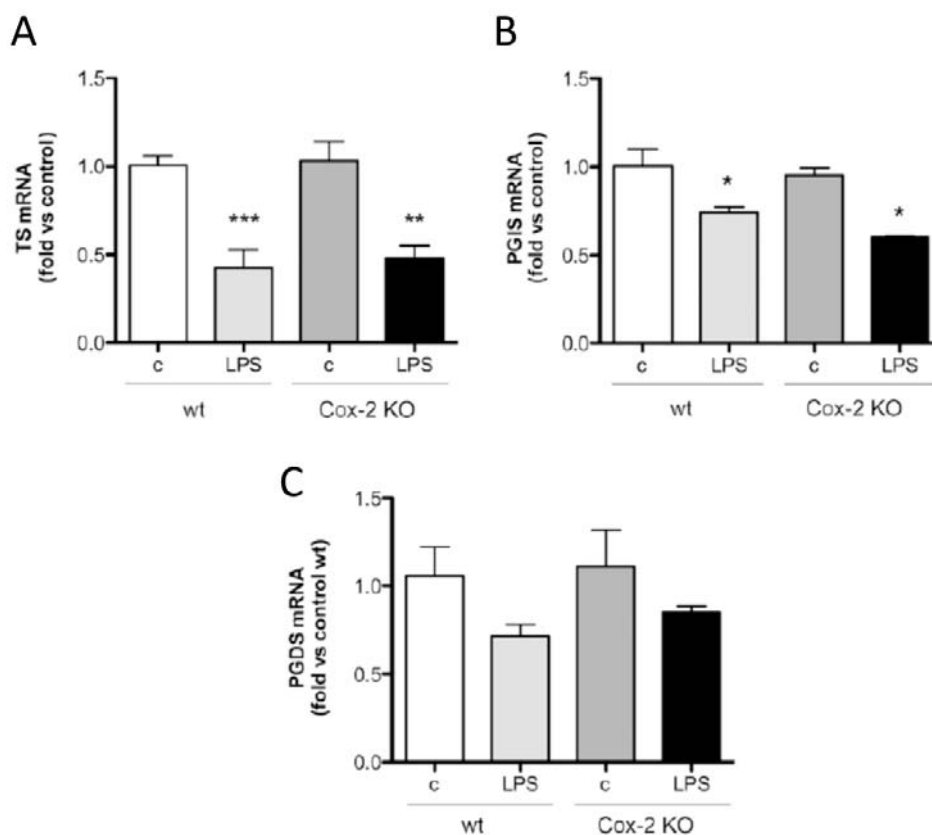
## Efecte del LPS sobre l'expressió dels enzims isomerases de prostaglandina

Els diferents tipus de prostanoids que es generen a partir de la prostaglandina PGH<sub>2</sub> depenen de l'acció d'uns enzims anomenats prostaglandina isomerases o prostaglandina sintases.

Es va observar que el tractament amb el LPS provocava una reducció en l'expressió gènica de les sintases TS (fig. 43A), PGIS (fig. 43B). Comparant aquests resultats amb els obtinguts en la Figura R 40, on es veia que el tractament amb LPS tenia un efecte

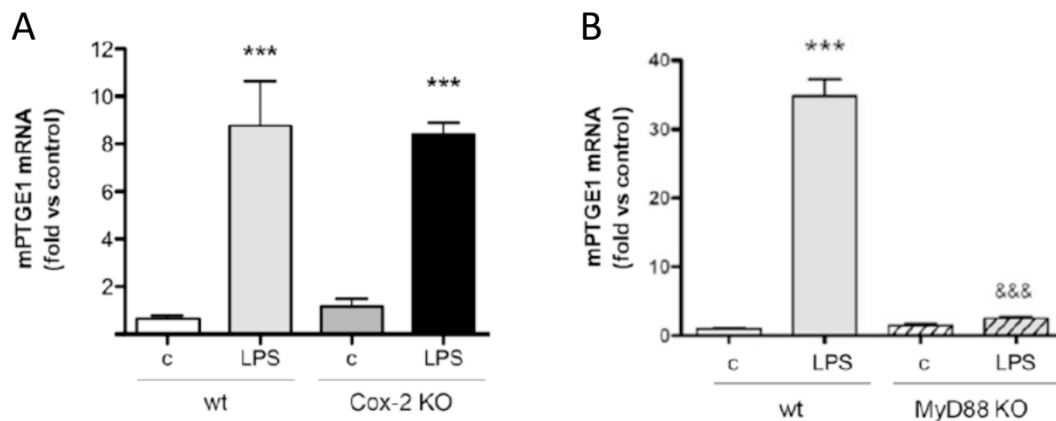
similar en l'expressió de COX-1, això podia suggerir que aquests gens podrien tenir una regulació gènica comuna.

També es van examinar l'expressió de la sintasa de la PGD<sub>2</sub> (PGD2S), que és produïda pels astròcits (Giacomelli et al., 1996), i la seva expressió augmenta en certes condicions inflamatòries (Hokari et al. 2009). No obstant, el LPS no va modificar significativament l'expressió gènica de la PGDS en els cultius d'astròcits deficientes en COX-2, només es va observar una tendència a la disminució de la seva expressió (fig. 43C).



**Figura R43. El tractament amb LPS inhibeix l'expressió de diverses sintases de prostaglandina.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després del tractament amb el LPS. Els gràfics mostren com l'expressió gènica de sintasa de tromboxà (TS) la sintasa de la prostaciclina (PGIS) es veu reduïda significativament en resposta a el LPS. La sintasa de la prostaglandina D2 tipus L (PGDS), mostra una tendència a reduir la seva expressió en resposta a LPS, no obstant, els valors no van mostrar una diferència significativa. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 4-6$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  i \* $P < 0.05$  respecte el control.

En contra dels resultats anteriors, sí que es va observar una forta expressió gènica de la sintasa microsomal de PGE<sub>2</sub>-1 (mPGES-1), que és una de les isoformes de la sintasa PGE<sub>2</sub> (fig. 44A), induïda en resposta al LPS. A més, la inducció de mPGES-1 després de LPS era dependent de la via MyD88, ja que el tractament amb LPS en cèl·lules deficientes en MyD88 no van mostrar cap augment en l'expressió gènica de mPGES-1 (fig. 44B), tal i com passava en el cas de l'expressió gènica de COX-2 (fig. 33).



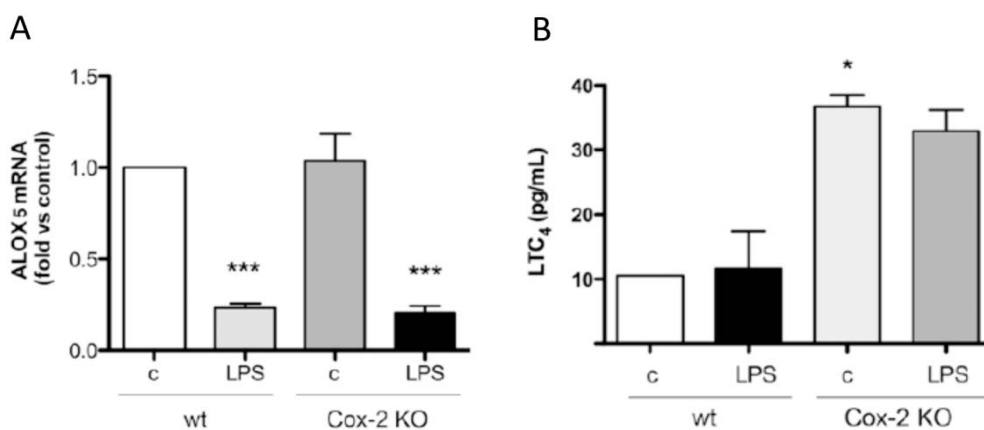
**Figura R44. El tractament amb LPS induïx l'expressió de la sintasa de PGE<sub>2</sub>.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 i per MyD88 van ser tractats amb LPS (10 ng/ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després del tractament amb el LPS. Els gràfics mostren una forta inducció de l'expressió de la sintasa microsomal de PGE<sub>2</sub> (mPGES-1) en resposta a LPS, tant en astròcits WT com KO per COX-2, i que aquesta inducció està regulada per la via dependent de MyD88, igual que s'observava en l'expressió de COX-2. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 4-6$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control; &&& $P < 0.001$  respecte el LPS.

Aquests resultats van mostrar que el LPS induïa l'expressió de mPGES-1 a través de la via dependent de MyD88 de manera coordinada amb la inducció de la COX-2 generant nivells molt elevats de PGE<sub>2</sub>.

## Efecte del LPS sobre altres vies del metabolisme de l'àcid araquidònic

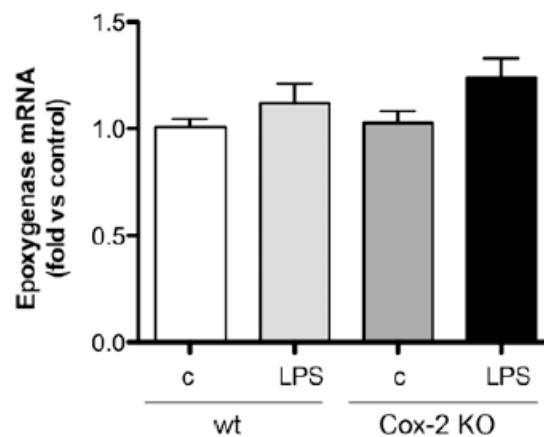
El metabolisme de l'àcid araquidònic és summent complex i, a més dels enzims COX, existeixen altres enzims que poden participar en aquest procés (Liu et al. 2010). L'enzim 5-lipoxigenasa (5-LOX) catalitza la formació de leucotriens (LT), i es creu que la inhibició de la 5-LOX que té efectes antiinflamatoris beneficiosos (Gaetano et al., 2003).

En els nostres cultius d'astròcits, es va observar que el LPS reduïa l'expressió gènica de 5-LOX (fig. 45A). També es van analitzar els nivells d'un dels metabòlits resultants de l'activitat de 5-LOX, el leucotriè LTC<sub>4</sub> (fig. 45B) en el medi de cultiu, però no es van observar canvis. No obstant, es va evidenciar que, comparats amb els WT, els astròcits de ratolins deficientes en COX-2 tenien una producció lleugerament superior de LTC<sub>4</sub> en condicions basals (fig. 45), que podria reflectir un canvi adaptatiu de les cèl·lules deficientes en COX-2 cap a vies alternatives pel metabolisme de l'AA.



**Figura R45. La via de les lipooxigenases no s'activa en resposta a el LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després del tractament amb el LPS. Els gràfics mostren la reducció de l'enzim de la 5-LOX en resposta a LPS, tant en astròcits WT com KO de COX-2. A més, no s'observa cap canvi en la formació de del metabòlit LTC<sub>4</sub>, conseqüència de l'activitat de l'enzim 5-LOX. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 4-6$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  i \* $P < 0.05$  respecte el control.

Un altre enzim important en el metabolisme de l'AA és l' epoxigenasa del citocrom P450 (CYP), que generen àcids epoxieicosatrienoics (EEG), que poden tenir efectes antiinflamatoris i vasodilatadors (Node et al, 1999; Spector et al, 2009). No obstant, tampoc en aquest cas es van observar canvis significatius en l'expressió gènica d'aquest enzim (fig. 46).



**Figura R46. La via de l' epoxigenasa no s'activa en resposta a el LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després del tractament amb el LPS. El gràfic mostra que l'expressió gènica de l'enzim Epoxigenasa no es veu afectada significativament en resposta a el LPS. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents, *n* = 4-6 per cada punt.

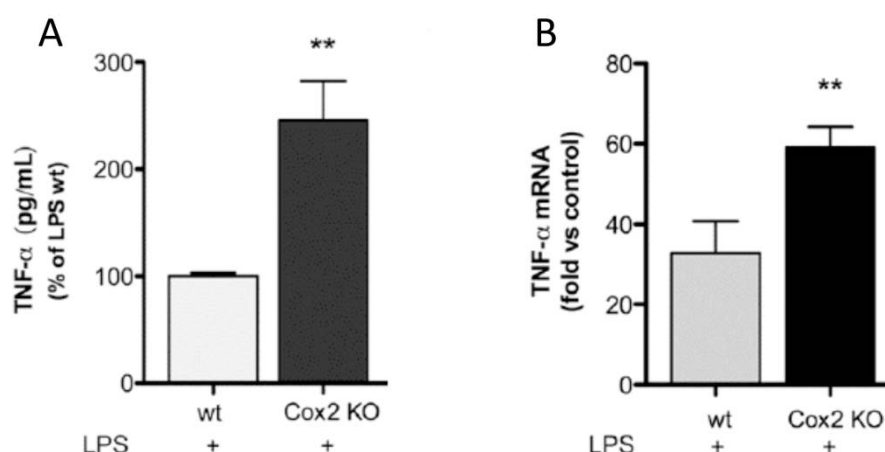
Aquests resultats suggerien que el metabolisme de l' AA en aquest sistema es donava a través de la via de les COX, més concretament per l'acció de la COX-2, corroborant resultats anteriors .



## Estudi del perfil proinflamatori induït pel LPS en cultius d' astròcits deficients en COX-2

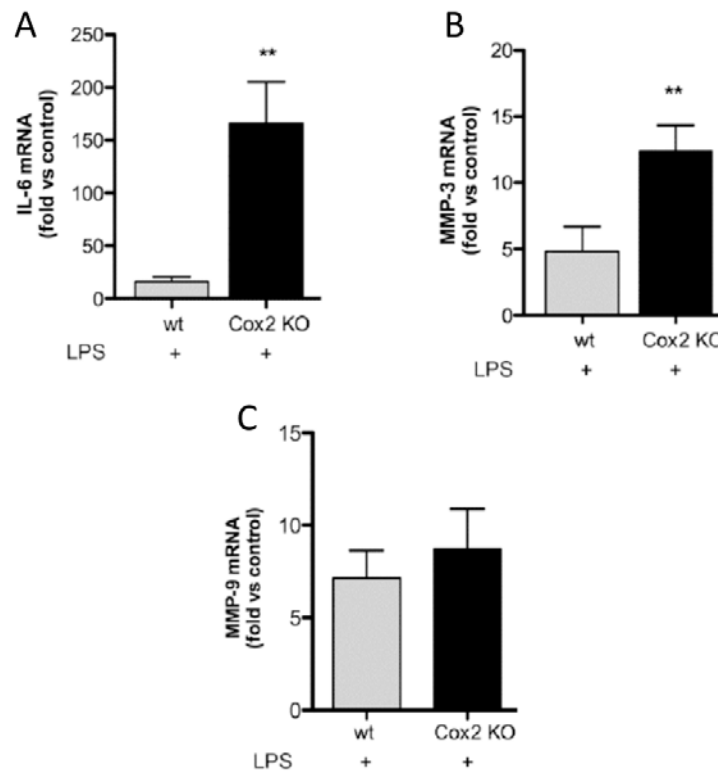
Diversos estudis demostren que la resposta inflamatòria que es genera després del tractament amb el LPS és més exagerada en animals deficients en COX-2 que en els corresponents WT, ja que l'expressió de mediadors proinflamatoris, així com de metal·loproteïnases de la matriu (MMP), està exacerbada (Aid et al, 2008, 2010; Choi et al, 2008, 2009, 2010). Segons aquestes dades, es va examinar l'expressió de diverses molècules inflamatòries 8 hores després de l'exposició al LPS, en cultius d'astròcits de ratolins deficients en COX-2.

En aquestes condicions, es va observar un augment en l'alliberació en el medi de cultiu de la citocina proinflamatòria TNF- $\alpha$  (fig. 47A), així com un augment en la seva expressió gènica (fig. 47B), en comparació amb els valors obtinguts en cultius d'astròcits WT.



**Figura R47. La producció de TNF- $\alpha$  es veu incrementada en resposta al LPS en astròcits deficients en COX-2.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després del tractament amb el LPS. Els gràfics mostren un una major inducció en l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  (B), així com un increment en la secreció de TNF- $\alpha$  al medi de cultiu en resposta a el LPS(A), en cultius d'astròcits KO per COX-2 Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  i \* $P < 0.05$  respecte el control; &&& $P < 0.001$ , && $P < 0.01$  i & $P < 0.05$  respecte el LPS.

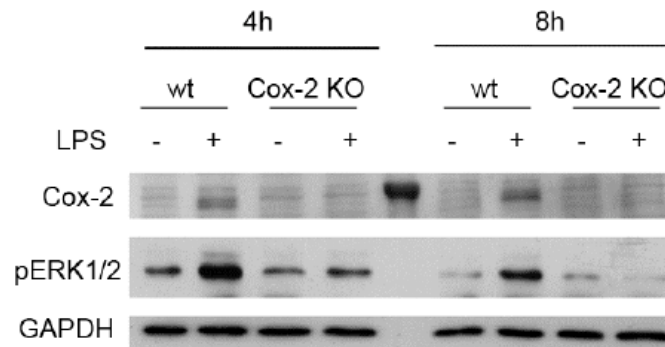
A més, el LPS va provocar un augment en l'expressió gènica de la citocina IL-6 (fig. 48A) i de MMP-3 (fig. 48B). No obstant, no es van observar canvis significatius en l'expressió de la MMP-9 (fig. 48C), en cultius deficients en COX-2, respecte als WT.



**Figura R48. Inducció de l'expressió de molècules proinflamatòries en astròcits deficients en COX-2 en resposta al LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després del tractament amb el LPS. Els gràfics mostren una major expressió gènica de l' IL-6 (A) i la MMP-3 (B) en resposta al LPS, en astròcits KO per COX-2. No obstant, l'expressió de MMP-9 (C) no mostra diferències significatives en resposta al LPS. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat: \*\* $P < 0.01$  respecte el control.

Tot i que l'expressió gènica de MMP-9 en astròcits està regulada per la via dependent de MyD88, tal i com s'ha vist en resultats anteriors (fig. 27), també depèn en gran mesura la MAPK ERK1/2 (fig. 21). En cultius d'astròcits WT per COX-2, ERK1/2 es veu fortament fosforilada a partir de 4 hores i fins a 8 hores després del tractament amb

LPS. No obstant, aquesta fosforilació no s'observa en astròcits deficients en COX-2 (fig. 49).



**Figura R49. El LPS indueix la fosforilació de ERK1/2 només en astròcits WT per COX-2.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). La imatge mostra l'anàlisi de l'expressió de la proteïna COX-2, i la fosforilació de la proteïna ERK1/2 per WB. La proteïna GAPDH es va utilitzar com a control de càrrega.

Això suggereix que la manca en la fosforilació de ERK1/2 podria modular negativament l'expressió de MMP-9 induïda per LPS, en astròcits deficients en COX-2.

---

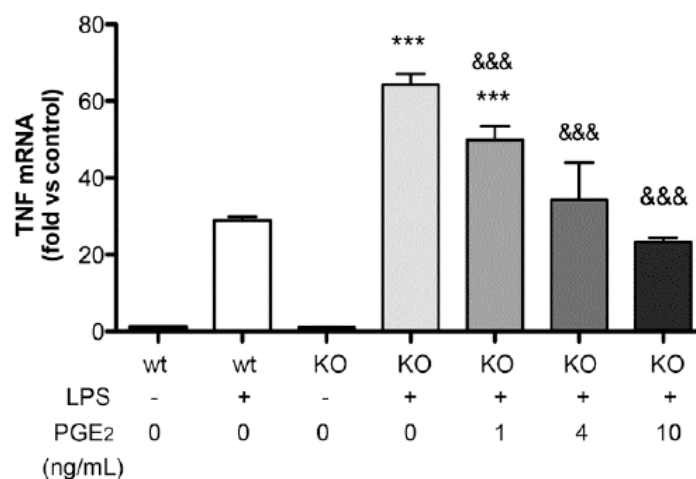
### **Efecte del tractament amb PGE2 en astròcits deficients en COX-2**

---

Tal com hem mostrat més amunt, els astròcits deficients en COX-2 presenten una resposta inflamatòria més exagerada en comparació amb els respectius WT. En base a aquests estudis, es va plantejar la hipòtesi de que algun dels productes resultants de l'activitat de la COX-2 fossin necessaris per a la regulació negativa de la resposta inflamatòria. Donat que en els nostres cultius d'astròcits s'observava una resposta inflamatòria major, amb l'increment en la producció de les molècules proinflamatòries TNF- $\alpha$ , IL-6 i MMP-3, en els cultius deficients en COX-2 en resposta al tractament amb el LPS; i donat també que la PGE<sub>2</sub> és el prostanoid majoritari que es generava com

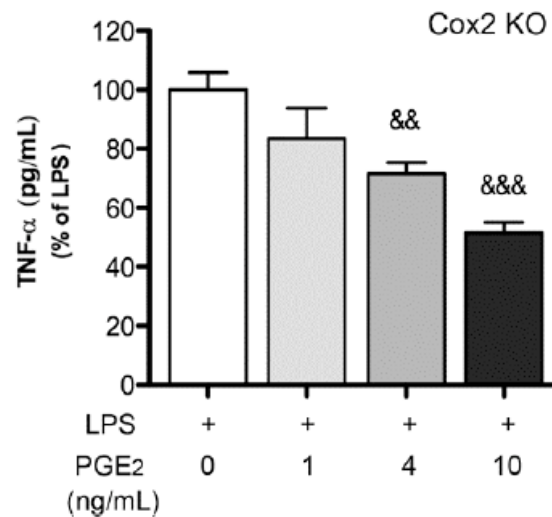
a resultat de l'acció de COX-2 en aquestes condicions, es va proposar a la PGE<sub>2</sub> com a un possible candidat. En primer lloc es va mesurar la concentració de PGE<sub>2</sub> present en el medi de cultiu d'astròcits WT per COX-2, 8 hores després del tractament amb el LPS, que va ser de  $3,12 \pm 0,79$  ng/ml, mentre que la seva concentració en el medi de cultiu d'astròcits KO per COX-2 va ser  $0.043 \pm 0.006$  ng /ml (mitjana  $\pm$  SD). Segons aquestes dades, els animals deficients en COX-2 mostraven efectivament una alliberació menor de PGE<sub>2</sub>, i es va plantejar la possibilitat de que la manca d'aquesta prostaglandina podia estar implicada en l'augment de la resposta inflamatòria observada en ratolins KO per COX-2.

Per explorar aquesta possibilitat, es van tractar cultius d'astròcits deficients en COX-2 amb PGE<sub>2</sub> exògena a diferents concentracions, 3 hores després de l'exposició a LPS, i es va mesurar si aquest tractaments afectava d'alguna manera la reacció inflamatòria a un temps de 8 hores. Les concentracions de PGE<sub>2</sub> que es van utilitzar van oscil·lar entre 1 i 10 ng/ml, i es va observar que les dosis de la PGE<sub>2</sub> exògena d'1, 4 i 10 ng /ml, reduïen significativament l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  en un 25, 50 i 65% respectivament (fig. 50). Aquests resultats semblen suggerir que la deficiència en la COX-2 impedia l'alliberació de la PGE<sub>2</sub> que regula de manera negativa l'expressió de TNF- $\alpha$ .



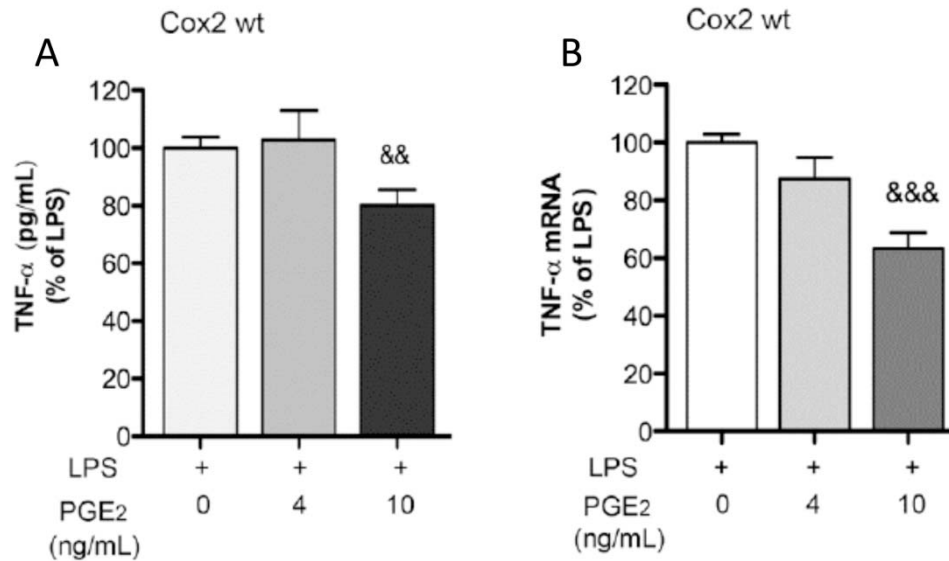
**Figura R50. El tractament amb PGE<sub>2</sub> exògena evita l'efecte proinflamatori de la deficiència de Cox-2.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml), i PGE<sub>2</sub> a diferents concentracions (1 a 10 ng/ ml) tres hores després de LPS. El gràfic mostra una disminució progressiva de l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  de manera dosi-dependenta, en funció de la concentració de PGE<sub>2</sub> exògena, en cultius KO per COX-2. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el control, i ### $P < 0.001$  respecte el LPS.

D'altra banda, el tractament amb PGE<sub>2</sub> després de LPS també redueix la concentració de TNF- $\alpha$  en el medi de cultiu de cèl·lules de COX-2 KO d'una manera dosi-dependent (fig. 51).



**Figura R51. El tractament amb PGE<sub>2</sub> exògena reverteix l'efecte proinflamatori de la COX-2.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després del tractament amb el LPS. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: &&& $P < 0.001$  i && $P < 0.01$  respecte el LPS.

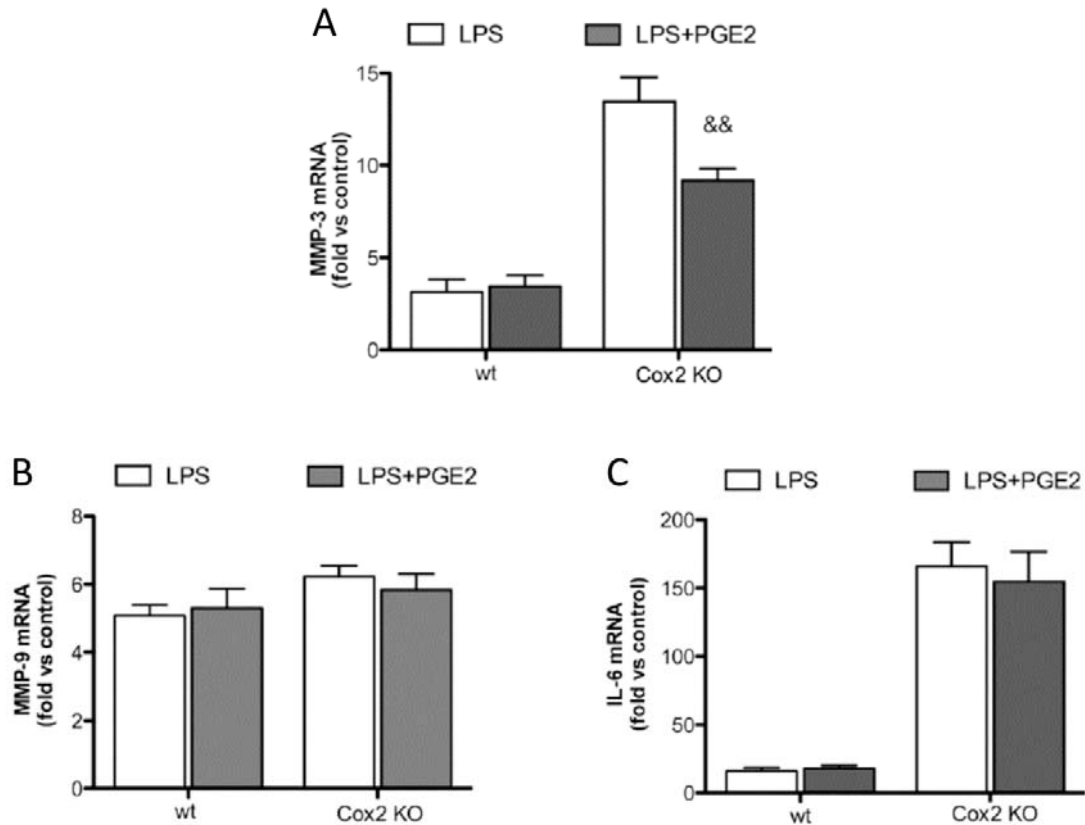
En les cèl·lules astrocitàries WT, la PGE<sub>2</sub> també redueix l'expressió de TNF- $\alpha$  en resposta a LPS, no obstant, els efectes observats són molt menors que en les cèl·lules KO de COX-2. Només la dosi de PGE<sub>2</sub> exògena de 10 ng/ ml va reduir significativament l'expressió de TNF- $\alpha$  en un 37% (fig. 52A). De la mateixa manera, la concentració de TNF- $\alpha$  en el medi de cultiu de cèl·lules WT, també es va veure reduïda en presència de PGE<sub>2</sub> a aquesta concentració (fig. 52B).



**Figura R52. El tractament amb PGE<sub>2</sub> exògena atenúa l'expressió de TNF després de LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT per COX-2 van ser tractats amb LPS (0, 4 ó 10 ng/ml). Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARNm dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h després del tractament amb el LPS. Els gràfics mostren com l'administració de la PGE<sub>2</sub> exògena a una concentració de 10ng/ml, atenúa la secreció i expressió gènica de TNF- $\alpha$  en cultius WT per COX-2. Els resultats calculats en pg/ml estan expressats com a % respecte la resposta al LPS. El gràfic mostra el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat: &&& $P < 0.001$  i && $P < 0.01$  respecte el LPS.

L'efecte comparativament més baix del tractament amb la PGE<sub>2</sub> exògena en cèl·lules WT per COX-2 que en les KO, es deu probablement al fet que les cèl·lules WT ja produeixen PGE<sub>2</sub> endògena en resposta a LPS, mentre que les cèl·lules KO per COX-2 no. Aquests resultats estan d'acord amb estudis que mostren que la PGE<sub>2</sub> atenúa la producció i alliberament de TNF- $\alpha$  en cèl·lules de la micròglia (Aloisi et al., 1999).

Tot i que s'havia observat un efecte significatiu de PGE<sub>2</sub> sobre el TNF- $\alpha$ , l'estudi del seu efecte sobre altres molècules proinflamatòries en l'estudi no va ser tant clar. Es va veure que la PGE<sub>2</sub> atenuava l'expressió gènica de MMP-3 en astròcits KO per COX-2, però en canvi, no es reduïa l'expressió de MMP-3 en les cèl·lules WT (fig. 53A). De la mateixa manera, la PGE<sub>2</sub> no va atenuar l'expressió de MMP-9 (fig. 53B) ni d' IL-6 (fig. 53C) després de LPS, ni en els cultius WT ni en els KO per COX-2.

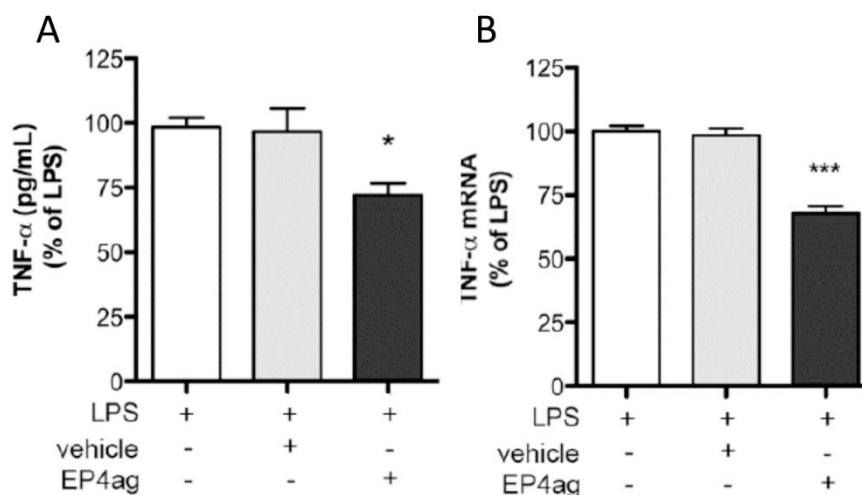


**Figura R53. El tractament amb PGE<sub>2</sub> exògena inhibeix només certes vies pro-inflamatòries després del LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins WT i KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ml), i s'hi va afegir o no PGE<sub>2</sub> exògena a una concentració de 10 ng/ml. Posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 8h després de LPS. Els gràfics mostren com la PGE<sub>2</sub> exògena redueix l'expressió gènica de la MMP-3 induïda pel LPS, en cèl·lules KO per COX-2. No obstant, no induïx cap canvi en l'expressió de MMP-9 o de IL-6. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Els símbols indiquen: &&  $P < 0.01$  respecte el LPS.

En conjunt, aquests resultats suggereixen que la PGE<sub>2</sub>, que es genera com a resultat de l'acció de COX-2, exerceix una regulació negativa fisiològica sobre la inducció de TNF- $\alpha$  en resposta al LPS. Això explicaria per què l'absència de PGE<sub>2</sub>, en cèl·lules deficientes en COX-2, exacerba la producció de TNF- $\alpha$ . No obstant, malgrat que la PGE<sub>2</sub> regula negativament el TNF- $\alpha$ , no ho fa per altres molècules mediadores de la inflamació, l'alliberació de les quals també es veu exacerbada en animals deficientes en COX-2 en resposta al tractament amb LPS. Han d'existir per tant, vies addicionals involucrades en la regulació negativa d'aquestes molècules pro-inflamatòries, que impliquin productes derivats de l'acció de l'enzim COX-2.

## L'agonista d' EP4 ONO-4819 mostra efectes similars a la PGE<sub>2</sub>

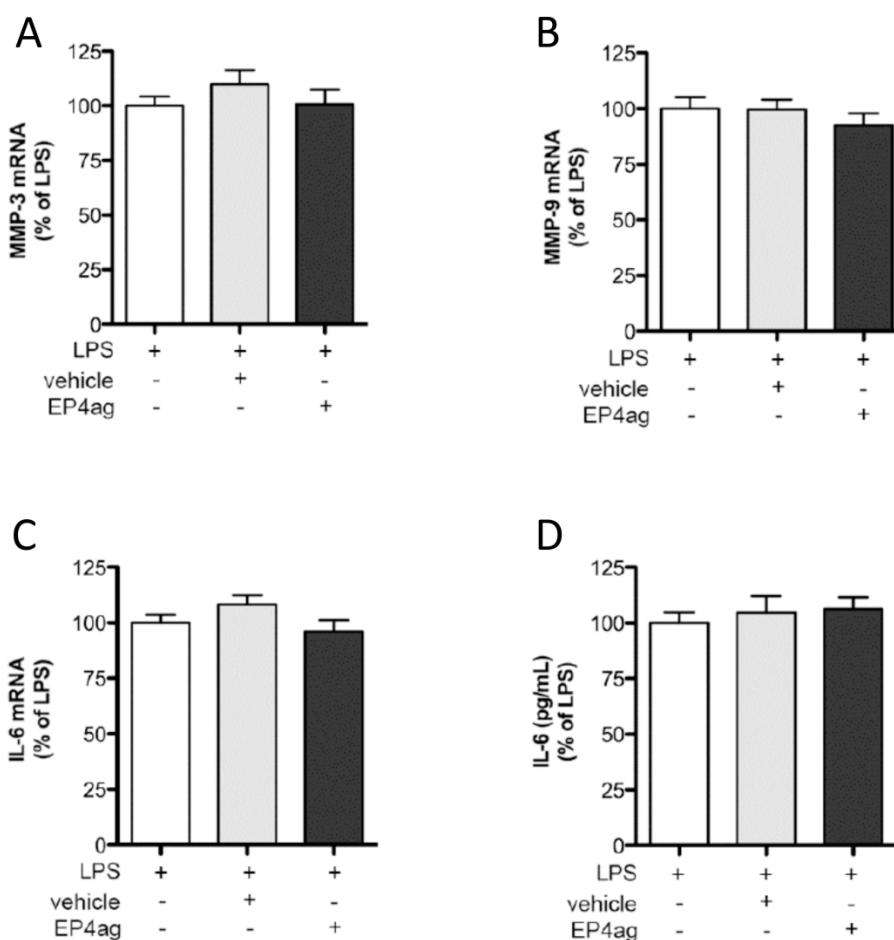
La PGE<sub>2</sub> pot unir-se a diversos receptors específics EP, i segons el receptor al que s'uneixi, pot desencadenar una resposta totalment diferent de la d'un altre receptor PGE<sub>2</sub>. Diversos estudis han posat de manifest que l'activació del receptor EP4 produeix efectes anti-inflamatoris (Shi et al. 2010). Per obtenir alguna evidència sobre si EP4 podria estar implicat en els efectes observats amb l'administració de la PGE<sub>2</sub> exògena, es van tractar cultius d'astròcits amb un agonista farmacològic del receptor EP4 ONO-4819 (100 nM), i es va observar una reducció aproximada del 30% en la concentració de TNF- $\alpha$  secretada (fig. 54A), així com en la seva expressió gènica (fig. 53B) després de LPS.



**Figura R54. L'agonista del receptor EP4, ONO-4819, redueix selectivament la inducció de TNF- $\alpha$  en resposta al LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml) i amb l'agonista d'EP4 ONO-4819 (100nM) 3 hores després del LPS. Posteriorment es va mesurar la concentració de TNF- $\alpha$  per mitjà d'assajos d'ELISA, 8 hores després del LPS, així com l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR. Els gràfics mostren una reducció del 30% tant en l'inducció de TNF- $\alpha$ , com en la seva secreció, en resposta al LPS en presència de l'agonista EP4. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 6$  per cada punt. Els símbols indiquen: \*\*\* $P < 0.001$  i \*\* $P < 0.05$  respecte el LPS.



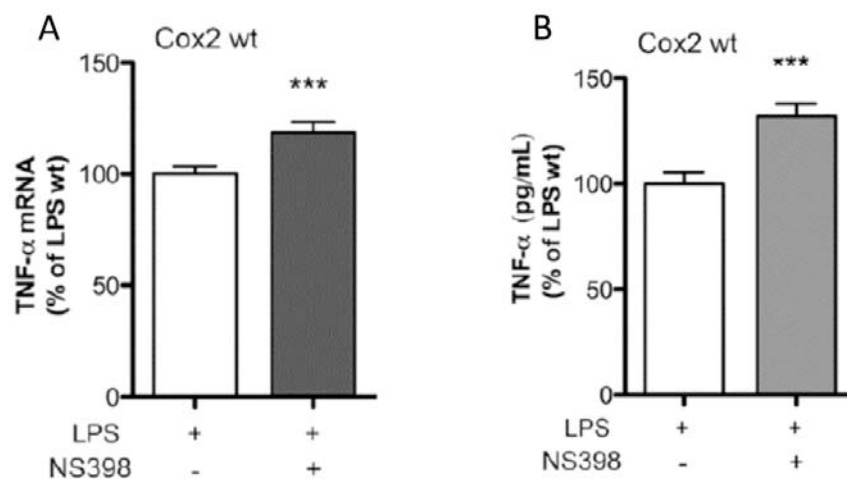
No obstant, l'agonista EP4 no va reduir l'expressió de MMP-3 (fig. 55A), MMP-9 (fig. 55B), o IL-6 (fig. 55D), ni tampoc va impedir la secreció de IL-6 al medi de cultiu (fig. 55C), tal i com s'havia observat amb l'administració de la PGE<sub>2</sub> exògena. Per tant, els efectes d'ONO-4819 en el perfil inflamatori induït per LPS van ser similars als de PGE<sub>2</sub>, el que suggereix que l'eix PGE<sub>2</sub>/EP4 està implicat en la regulació negativa de TNF- $\alpha$  mitjançada per la COX-2 després de LPS en els cultius d'astròcits.



**Figura R55. Estudi de l'efecte de l'agonista del receptor EP4 sobre l'alliberació d'altres molècules proinflamatòries.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ml) en presència o absència de l'agonista ONO-4819 (100nM) 3 hores després del LPS. Posteriorment es va mesurar la concentració de IL-6 (D) per mitjà d'assajos d'ELISA, 8 hores després del LPS, així com l'expressió de l'ARN missatger per RT-PCR de la IL-6 (C), i les metal·loproteïnases MMP3 (B) i MMP9 (B). Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 6$  per cada punt.

## Efecte de la inhibició de la COX-2

A continuació, es va examinar si la inhibició farmacològica de la COX-2 amb l'inhibidor NS-398, alterava el perfil de citocines proinflamatòries després del LPS, de forma similar al que s'observava en els cultius d'astròcits deficientes en la COX-2. Els experiments es van realitzar en cultius d'astròcits obtinguts a partir de ratolins WT per la COX-2. Es va realitzar un pretractament amb l'inhibidor NS-398 1 hora abans de l'exposició a LPS, i es va assajar l'expressió gènica de TNF- $\alpha$ , 8 hores després del tractament. Es va observar que l'inhibidor NS-398 augmentava significativament tant l'expressió gènica com la secreció de TNF- $\alpha$  en el medi de cultiu en resposta a LPS (fig. 56 A-B). No obstant, aquesta resposta era notablement menor en comparació amb l'efecte de la deficiència de la COX-2.

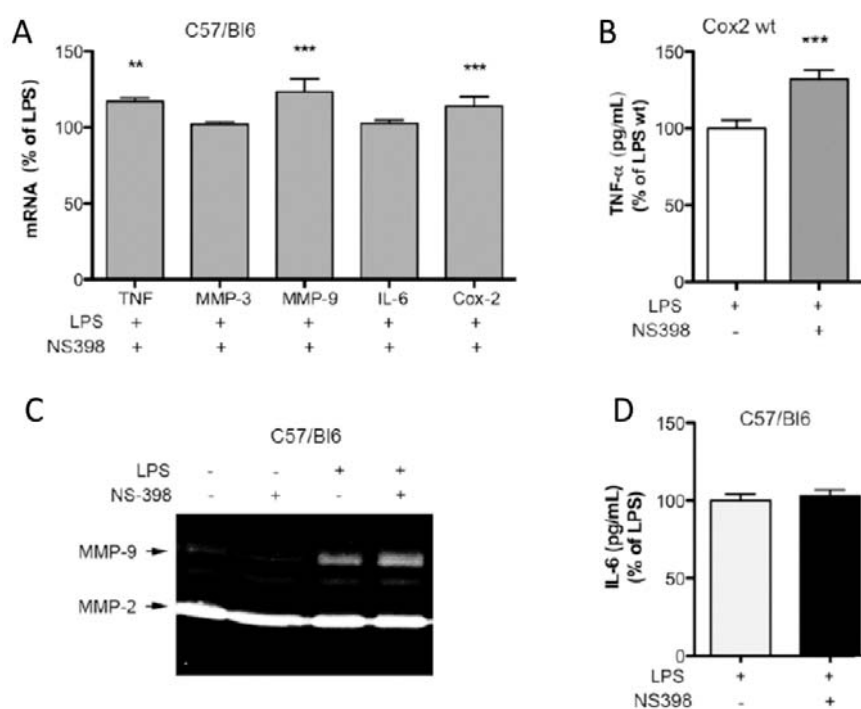


**Figura R56. La inhibició farmacològica de la COX-2 augmenta l'expressió i secreció de TNF- $\alpha$  en resposta al LPS.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolí WT per COX-2 van ser tractats amb NS-398 1 hora abans del tractament amb el LPS (10 ng/ml), i posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 4h. També es va mesurar la concentració de TNF- $\alpha$  per mitjà d'assajos d'ELISA, 8h després del LPS. Els gràfics mostren un augment de la expressió i secreció de TNF- $\alpha$  en el medi de cultiu en resposta al LPS, i que aquest efecte és més elevat quan s'inhibeix farmacològicament l'expressió de COX-2 en els cultius. El gràfic mostra el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el LPS.

Per validar aquests resultats en cèl·lules amb un fons genètic diferent, es va examinar l'efecte del NS-398 en astròcits obtinguts a partir de ratolins C57/BL6. En aquestes

cultius, es va observar que el pretractament amb el NS-398 induïa un augment molt petit de l'expressió i secreció de TNF- $\alpha$  en resposta al tractament amb LPS (fig. 57 A-B). A

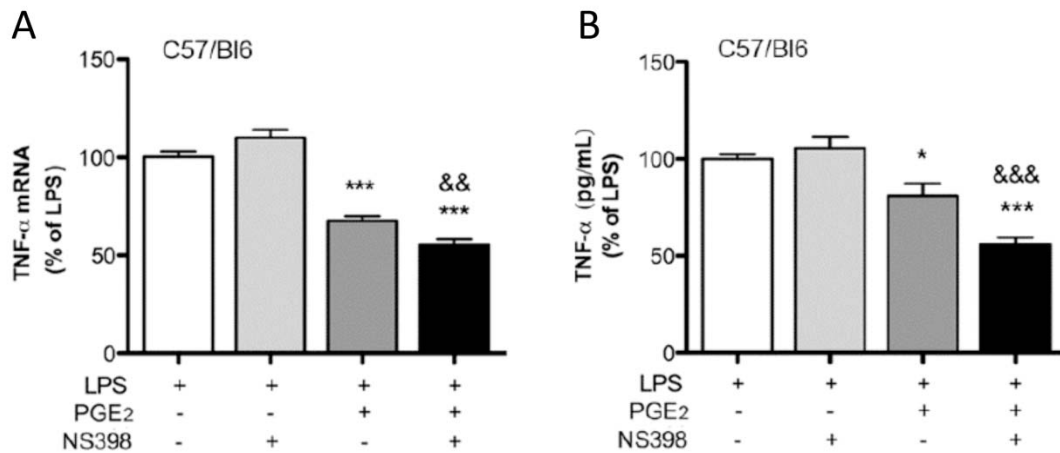
més de l'efecte sobre el TNF- $\alpha$ , el tractament amb l'inhibidor NS-398 també va produir un lleuger augment en l'expressió gènica de la COX-2 i de la MMP-9 (fig. 57A), a més d'una major activitat enzimàtica d'aquesta en la zimografia en gel (fig. 57C). No obstant això, el NS-398 no va modificar significativament l'expressió gènica de la MMP-3 ni de la IL-6 (fig. 55A), ni i tampoc la secreció de IL-6 (fig. 57D) en el medi de cultiu en resposta al LPS. Aquests resultats demostren que els efectes de NS-398 en el perfil inflamatori després que el LPS no eren idèntics als de la deficiència de la COX-2, tot i que ambdues condicions impedièn la generació de prostanoids després del LPS.



**Figura R57. La inhibició farmacològica de la COX-2 augmenta la resposta inflamatòria induïda pel LPS en cultius d'astròcits.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolí C57/Bl6 van ser tractats amb LPS (10 ng/ml), i posteriorment es va realitzar l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 8h després de LPS, així com mesurar la concentració de citocines per mitjà d'assajos d'ELISA, 8 hores després del LPS. Els gràfics mostren que la presència del NS-398 causa un lleuger augment de l'expressió de TNF- $\alpha$ , MMP-9 i COX-2. No obstant, l'expressió de la MMP-3 i de IL-6 no es veu modificada. També es va produir un augment en la secreció de TNF- $\alpha$  en el medi de cultiu, però no de IL-6. També s'observa un augment de l'activitat enzimàtica de la MMP-9 en resposta a el LPS, que es veu incrementada amb la presència de NS-398. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 8$  per cada punt, expressats com a percentatge del LPS. Els símbols indiquen \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  respecte el control.

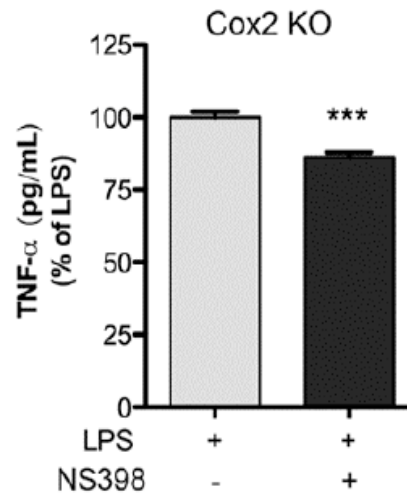
Un efecte interessant que es va observar en aquests experiments va ser que l'administració conjunta de l'inhibidor NS-398 i la PGE<sub>2</sub> exògena provocava una

reducció en l'expressió gènica i la secreció de TNF- $\alpha$  més pronunciada que la que s'observava únicament amb el tractament de la PGE<sub>2</sub> (fig. 58).



**Figura R58.** El NS-398 i la PGE<sub>2</sub> exògena actuen sinèrgicament reduint l'expressió de TNF- $\alpha$  en resposta al LPS. Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolí C57/Bl6 van ser tractats (o no) amb el NS-398 (3 $\mu$ M) 1 hora abans del tractament amb el LPS (10 ng/ml), i posteriorment amb (o sense) la PGE<sub>2</sub> exògena (10 ng/ml), que s'afegia al medi de cultiu 3 hores després del LPS. Després es va realitzar l'extracció de l'ARN missatger dels cultius per a fer mesures d'expressió gènica per RT-PCR, 8h després de LPS, i es mesurava la concentració de TNF per mitjà d'assajos d'ELISA, 8 hores després del LPS. Els gràfics mostren el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  i \* $P < 0.05$  respecte el control; &&& $P < 0.001$  i && $P < 0.01$  respecte el LPS.

Aquests resultats suggerien que el NS-398 podia tenir un paper inhibitori sobre la producció de TNF- $\alpha$  independent a la inhibició de COX-2, en resposta al LPS. Per a testar aquesta hipòtesi es van tractar cultius KO per COX-2 amb l'inhibidor NS-398 (3 $\mu$ M) 1 hora abans del tractament amb el LPS. Els resultats van mostrar que efectivament el NS-398 reduïa la secreció de TNF- $\alpha$  (fig. 59) en el medi de cultiu, donant suport a la idea que el NS-398 pot atenuar lleugerament la producció de TNF- $\alpha$  de manera independent de la inhibició de la COX-2.



**Figura R59. El NS-398 te efectes independents de la COX-2.** Cultius primaris d'astròcits corticals de ratolins KO per COX-2 van ser tractats amb LPS (10 ng/ ml), i posteriorment es va mesurar la concentració de prostanoids per mitjà d'assajos d'ELISA, 8 hores després del LPS. El gràfic mostra com el NS-398 redueix la secreció de TNF- $\alpha$  en el medi de cultiu, induïda pel LPS. El gràfic mostra el valor promig de diferents experiments independents,  $n = 3$  per cada punt. Hem considerat: \*\*\* $P < 0.001$  respecte el LPS.

# *Discussió*



---

## Discussió Treball 1

---

Les cèl·lules del sistema nerviós central (SNC) disposen de mecanismes de reconeixement que els permeten detectar i reconèixer agents infecciosos i iniciar una resposta immune per a fer front a una intrusió. Les respostes immunitàries en el SNC s'atribueixen principalment a les cèl·lules de la micròglia (Rivest, 2009), a causa de la capacitat que té aquest tipus cel·lular com a cèl·lula presentadora d'antigen. No obstant això, els astròcits expressen receptors tipus Toll-Like, responen als agonistes d'aquests receptors amb l'alliberació de molècules proinflamàtòries (Gorina et al, 2009; van Noort et al, 2009), i són capaços de modular la resposta immune innata (Dong i Benveniste, 2001; Farina et al, 2007). Els astròcits tenen una ubicació estratègica a la interfase entre els vasos sanguinis i el parènquima cerebral, ja que els seus peus astrocitaris envolten una extensa superfície dels capil·lars del cervell, participant així en la funció de la BHE (Zlokovic, 2008), en la regulació del flux sanguini cerebral, mitjançant l'alliberament de mediadors vasoactius (Gordon et. al, 2007), i expressant molècules implicades en la patogènesi d'algunes malalties autoimmunes que afecten la permeabilitat de la BHE (Lennon i altres, 2005;. Hinson et al , 2010). A més, els astròcits formen una intricada xarxa d'intercomunicació amb altres cèl·lules nervioses. La senyalització iniciada en els astròcits pot afectar la funció sinàptica cerebral, i tenir un gran impacte en la unitat neurovascular.

El LPS indueix la dimerització de TLR-4 i l'activació de molècules adaptadores que inicien diferents cascades de senyalització que promouen l'expressió de gens proinflamatoris. En monòcits s'ha observat que l'activació del receptor TLR-4 provoca per una banda, la inducció de la via dependent de MyD88, que activa ràpidament les MAPK i el factor nuclear NF $\kappa$ B; i d'altra banda la via TRAM/TRIF, que indueix l'activació del factor de transcripció IRF-3 i l'expressió de IFN- $\beta$  (Yamamoto et al, 2003;. Kawai i Akira, de 2007; Núñez-Miguel et al, 2007.). Aquestes efectes poden amplificar els estímuls extracel·lulars inicials i desencadenar respostes inflamatòries.

En aquest treball ens hem centrat en l'estudi dels primers esdeveniments que es donen a nivell molecular en resposta al tractament amb el LPS, amb l'objectiu d'identificar les molècules responsables de l'activació de la resposta inflamatòria en aquest tipus



cel·lular. Els resultats obtinguts evidencien l'activació del receptor TLR-4 en astròcits, que al seu torn activa una complexa xarxa de senyalització que comporta l'expressió i alliberament de molècules pro-inflamatòries, i posa de manifest la seva capacitat d'iniciar de forma efectiva una resposta immune innata.

El LPS promou una ràpida activació de la via dependent de MyD88, que es veu reflectida en l'activació del factor de transcripció NFκB, així com amb la inducció d'alguns gens diana com el TNF-α.

Més tardanament, a partir de 2 hores després de l'exposició al LPS, s'observa la fosforilació de STAT1 en el residu tirosina 701. En monòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques (Kaisha et al, 2001; Yamamoto et al, 2003; Núñez-Miguel et al, 2007) el LPS activa STAT1 a través de l'expressió de IFN-β, com a resposta a l'activació de la via de senyalització TRAM/TRIF/IRF-3 o via independent de MyD88. No obstant, en els nostres cultius d'astròcits no es va detectar la inducció de IFN-β després del tractament amb el LPS. La manca d'activació de la via TRAM/TRIF/IRF-3, també s'ha observat en altres tipus cel·lulars com ara en neutròfils (Tamassia et al., 2007), cèl·lules de l'endoteli vascular (Harari et al. 2006), i també en astròcits (Krasowska-Zoladek et al., 2007). Aquests estudis, juntament amb les dades obtingudes en aquest treball, confirmen que el tipus de resposta induïda per l'activació de TLR-4 és específica del tipus cel·lular on s'activa aquest receptor. Els nostres resultats estan d'acord amb la idea de que la via TRAM/TRIF, independent de MyD88, no s'activa en les cèl·lules astròcitàries (Farina et al., 2007; Cauwells et al., 1999; Willis and Nisen, 1996; Ulevitch i Tobias, 1995). No obstant, els resultats obtinguts proposen la participació d'una via diferent de la via dependent de MyD88 i de la via TRAM/TRIF, que igualment porta a l'activació de STAT1. Així doncs, la fosforilació i activació del factor de transcripció STAT1 que observem en els nostres cultius és probablement el resultat de l'activació d'una via de senyalització secundària en resposta a l'activació del receptor TLR-4. En el nostre sistema, la fosforilació de STAT1 està mediada per la proteïna cinasa JAK1, i aquesta fosforilació comporta l'activació de STAT1 i la inducció de l'expressió de gens diana com SOCS-1, que impedeix la fosforilació de Stat1 i per tant regula negativament l'expressió de citocines, i també de STAT1 (Larsen i Röpke, 2002); i de quimiocines com IP-10, que és un quimioattractant per a limfòcits T activats, monòcits i cèl·lules NK (Farber, 1997).

La via de les MAPK també s'activa en astròcits corticals en resposta a LPS, hem detectat la fosforilació de diferents proteïnes MAPK com la p38, la JNK i l'ERK1/2. L'activació de les MAPKs també s'ha descrit en altres tipus cel·lulars com ara en monòcits (Guha i Mackman, 2001). Hem comprovat que els membres de la via de les MAPK poden influir en l'activació de STAT1, ja que la inhibició de p38 o JNK, impedeixen la seva fosforilació, i per tant, l'activitat transcripcional de STAT1. Per contra, ERK1/2 no intervé en l'activació de STAT1, però sí que regula l'expressió de diversos gens implicats en la resposta inflamatòria cel·lular, com EGR-1 i MMP-9.

EGR-1 és un factor de transcripció que participa en diversos processos patològics (Khachigian, 2006), regulant l'expressió de gens que codifiquen per diversos factors de transcripció, factors de creixement, citocines i proteïnes de la matriu (Fu et al., 2003), a més d'altres funcions. MMP-9 és una metal·loproteïnasa de la matriu que pot causar danys en la BHE, i pot facilitar el reclutament de leucòcits en el SNC en diverses malalties, com és el cas de l'esclerosi múltiple (Sellebjerg i Sorensen, 2003) i els accidents cerebrovasculars (Yang et al, 2007;. Planas et al, 2001).

La inducció de la MMP-9 després del LPS està mediada per ERK1/2 en cèl·lules de cardiomioblastoma H9c2 (Cheng et al., 2009). Els nostres resultats mostren que la inducció de MMP-9 per LPS depèn de la via dependent de MyD88 i de ERK1/2, que la regula positivament. Per contra, hem observat que els animals KO per STAT1 tenen augmentada l'expressió de MMP-9 en resposta a LPS, cosa que suggereix que STAT1 podria exercir un control negatiu sobre l'expressió de MMP-9, i que estaria d'acord amb un estudi recent realitzat en cèl·lules B-CLL (Ugarte-Berzal et al. 2010).

La proteïna p38 intervé en la regulació de l'expressió de tots els gens que hem examinat en aquest estudi, en resposta al LPS. Al seu torn, la p38 és necessària per a l'expressió de gens sota control de NFκB (Carter et al., 1999), ja que p38 controla l'activitat transcripcional de NFκB en astròcits humans mitjançant l'acetilació de la subunitat p65 (Saha et al., 2007).

Per tant, mentre que la fosforilació de p38 és un esdeveniment ràpid amb una gran capacitat reguladora de l'expressió gènica en resposta a LPS, l'activació d'ERK1/2 i JNK és una mica més tardana i cada via de las MAPK sembla estar implicada en l'activació de diferents cascades de senyalització.

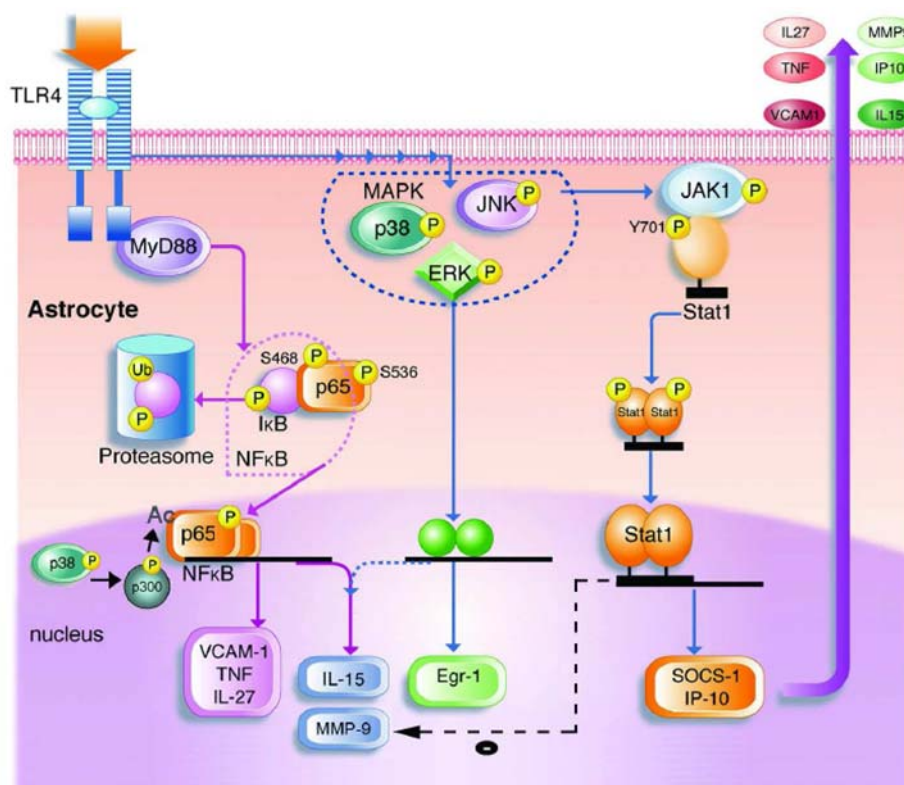
Els canvis en l'expressió gènica induïda per l'activació del receptor TLR4 en astròcits produiran l'alliberament de molècules proinflamàtòries al medi. Hem detectat la inducció de l'expressió de molècules capaces d'induir reactivitat microglial, com el TNF $\alpha$  i la IL-15 (a Gómez-Nicola i altres, 2010; Syed et al, 2007); dany en la BHE, com la MMP-9 (Yang et al, 2007), TNF $\alpha$  (Worrall et al, 1997) i IL-15 (Pa et al, 2009); molècules quimioattractants de cèl·lules leucocitàries, com la IP-10 (Farber, 1997) i la IL-15 (Wilkinson i Liew, de 1995; Badolato et al, 1995); i molècules implicades en l'adhesió i la infiltració de leucòcits, com VCAM-1 (Norman et al, 2008).

La quimiocina IP-10 juga un paper important en el reclutament de cèl·lules CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> en el teixit cerebral (Dufour et al., 2002). La sobreexpressió de determinades citocines proinflamàtòries com la IL-15 i la IL-27, poden influenciar la resposta de les cèl·lules infiltrants. La IL-15 està implicada en la supervivència i proliferació de limfòcits T CD8<sup>+</sup> (Sandau et al., 2003), i s'ha vist que poden jugar un paper dual en la funció de cèl·lules T reguladores (Treg), (Xia et al., 2010; Ben Ahmed et al., 2009; Ben Ahmed et al, 2009). La citocina IL-27, influeix en la regulació de reaccions inflamàtòries en els teixits, actuant sobre cèl·lules CD4<sup>+</sup> i inhibint la generació de cèl·lules T helper (Th1), (Murugaiyan et al., 2009). Per tant, és plausible pensar que l'augment en la secreció de la citocina IL-27 per part dels astròcits, i a través de l'activació del receptor TLR-4, dificulti el desenvolupament de respostes autoimmunes Th1 en el teixit circumdant, d'acord amb d'altres estudis que han mostrat com ratolins deficientes en TLR-4 són més propensos a desenvolupar determinades reaccions autoimmunes (Marta et al, 2008; Marta, 2009).

En conjunt, els resultats suggereixen que l'activació de TLR-4 indueix en els astròcits senyalització a través de NF $\kappa$ B, les vies MAPK i Jak1/Stat1, que al seu torn regulen l'expressió d'una àmplia gamma de molècules proinflamàtòries. Malgrat que el LPS no sembla induir IFN- $\beta$  en els astròcits, sí que promou l'activació Jak1/Stat1 de manera MyD88 independent, i hem trobat proves que Stat1 poden regular negativament l'expressió de gens que s'indueixen a través de la via MyD88. Aquests resultats mostren l'activació d'una complexa xarxa de senyalització iniciada per l'activació del receptor TLR-4 en astròcits. Les cèl·lules astroglials són sensibles a la immunitat innata, desencadenant una resposta específica del tipus cel·lular i generant un ambient proinflamatori que podria afectar la resposta o viabilitat de les cèl·lules circumdants. Per tant, l'activació de TLR-4 en astròcits podria contribuir al dany secundari postisquèmic

produint alteracions en el BHE, facilitant una resposta inflamatòria, amb l'atracció de limfòcits T en el territori afectat, i modular així la resposta immune.

Els resultats d'aquest estudi es resumeixen de manera esquemàtica a la Figura R D1, on estan representades la transducció de senyals i l'expressió gènica durant les primeres hores després de l'exposició de les cèl·lules astrocitàries al LPS.



**Figura R D1.** Cascades de senyalització activades pel receptor TLR-4 en cultius d'astrocits corticals.

---

## Discussió Treball 2

---

Determinades situacions patològiques en el cervell així com estímuls inflamatoris provoquen un augment en l'expressió de la COX-2. En el context de la isquèmia cerebral, l'augment en l'expressió de la COX-2 està relacionada amb efectes perjudicials. Diversos estudis han demostrat que la deficiència de la COX-2 en diferents models d'isquèmia cerebral, proporcionava protecció enfront al dany isquèmic i a la mort neuronal (Nagayama et al., 1999; Iadecola et al., 2001; Candelario-Jalil et al., 2007; Candelario-Jalil i Fiebich, 2008). No obstant, animals deficients en la COX-2, en els que se'ls indueix una reacció inflamatòria mitjançant l'administració de LPS, presenten una resposta inflamatòria exacerbada, en la que s'observa un augment en la infiltració leucocitària i un major dany de la BHE. A més, i per contra del que es pensava, també s'ha observat que aquests mateixos efectes es veien atenuats en els ratolins deficients en la COX-1 (Aid et al. 2008, 2010; Choi et al, 2008, 2009, 2010). D'acord amb això, i amb el fet que la resposta inflamatòria que es dona després d'un episodi isquèmic és essencial per la progressió de la lesió, és important aclarir el paper que té la inhibició de la COX-2 en la resposta inflamatòria postisquèmica.

El LPS augmenta l'expressió de la COX-2 en astròcits, tal i com s'ha observat també en altres tipus cel·lulars. Hem comprovat mitjançant tècniques immunohistoquímiques, que l'expressió de la COX-2 en cèl·lules astrocitàries després de l'administració del LPS *in vivo*, així com la seva expressió gènica tant *in vivo* com *in vitro*.

Hem demostrat que l'expressió gènica de la COX-2 està mediada per la via dependent de MyD88 i per NFkB, ja que hem demostrat que la manca o inhibició d'aquestes dues proteïnes impedeix l'expressió de COX-2. A més, el tractament amb el LPS també provoca un augment en la producció i alliberació de prostanoïds, que és en gran part, dependent de l'expressió de la COX-2. Així, la inhibició farmacològica de COX-2, o la manca de la proteïna en cultius d' astròcits deficients, evita totalment la producció i alliberació de determinats prostanoïds en el medi de cultiu.

Malgrat l'expressió de la COX-2 és dependent de la via MyD88, les vies de senyalització de les MAPKs i la via JAK1/STAT1, que hem vist activades en resposta a l'estimulació del receptor TLR-4, també influencien la seva expressió. Així hem

demostrat que l'activació de les MAPK p38, JNK i ERK1/2 indueixen també l'expressió de la COX-2, i que la manca de la proteïna STAT-1 atenua l'expressió gènica de COX-2 en resposta al LPS.

La inducció de la COX-2 està acompanyada per una forta producció de PGE<sub>2</sub>, i en menor mesura, d'altres prostanoïds com la PGF1 $\alpha$  i el TXA<sub>2</sub>. Existeixen diversos estudis que suggereixen que la inducció d'una determinada isoforma de COX pot estar directament relacionada amb la inducció d'enzims "isomerases de prostaglandina" específics, que afavoririen l'expressió d'un determinat prostanoïd en funció del tipus cel·lular (Ueno et al., 2001). Nosaltres hem observat que l'elevada producció de PGE<sub>2</sub> observada després del LPS està en concordança amb una major expressió de l'enzim mPGES-1, per tant, el LPS indueix l'expressió simultània de la COX-2 i la mPGES-1, que semblen estar funcionalment acoblats, donant lloc a elevats nivells de PGE<sub>2</sub> en els nostres cultius d'astròcits. Aquests resultats estarien d'acord amb resultats anteriors en els astròcits exposats al LPS (Johann et al., 2008).

Per contra, el LPS actua disminuint l'expressió de COX-1, i els animals deficients en COX-1 segueixen produint prostanoïds en resposta al LPS. L'expressió de l'ARNm de la COX-1, així com de les sintases de prostaglandina PGIS i TXAS, es van veure reduïdes després de LPS, cosa que podria suggerir una relació en la regulació de l'expressió d'aquests gens.

En comparació amb les cèl·lules WT, els astròcits deficients en la proteïna COX-2 van mostrar una resposta inflamatòria exacerbada després del tractament amb el LPS, evidenciat per l'augment de la inducció d'ARNm de TNF- $\alpha$ , MMP-3, i d'IL-6, així com l'augment de la secreció de TNF- $\alpha$  i IL-6 al medi de cultiu. Aquests resultats concorden amb les estudis anteriors que mostraven una resposta inflamatòria major en ratolins deficients en la COX-2 després de l'administració del LPS (Aid et al, 2008, 2010; Choi et al, 2008, 2009, 2010).

Aquests resultats ens van portar a proposar que els productes de la COX-2 podrien exercir una regulació negativa sobre algunes de les vies proinflamatòries iniciades per l'activació de TLR-4. Segons aquesta hipòtesi, els astròcits deficients en COX-2 tindrien atenuats els mecanismes naturals que retroalimenten negativament la reacció inflamatòria desencadenada pel LPS. En aquest sentit, els nostres resultats identifiquen la PGE<sub>2</sub>, com a una molècula reguladora del TNF- $\alpha$  induït en resposta a LPS.

Efectivament, la PGE<sub>2</sub> no es detecta en les cèl·lules COX-2 KO tractades amb LPS, que a l'hora produeixen més TNF- $\alpha$  que les corresponents cèl·lules WT en resposta al LPS. Si s'afegeix PGE<sub>2</sub> al medi de cultiu dels astròcits deficients en COX-2 després del tractament amb LPS, l'expressió de TNF- $\alpha$  disminueix de manera dosi-dependent i arriba als mateixos nivells que en les cèl·lules WT. Tant mateix, la PGE<sub>2</sub> també atenua la producció de TNF- $\alpha$  en les cèl·lules WT però l'efecte és menor que en les KO, i es necessiten dosis més grans. Això està d'acord amb que la PGE<sub>2</sub> que es produeix d'una manera natural en resposta al LPS, regula negativament la producció de TNF- $\alpha$  i posa fre a la resposta inflamatòria inicial. Al carèixer d'aquest mecanisme, les cèl·lules COX-2 KO tenen una resposta inflamatòria exacerbada.

El possible paper dual de la PGE<sub>2</sub> està documentat en diversos estudis, on també s'ha observat la disminució en la producció i alliberament de TNF- $\alpha$  en cèl·lules de micròglia (Aloisi et al., 1999). Es pensa que el fet que la PGE<sub>2</sub> jugui un paper antiinflamatori o proinflamatori depèn del tipus de receptor sobre el qual actua. Existeixen almenys quatre receptors (EP1, EP2 EP3 i EP4) que tenen diferents funcions biològiques en els teixits (Sugimoto i Narumiya, 2007). S'ha observat que la PGE<sub>2</sub> exerceix efectes antiinflamatoris en resposta al LPS en cèl·lules de la micròglia, actuant a través de EP4 (Shi et al. 2010). Per contra, el receptor EP1 contribueix al dany excitotòxic (Ahmad et al., 2006), i la seva inhibició s'ha demostrat que té efectes neuroprotectors (Abe et al., 2009). Nosaltres hem observat que el tractament dels cultius d'astròcits amb PGE<sub>2</sub> exògena provoca una disminució en l'alliberació de TNF- $\alpha$ , i que el tractament amb un agonista del receptor de la PGE<sub>2</sub>, EP4, té efectes similars. Aquests resultats suggereixen que l'efecte antiinflamatori de la PGE<sub>2</sub> observada en els nostres cultius, pot ser deguda a l'activació autocrina de receptors antiinflamatoris de la PGE<sub>2</sub>, com els receptors EP4.

En aquest treball també hem observat que l'inhibidor selectiu de la COX-2, NS398, podria tenir efectes independents de COX-2. Efectivament, hem observat que el NS-398 redueix també l'expressió de TNF- $\alpha$  induïda pel LPS, en cèl·lules deficients en la COX-2, sobre les que en teoria no hauria de tenir cap efecte. A més, NS-398 potencia la reducció de TNF- $\alpha$  induïda per la PGE<sub>2</sub> després del tractament amb el LPS. També hem pogut observar que el NS-398 atenua lleugerament l'activitat transcripcional de NF $\kappa$ B, d'acord amb un estudi anterior (Callejas et al., 2003).

Els efectes antiinflamatoris observats amb el tractaments amb l'inhibidor NS-398 podria ser resultat de diverses accions d'aquest compost. Per exemple, la inhibició de la COX-2 podria provocar que el metabolisme de l'àcid araquidònic es derivés cap a vies alternatives, generadores també de molècules antiinflamatòries. En aquest sentit, s'ha observat que diversos inhibidors de la COX-2 augmenten alguns metabòlits de l'epoxigenasa (Schmelz et al., 2006), i que aquests EETs tenen propietats antiinflamatòries (Node et al., 1999). D'altra banda, el NS-398 retarda la degradació de la proteïna COX-2 però no se sap si això podria tenir cap efecte antiinflamatori (Mbonye i Song, 2009). Finalment, diverses evidències experimentals suggereixen que els inhibidors de la COX-2 activen receptors activitats per peroxisoma  $\gamma$  (PPAR) (López-Parra et al, 2005; Planagumà et al, 2005), que té accions antiinflamatòries (Bernardo et al, 2000; Kumari et al, 2010; Pereira et al, 2006.).

En conjunt, els resultats actuals demostren el paper clau de la COX-2 en la producció de prostanoids després de LPS i l'evidència que la manca de l'enzim COX-2 exacerba l'expressió de diversos mediadors inflamatoris. Aquest efecte es deu, almenys en part, a la manca de mecanismes naturals de regulació negativa induïts per la PGE<sub>2</sub>. Els mecanismes de retroalimentació d'aquest tipus podrien estar implicats en la resolució natural del procés inflamatori.



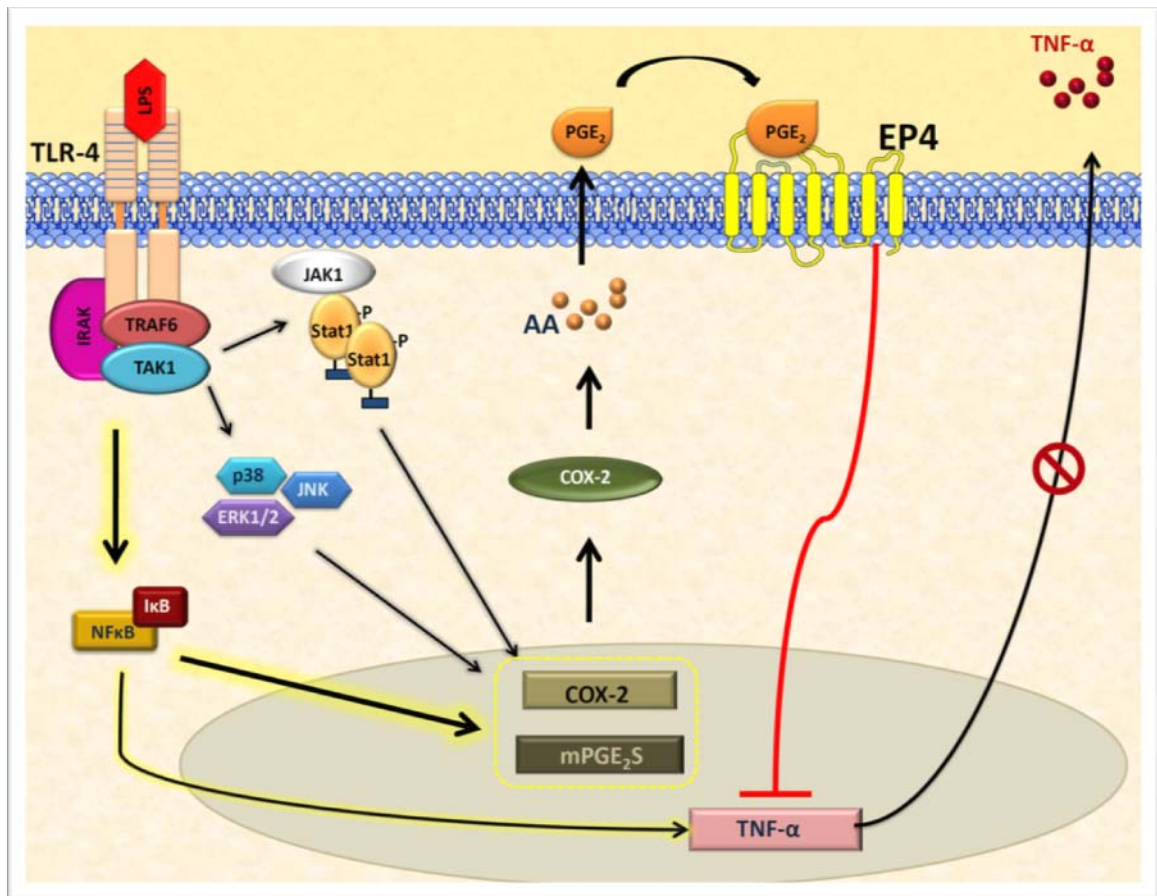


Figura R D2. Efecte de l'activació del receptor TLR-4 en l'expressió i activitat de la COX-2 en cultius d'astròcits corticals.

## *Conclusions*



Les conclusions del treball de tesi doctoral són les següents:

1. En cultius d'astròcits corticals el LPS activa la via dependent de la proteïna adaptadora MyD88 a través de l'activació del receptor TLR-4, però no sembla activar la via dependent de les proteïnes adaptadores TRAM/TRIF, o via independent de MyD88.
2. La via JAK1/STAT1 s'activa en resposta a l'estimulació amb el LPS de forma independent de IFN- $\beta$ , i per tant en els astròcits sembla independent de la via TRAM/TRIF.
3. L'activació primerenca de la via de les MAPKs s'activa en resposta a l'estimulació amb el LPS de forma independent de MyD88.
4. L'activació del receptor TLR-4 indueix la producció de diverses molècules proinflamàtores en l'astròcit, generant un ambient proinflamatori.
5. L'activació del receptor TLR-4 indueix la producció de la COX-2, així com la producció i alliberació dels prostanoids PGE<sub>2</sub>, PG i TxA<sub>2</sub>.
6. La producció de prostanoids en astròcits activats per LPS depèn principalment de l'activitat de la COX-2.
7. El tractament amb el LPS indueix l'expressió de la mPGES-1, que actua de forma conjunta amb la COX-2 induint l'expressió i alliberació de nivells elevats de PGE<sub>2</sub>.
8. La PGE<sub>2</sub> atenua l'expressió i alliberació de TNF- $\alpha$  en l'astròcit, probablement a través de la interacció del receptor antiinflamatori EP4, i d'aquesta manera exerceix una retroalimentació negativa sobre alguns mediadors inflamatoris induïts per LPS.



# *Bibliografia*



# A

---

**Abbott**, N. J., L. Ronnback, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." *Nature reviews. Neuroscience* 7(1): 41-53.

**Abe**, T., A. Kunz, et al. (2009). "The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29(1): 66-72.

**Abumiya**, T., J. Lucero, et al. (1999). "Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha(v)beta3 during focal cerebral ischemia." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19(9): 1038-1050.

**Ahmad**, A. S., S. Saleem, et al. (2006). "Prostaglandin EP1 receptor contributes to excitotoxicity and focal ischemic brain damage." *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 89(1): 265-270.

**Aid**, S., R. Langenbach, et al. (2008). "Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2." *Journal of neuroinflammation* 5: 17.

**Aid**, S., A. C. Silva, et al. (2010). "Cyclooxygenase-1 and -2 differentially modulate lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption through matrix metalloproteinase activity." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30(2): 370-380.

**Akira**, S. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." *Advances in immunology* 78: 1-56.

**Akira**, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." *Nature immunology* 2(8): 675-680.

**Akira**, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* 124(4): 783-801.



**Alarcon, R., C. Fuenzalida, et al. (2005).** "Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid." *The Journal of biological chemistry* 280(34): 30406-30415.

**Aloisi, F., R. De Simone, et al. (1999).** "Opposite effects of interferon-gamma and prostaglandin E2 on tumor necrosis factor and interleukin-10 production in microglia: a regulatory loop controlling microglia pro- and anti-inflammatory activities." *Journal of neuroscience research* 56(6): 571-580.

**Aloisi, F., F. Ria, et al. (2000).** "Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes." *Immunology today* 21(3): 141-147.

**Anderson, C. M. and M. Nedergaard (2003).** "Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation." *Trends in neurosciences* 26(7): 340-344; author reply 344-345.

**Anderson, R. E., A. Winnerkvist, et al. (2003).** "Biochemical markers of cerebrospinal ischemia after repair of aneurysms of the descending and thoracoabdominal aorta." *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 17(5): 598-603.

**Araki, E., C. Forster, et al. (2001).** "Cyclooxygenase-2 inhibitor ns-398 protects neuronal cultures from lipopolysaccharide-induced neurotoxicity." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32(10): 2370-2375.

**Arumugam, T. V., D. N. Granger, et al. (2005).** "Stroke and T-cells." *Neuromolecular medicine* 7(3): 229-242.

**Arumugam, T. V., E. Okun, et al. (2009).** "Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury." *Shock* 32(1): 4-16.

**Arumugam, T. V., S. C. Tang, et al. (2007).** "Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(35): 14104-14109.

**Asahi, M., M. Hoshimaru, et al. (1997).** "Expression of interleukin-1 beta converting enzyme gene family and bcl-2 gene family in the rat brain following permanent occlusion of the middle cerebral artery." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17(1): 11-18.

**Asea, A.** (2008). "Heat shock proteins and toll-like receptors." *Handbook of experimental pharmacology*(183): 111-127.

**Asea, A., M. Rehli, et al.** (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." *The Journal of biological chemistry* 277(17): 15028-15034.

## B

---

**Bajetto, A., R. Bonavia, et al.** (2001). "Chemokines and their receptors in the central nervous system." *Frontiers in neuroendocrinology* 22(3): 147-184.

**Belayev, L., R. Busto, et al.** (1996). "Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats." *Brain research* 739(1-2): 88-96.

**Bendani, M. K., O. Palluy, et al.** (1995). "Localization of 12-lipoxygenase mRNA in cultured oligodendrocytes and astrocytes by in situ reverse transcriptase and polymerase chain reaction." *Neuroscience letters* 189(3): 159-162.

**Benveniste, E. N., V. T. Nguyen, et al.** (2001). "Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease." *Neurochemistry international* 39(5-6): 381-391.

**Bezzi, P., G. Carmignoto, et al.** (1998). "Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes." *Nature* 391(6664): 281-285.

**Biragyn, A., P. A. Ruffini, et al.** (2002). "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2." *Science* 298(5595): 1025-1029.

**Blann, A., P. Kumar, et al.** (1999). "Soluble intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke." *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 10(5): 277-284.

**Block, M. L. and J. S. Hong** (2005). "Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism." *Progress in neurobiology* 76(2): 77-98.

**Bowman**, C. C., A. Rasley, et al. (2003). "Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products." *Glia* 43(3): 281-291.

**Brouns**, R., R. Sheorajpanday, et al. (2008). "Evaluation of lactate as a marker of metabolic stress and cause of secondary damage in acute ischemic stroke or TIA." *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 397(1-2): 27-31.

**Brunn**, G. J. and J. L. Platt (2006). "The etiology of sepsis: turned inside out." *Trends in molecular medicine* 12(1): 10-16.

**Bsibsi**, M., R. Ravid, et al. (2002). "Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system." *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61(11): 1013-1021.

## C

---

**Candelario-Jalil**, E. and B. L. Fiebich (2008). "Cyclooxygenase inhibition in ischemic brain injury." *Current pharmaceutical design* 14(14): 1401-1418.

**Candelario-Jalil**, E., A. Gonzalez-Falcon, et al. (2007). "Post-ischaemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood-brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischaemia in rats." *Journal of neurochemistry* 100(4): 1108-1120.

**Cao**, G., M. Xiao, et al. (2004). "Cloning of a novel Apaf-1-interacting protein: a potent suppressor of apoptosis and ischemic neuronal cell death." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(27): 6189-6201.

**Capone**, C., S. Frigerio, et al. (2007). "Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment." *PloS one* 2(4): e373.

**Carpentier**, P. A., W. S. Begolka, et al. (2005). "Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli." *Glia* 49(3): 360-374.

**Caso**, J. R., J. M. Pradillo, et al. (2008). "Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39(4): 1314-1320.

**Caso, J. R., J. M. Pradillo, et al. (2007).** "Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke." *Circulation* 115(12): 1599-1608.

**Castillo, J. and M. Noya (1999).** "[Mechanisms of progression of cerebral infarction]." *Neurologia* 14 Suppl 2: 2-12.

**Cazevielle, C., A. Muller, et al. (1994).** "Protection by prostaglandins from glutamate toxicity in cortical neurons." *Neurochemistry international* 24(4): 395-398.

**Chan, P. H. (2001).** "Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21(1): 2-14.

**Chen, Y. and R. A. Swanson (2003).** "Astrocytes and brain injury." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23(2): 137-149.

**Cheng, H., J. P. Wu, et al. (2002).** "Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury." *Journal of neuroscience research* 69(3): 397-405.

**Chiueh, C., S. Lee, et al. (2003).** "Induction of antioxidative and antiapoptotic thioredoxin supports neuroprotective hypothesis of estrogen." *Endocrine* 21(1): 27-31.

**Choi, D. W., J. Y. Koh, et al. (1988).** "Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8(1): 185-196.

**Choi, S. H., S. Aid, et al. (2009).** "The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research." *Trends in pharmacological sciences* 30(4): 174-181.

**Choi, S. H., S. Aid, et al. (2010).** "Cyclooxygenases-1 and -2 differentially modulate leukocyte recruitment into the inflamed brain." *The pharmacogenomics journal* 10(5): 448-457.

**Choi**, S. H., R. Langenbach, et al. (2008). "Genetic deletion or pharmacological inhibition of cyclooxygenase-1 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory response and brain injury." *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22(5): 1491-1501.

**Clark**, A. W., C. A. Krekoski, et al. (1997). "Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia." *Neuroscience letters* 238(1-2): 53-56.

**Coon**, M. J. (2005). "Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst." *Annual review of pharmacology and toxicology* 45: 1-25.

**Coon**, M. J. (2005). "Omega oxygenases: nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes." *Biochemical and biophysical research communications* 338(1): 378-385.

**Coyle**, J. T. and P. Puttfarcken (1993). "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." *Science* 262(5134): 689-695.

**Cunningham**, L. A., M. Wetzel, et al. (2005). "Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia." *Glia* 50(4): 329-339.

## D

---

**Davalos**, D., J. Grutzendler, et al. (2005). "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo." *Nature neuroscience* 8(6): 752-758.

**Deane**, R. and B. V. Zlokovic (2007). "Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Current Alzheimer research* 4(2): 191-197.

**Denes**, A., R. Vidyasagar, et al. (2007). "Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27(12): 1941-1953.

**Devaney, J. M., C. M. Greene, et al. (2003).** "Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4." *FEBS letters* 544(1-3): 129-132.

**Dirnagl, U., C. Iadecola, et al. (1999).** "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." *Trends in neurosciences* 22(9): 391-397.

**Dohmen, C., B. Bosche, et al. (2007).** "Identification and clinical impact of impaired cerebrovascular autoregulation in patients with malignant middle cerebral artery infarction." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38(1): 56-61.

**Dong, Y. and E. N. Benveniste (2001).** "Immune function of astrocytes." *Glia* 36(2): 180-190.

**Duan, S., C. M. Anderson, et al. (2003).** "P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(4): 1320-1328.

## E

---

**Ekdahl, C. T., Z. Kokaia, et al. (2009).** "Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia." *Neuroscience* 158(3): 1021-1029.

**Elward, K. and P. Gasque (2003).** "'Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system." *Molecular immunology* 40(2-4): 85-94.

**Endres, M., Z. Q. Wang, et al. (1997).** "Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17(11): 1143-1151.

**Eng, L. F., R. S. Ghirnikar, et al. (2000).** "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)." *Neurochemical research* 25(9-10): 1439-1451.

**Enkvist**, M. O. and K. D. McCarthy (1992). "Activation of protein kinase C blocks astroglial gap junction communication and inhibits the spread of calcium waves." *Journal of neurochemistry* 59(2): 519-526.

**Esen**, N., F. Y. Tanga, et al. (2004). "Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*." *Journal of neurochemistry* 88(3): 746-758.

## F

---

**Fahey**, B., B. Hickey, et al. (2007). "The widely-used anti-viral drug interferon-alpha induces depressive- and anxiogenic-like effects in healthy rats." *Behavioural brain research* 182(1): 80-87.

**Fam**, S. R., C. J. Gallagher, et al. (2003). "Differential frequency dependence of P2Y1- and P2Y2- mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(11): 4437-4444.

**Faraco**, G., S. Fossati, et al. (2007). "High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo." *Journal of neurochemistry* 103(2): 590-603.

**Farina**, C., F. Aloisi, et al. (2007). "Astrocytes are active players in cerebral innate immunity." *Trends in immunology* 28(3): 138-145.

## G

---

**Gallucci**, S. and P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." *Current opinion in immunology* 13(1): 114-119.

**Garau**, A., R. Bertini, et al. (2005). "Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia." *Cytokine* 30(3): 125-131.

**Gasche**, Y., J. C. Copin, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21(12): 1393-1400.

**Gasque**, P., Y. D. Dean, et al. (2000). "Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS." *Immunopharmacology* 49(1-2): 171-186.

**Gidday**, J. M., Y. G. Gasche, et al. (2005). "Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 289(2): H558-568.

**Gilchrist**, M., V. Thorsson, et al. (2006). "Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4." *Nature* 441(7090): 173-178.

**Gorina**, R., C. Sanfeliu, et al. (2007). "Exposure of glia to pro-oxidant agents revealed selective Stat1 activation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Jak2-independent antioxidant features of the Jak2 inhibitor AG490." *Glia* 55(13): 1313-1324.

**Gorina**, R., T. Santalucia, et al. (2009). "Astrocytes are very sensitive to develop innate immune responses to lipid-carried short interfering RNA." *Glia* 57(1): 93-107.

**Grosser**, T. (2006). "The pharmacology of selective inhibition of COX-2." *Thrombosis and haemostasis* 96(4): 393-400.

**Grosser**, T., S. Fries, et al. (2006). "Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities." *The Journal of clinical investigation* 116(1): 4-15.

## H

---

**Haberg**, A., H. Qu, et al. (2001). "Differences in neurotransmitter synthesis and intermediary metabolism between glutamatergic and GABAergic neurons during 4 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat: the role of astrocytes in neuronal survival." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21(12): 1451-1463.

**Hacker**, H. and M. Karin (2006). "Regulation and function of IKK and IKK-related kinases." *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2006(357): re13.



**Hamann**, G. F., Y. Okada, et al. (1995). "Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 26(11): 2120-2126.

**Hashimoto**, C., K. L. Hudson, et al. (1988). "The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." *Cell* 52(2): 269-279.

**Haydon**, P. G. and G. Carmignoto (2006). "Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling." *Physiological reviews* 86(3): 1009-1031.

**Heiss**, W. D. (2002). "Stroke--acute interventions." *Journal of neural transmission. Supplementum*(63): 37-57.

**Hermann**, D. M., K. A. Hossmann, et al. (2004). "Expression of c-jun, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, caspase-3 and glial fibrillary acidic protein following cortical cold injury in rats: relationship to metabolic disturbances and delayed cell death." *Neuroscience* 123(2): 371-379.

**Herrmann**, J. E., T. Imura, et al. (2008). "STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(28): 7231-7243.

**Hertz**, L., Y. Chen, et al. (2004). "Astrocytic adrenoceptors: a major drug target in neurological and psychiatric disorders?" *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3(3): 239-267.

**Hertz**, L., E. Hansson, et al. (2001). "Signaling and gene expression in the neuron-glia unit during brain function and dysfunction: Holger Hyden in memoriam." *Neurochemistry international* 39(3): 227-252.

**Hinson**, S. R., A. McKeon, et al. (2010). "Neurological autoimmunity targeting aquaporin-4." *Neuroscience* 168(4): 1009-1018.

**Hirotsani**, T., M. Yamamoto, et al. (2005). "Regulation of lipopolysaccharide-inducible genes by MyD88 and Toll/IL-1 domain containing adaptor inducing IFN-beta." *Biochemical and biophysical research communications* 328(2): 383-392.

**Honda**, K., Y. Ohba, et al. (2005). "Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction." *Nature* 434(7036): 1035-1040.

**Hori**, K., M. Katayama, et al. (1994). "Neuroprotection by glial cells through adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin (ADF/TRX)." *Brain research* 652(2): 304-310.

**Hua**, F., J. Ma, et al. (2007). "Activation of Toll-like receptor 4 signaling contributes to hippocampal neuronal death following global cerebral ischemia/reperfusion." *Journal of neuroimmunology* 190(1-2): 101-111.

## I

---

**Iadecola**, C. (2004). "Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease." *Nature reviews. Neuroscience* 5(5): 347-360.

**Iadecola**, C., C. Forster, et al. (1999). "Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia." *Acta neuropathologica* 98(1): 9-14.

**Iadecola**, C., K. Niwa, et al. (2001). "Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(3): 1294-1299.

**Ishikawa**, M., T. Vowinkel, et al. (2005). "CD40/CD40 ligand signaling in mouse cerebral microvasculature after focal ischemia/reperfusion." *Circulation* 111(13): 1690-1696.

## J

---

**Jack**, C. S., N. Arbour, et al. (2005). "TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes." *Journal of immunology* 175(7): 4320-4330.

**Jiang**, D., J. Liang, et al. (2005). "Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan." *Nature medicine* 11(11): 1173-1179.

**Jin, R., G. Yang, et al. (2010).** "Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells." *Journal of leukocyte biology* 87(5): 779-789.

**Johnson, G. B., G. J. Brunn, et al. (2002).** "Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4." *Journal of immunology* 168(10): 5233-5239.

**Johnson, G. B., G. J. Brunn, et al. (2004).** "Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4." *Journal of immunology* 172(1): 20-24.

**Johnson, K. G., A. Ghose, et al. (2004).** "Axonal heparan sulfate proteoglycans regulate the distribution and efficiency of the repellent slit during midline axon guidance." *Current biology : CB* 14(6): 499-504.

**Justicia, C., A. Martin, et al. (2006).** "Anti-VCAM-1 antibodies did not protect against ischemic damage either in rats or in mice." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26(3): 421-432.

**Justicia, C., J. Panes, et al. (2003).** "Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23(12): 1430-1440.

## K

---

**Kagan, J. C., T. Su, et al. (2008).** "TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta." *Nature immunology* 9(4): 361-368.

**Kamiya, T., Y. Katayama, et al. (1993).** "The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 24(4): 571-575; discussion 575-576.

**Karanth, S., G. Yang, et al. (2006).** "Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves." *Experimental neurology* 202(1): 161-166.

**Kariko, K., D. Weissman, et al. (2004).** "Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling--a unifying theme in ischemic tolerance." *Journal of cerebral blood flow and*

metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 24(11): 1288-1304.

**Karpus**, W. J. (1999). "Chemokine regulation of inflammatory-mediated nervous system diseases." *Journal of neurovirology* 5(1): 1-2.

**Katsura**, K., T. Kristian, et al. (1994). "Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain." *Biochemical Society transactions* 22(4): 991-996.

**Kawai**, T. and S. Akira (2007). "Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors." *Trends in molecular medicine* 13(11): 460-469.

**Kawai**, T., S. Sato, et al. (2004). "Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6." *Nature immunology* 5(10): 1061-1068.

**Kawai**, Y., Y. Ishii, et al. (2004). "Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli." *Applied and environmental microbiology* 70(5): 2906-2911.

**Kawano**, T., J. Anrather, et al. (2006). "Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity." *Nature medicine* 12(2): 225-229.

**Kelly**, P. J., J. D. Morrow, et al. (2008). "Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) study." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39(1): 100-104.

**Kim**, J. S. (1996). "Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases." *Journal of the neurological sciences* 137(2): 69-78.

**Kumari**, R., L. B. Willing, et al. (2010). "The PPAR-gamma agonist, darglitazone, restores acute inflammatory responses to cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic ob/ob mouse." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30(2): 352-360.

**Kuwata**, H., M. Matsumoto, et al. (2006). "IkappaBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation." *Immunity* 24(1): 41-51.

---

**L**

---

**Lai, A. Y. and K. G. Todd (2008).** "Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury." *Glia* 56(3): 259-270.

**Lamon, B. D., R. K. Upmacis, et al. (2010).** "Inducible nitric oxide synthase gene deletion exaggerates MAPK-mediated cyclooxygenase-2 induction by inflammatory stimuli." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299(3): H613-623.

**Lee, H., E. K. Jo, et al. (2006).** "Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: implication in Wallerian degeneration." *Biochemical and biophysical research communications* 350(3): 742-747.

**Lee, H. K., J. Lee, et al. (2002).** "Two lipoproteins extracted from *Escherichia coli* K-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major components responsible for Toll-like receptor 2-mediated signaling." *Journal of immunology* 168(8): 4012-4017.

**Lee, S. J., K. Drabik, et al. (2000).** "ICAM-1-induced expression of proinflammatory cytokines in astrocytes: involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways." *Journal of immunology* 165(8): 4658-4666.

**Lefter, A. M., X. L. Ma, et al. (1993).** "Endothelial dysfunction and neutrophil adherence as critical events in the development of reperfusion injury." *Agents Actions Suppl* 41: 127-135.

**Lehnardt, S., E. Schott, et al. (2008).** "A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(10): 2320-2331.

**Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996).** "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* 86(6): 973-983.

**Levy, B. D., G. T. De Sanctis, et al. (2003).** "Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in airway responses." *Advances in experimental medicine and biology* 525: 19-23.

**Litvak**, V., S. A. Ramsey, et al. (2009). "Function of C/EBPdelta in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals." *Nature immunology* 10(4): 437-443.

**Liu**, L. Y., E. Q. Wei, et al. (2005). "Protective effects of baicalin on oxygen/glucose deprivation- and NMDA-induced injuries in rat hippocampal slices." *The Journal of pharmacy and pharmacology* 57(8): 1019-1026.

**Livak**, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.

**Loddick**, S. A., X. J. Liu, et al. (1998). "Displacement of insulin-like growth factors from their binding proteins as a potential treatment for stroke." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(4): 1894-1898.

**Lok**, J., H. Wang, et al. (2007). "Effect of neuregulin-1 on histopathological and functional outcome after controlled cortical impact in mice." *Journal of neurotrauma* 24(12): 1817-1822.

**Love**, S. (1999). "Oxidative stress in brain ischemia." *Brain pathology* 9(1): 119-131.

**Lynch**, A. M., C. Walsh, et al. (2004). "Lipopolysaccharide-induced increase in signalling in hippocampus is abrogated by IL-10--a role for IL-1 beta?" *Journal of neurochemistry* 88(3): 635-646.

## M

---

**MacManus**, J. P., T. Graber, et al. (2004). "Translation-state analysis of gene expression in mouse brain after focal ischemia." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24(6): 657-667.

**Marsh**, B., S. L. Stevens, et al. (2009). "Systemic lipopolysaccharide protects the brain from ischemic injury by reprogramming the response of the brain to stroke: a critical role for IRF3." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(31): 9839-9849.

**Marta**, M. (2009). "Toll-like receptors in multiple sclerosis mouse experimental models." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173: 458-462.

**Martin**, R. L., H. G. Lloyd, et al. (1994). "The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?" *Trends in neurosciences* 17(6): 251-257.

**Martin Villalba** -, A., I. Herr, et al. (1999). "CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(10): 3809-3817.

**Maslinska**, D., R. Wozniak, et al. (1999). "Localization and a role of cyclooxygenases in the CNS." *Folia Neuropathol* 37(3): 203-204.

**Masutani**, H., J. Bai, et al. (2004). "Thioredoxin as a neurotrophic cofactor and an important regulator of neuroprotection." *Molecular neurobiology* 29(3): 229-242.

**Matthias**, K., F. Kirchhoff, et al. (2003). "Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(5): 1750-1758.

**Mattson**, M. P., W. Duan, et al. (2001). "Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases." *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 6(1-2): 69-81.

**McCull**, B. W., N. J. Rothwell, et al. (2007). "Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(16): 4403-4412.

**McCullough**, L., L. Wu, et al. (2004). "Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(1): 257-268.

**McKimmie**, C. S. and J. K. Fazakerley (2005). "In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression." *Journal of neuroimmunology* 169(1-2): 116-125.

**Medzhitov**, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition." *Cell* 91(3): 295-298.

**Melani**, A., D. Turchi, et al. (2005). "ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia." *Neurochemistry international* 47(6): 442-448.

**Minghetti**, L., D. T. Walsh, et al. (1999). "In vivo expression of cyclooxygenase-2 in rat brain following intraparenchymal injection of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines." *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58(11): 1184-1191.

**Montana**, V., E. B. Malarkey, et al. (2006). "Vesicular transmitter release from astrocytes." *Glia* 54(7): 700-715.

**Moore**, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annual review of immunology* 19: 683-765.

**Morrison**, J., K. Knoll, et al. (2004). "Effect of high glucose on gene expression in mesangial cells: upregulation of the thiol pathway is an adaptational response." *Physiological genomics* 17(3): 271-282.

**Murugaiyan**, G., A. Mittal, et al. (2009). "IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells." *Journal of immunology* 183(4): 2435-2443.

**Muzio**, M., D. Bosisio, et al. (2000). "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells." *Journal of immunology* 164(11): 5998-6004.

**Namura**, S., J. Zhu, et al. (1998). "Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(10): 3659-3668.

## N

---

**Nguyen**, H. H., F. W. van Ginkel, et al. (2001). "Heterosubtypic immunity to influenza A virus infection requires B cells but not CD8+ cytotoxic T lymphocytes." *The Journal of infectious diseases* 183(3): 368-376.



**Nicholls, D.** and D. Attwell (1990). "The release and uptake of excitatory amino acids." *Trends in pharmacological sciences* 11(11): 462-468.

**Nicoli, F., Y. Lefur, et al.** (2003). "Metabolic counterpart of decreased apparent diffusion coefficient during hyperacute ischemic stroke: a brain proton magnetic resonance spectroscopic imaging study." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 34(7): e82-87.

**Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, et al.** (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." *Science* 308(5726): 1314-1318.

## O

**Ohashi, K., V. Burkart, et al.** (2000). "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." *Journal of immunology* 164(2): 558-561.

**Okada, S., M. Nakamura, et al.** (2006). "Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury." *Nature medicine* 12(7): 829-834.

**Okada, Y., X. J. Zuo, et al.** (1999). "Antithrombin III treatment improves parameters of acute inflammation in a highly histoincompatible model of rat lung allograft rejection." *Transplantation* 67(4): 526-528.

**Okamura, Y., M. Watari, et al.** (2001). "The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4." *The Journal of biological chemistry* 276(13): 10229-10233.

**Olson, E. E. and R. J. McKeon** (2004). "Characterization of cellular and neurological damage following unilateral hypoxia/ischemia." *Journal of the neurological sciences* 227(1): 7-19.

**Olson, J. K. and S. D. Miller** (2004). "Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs." *Journal of immunology* 173(6): 3916-3924.

**Owens, T., A. A. Babcock, et al.** (2005). "Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS." *Brain research. Brain research reviews* 48(2): 178-184.

**Oyama, J., C. Blais, Jr., et al. (2004).** "Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice." *Circulation* 109(6): 784-789.

## P

---

**Pardridge, W. M. (2005).** "Molecular biology of the blood-brain barrier." *Molecular biotechnology* 30(1): 57-70.

**Park, K. S., J. M. Wells, et al. (2006).** "Sox17 influences the differentiation of respiratory epithelial cells." *Developmental biology* 294(1): 192-202.

Parkinson, F. E. and W. Xiong (2004). "Stimulus- and cell-type-specific release of purines in cultured rat forebrain astrocytes and neurons." *Journal of neurochemistry* 88(5): 1305-1312.

**Peng, L., R. A. Swanson, et al. (2001).** "Effects of L-glutamate, D-aspartate, and monensin on glycolytic and oxidative glucose metabolism in mouse astrocyte cultures: further evidence that glutamate uptake is metabolically driven by oxidative metabolism." *Neurochemistry international* 38(5): 437-443.

**Phillis, J. W., L. A. Horrocks, et al. (2006).** "Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders." *Brain research reviews* 52(2): 201-243.

**Piccinini, A. M. and K. S. Midwood (2010).** "DAMPening inflammation by modulating TLR signalling." *Mediators of inflammation* 2010.

**Planas, A. M., S. Sole, et al. (2001).** "Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia." *Neurobiology of disease* 8(5): 834-846.

**Planas, A. M., M. A. Soriano, et al. (1995).** "Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein following transient focal ischemia in the rat brain." *Neuroscience letters* 200(3): 187-190.

**Poligone, B.** and A. S. Baldwin (2001). "Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins." *The Journal of biological chemistry* 276(42): 38658-38664.

**Prehaud, C., F. Megret, et al.** (2005). "Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon." *Journal of virology* 79(20): 12893-12904.

## R

---

**Rajakariar, R., M. M. Yaqoob, et al.** (2006). "COX-2 in inflammation and resolution." *Molecular interventions* 6(4): 199-207.

**Rivest, S.** (2009). "Regulation of innate immune responses in the brain." *Nature reviews. Immunology* 9(6): 429-439.

**Rosell, A., A. Ortega-Aznar, et al.** (2006). "Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 37(6): 1399-1406.

**Rosenbaum, D. M., G. Gupta, et al.** (2000). "Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia." *Journal of neuroscience research* 61(6): 686-692.

**Rosenzweig, H. L., N. S. Lessov, et al.** (2004). "Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35(11): 2576-2581.

**Rudolphi, K. A., P. Schubert, et al.** (1992). "Adenosine and brain ischemia." *Cerebrovascular and brain metabolism reviews* 4(4): 346-369.

## S

---

**Sans-Fons**, M. G., S. Sole, et al. (2010). "Matrix metalloproteinase-9 and cell division in neuroblastoma cells and bone marrow macrophages." *The American journal of pathology* 177(6): 2870-2885.

**Scaffidi**, P., T. Misteli, et al. (2002). "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." *Nature* 418(6894): 191-195.

**Schaefer**, L., A. Babelova, et al. (2005). "The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages." *The Journal of clinical investigation* 115(8): 2223-2233.

**Schilling**, M., M. Besselmann, et al. (2005). "Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice." *Experimental neurology* 196(2): 290-297.

**Schneweis**, S., M. Grond, et al. (2001). "Predictive value of neurochemical monitoring in large middle cerebral artery infarction." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32(8): 1863-1867.

**Scumpia**, P. O., K. M. Kelly, et al. (2005). "Double-stranded RNA signals antiviral and inflammatory programs and dysfunctional glutamate transport in TLR3-expressing astrocytes." *Glia* 52(2): 153-162.

**Serhan**, C. N. and B. Levy (2003). "Novel pathways and endogenous mediators in anti-inflammation and resolution." *Chem Immunol Allergy* 83: 115-145.

**Serhan**, C. N. and B. Levy (2003). "Success of prostaglandin E2 in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(15): 8609-8611.

**Shi**, J., J. Johansson, et al. (2010). "The prostaglandin E2 E-prostanoid 4 receptor exerts anti-inflammatory effects in brain innate immunity." *Journal of immunology* 184(12): 7207-7218.

**Shimizu**, T. and L. S. Wolfe (1990). "Arachidonic acid cascade and signal transduction." *Journal of neurochemistry* 55(1): 1-15.

**Smiley**, S. T., J. A. King, et al. (2001). "Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4." *Journal of immunology* 167(5): 2887-2894.

**Sofroniew**, M. V. (2009). "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation." *Trends in neurosciences* 32(12): 638-647.

**Sofroniew**, M. V. (2009). "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation." *Trends in neurosciences* 32(12): 638-647.

**Sofroniew**, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." *Acta neuropathologica* 119(1): 7-35.

**Sole**, S., V. Petegnief, et al. (2004). "Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion." *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63(4): 338-349.

**Soos**, J. M., J. Morrow, et al. (1998). "Astrocytes express elements of the class II endocytic pathway and process central nervous system autoantigen for presentation to encephalitogenic T cells." *Journal of immunology* 161(11): 5959-5966.

**Soriano**, S. G., S. A. Lipton, et al. (1996). "Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury." *Annals of neurology* 39(5): 618-624.

**Spector**, A. A. (2009). "Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway." *Journal of lipid research* 50 Suppl: S52-56.

**Spera**, P. A., J. A. Ellison, et al. (1998). "IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke." *Neuroscience letters* 251(3): 189-192.

**Stamatovic**, S. M., P. Shakuji, et al. (2005). "Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability." *Journal of cerebral blood flow and*

metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 25(5): 593-606.

**Stanimirovic, D.** and K. Satoh (2000). "Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation." *Brain pathology* 10(1): 113-126.

**Stein, D., S. Roth, et al.** (1991). "The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal." *Cell* 65(5): 725-735.

**Stevens, S. L., T. M. Ciesielski, et al.** (2008). "Toll-like receptor 9: a new target of ischemic preconditioning in the brain." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28(5): 1040-1047.

**Storini, C., E. Rossi, et al.** (2005). "C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation." *Neurobiology of disease* 19(1-2): 10-17.

**Sugawara, T.** and P. H. Chan (2003). "Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia." *Antioxidants & redox signaling* 5(5): 597-607.

**Suzuki, Y., N. Nagai, et al.** (2007). "Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice." *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5(8): 1732-1739.

**Swanson, R. A., W. Ying, et al.** (2004). "Astrocyte influences on ischemic neuronal death." *Current molecular medicine* 4(2): 193-205.

**Sweeney, M. I., J. Y. Yager, et al.** (1995). "Cellular mechanisms involved in brain ischemia." *Canadian journal of physiology and pharmacology* 73(11): 1525-1535.

**Sykova, E., J. Svoboda, et al.** (1994). "Extracellular volume fraction and diffusion characteristics during progressive ischemia and terminal anoxia in the spinal cord of the rat." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 14(2): 301-311.

# T

---

**Takadera**, T. and T. Ohyashiki (2006). "Prevention of rat cortical neurons from prostaglandin E2-induced apoptosis by glycogen synthase kinase-3 inhibitors." *Neuroscience letters* 400(1-2): 105-109.

**Tang**, S. C., J. D. Lathia, et al. (2008). "Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal." *Experimental neurology* 213(1): 114-121.

**Tanimura**, N., S. Saitoh, et al. (2008). "Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling." *Biochemical and biophysical research communications* 368(1): 94-99.

**Tasaki**, K., C. A. Ruetzler, et al. (1997). "Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats." *Brain research* 748(1-2): 267-270.

**Tedgui**, A. and C. Bernard (1994). "Cytokines, immuno-inflammatory response and atherosclerosis." *Eur Cytokine Netw* 5(3): 263-270.

**Tenoever**, B. R., S. L. Ng, et al. (2007). "Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity." *Science* 315(5816): 1274-1278.

**Termeer**, C., F. Benedix, et al. (2002). "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4." *The Journal of experimental medicine* 195(1): 99-111.

**Tokita**, Y., H. Keino, et al. (2001). "Regulation of neuregulin expression in the injured rat brain and cultured astrocytes." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(4): 1257-1264.

**Trendelenburg**, G., K. Prass, et al. (2002). "Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(14): 5879-5888.

---

## U

---

**Uematsu, S., S. Sato, et al. (2005).** "Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction." *The Journal of experimental medicine* 201(6): 915-923.

---

## V

---

**Vabulas, R. M., H. Wagner, et al. (2002).** "Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors." *Current topics in microbiology and immunology* 270: 169-184.

**van Beek, J., K. Elward, et al. (2003).** "Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection." *Annals of the New York Academy of Sciences* 992: 56-71.

**van Noort, J. M. and M. Bsibsi (2009).** "Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair." *Progress in brain research* 175: 139-148.

**Vass, K. and H. Lassmann (1990).** "Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system." *The American journal of pathology* 137(4): 789-800.

**Vila, N., J. Castillo, et al. (2003).** "Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 34(3): 671-675.

**Vila, N., A. Chamorro, et al. (2001).** "Glutamate, interleukin-6, and early clinical worsening in patients with acute stroke." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32(5): 1234-1237.

---

## W

---

**Wang, X. and G. Z. Feuerstein (1995).** "Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia." *Journal of neurotrauma* 12(5): 825-832.



**Watanabe**, K., S. Narimatsu, et al. (1993). "A cytochrome P450 isozyme having aldehyde oxygenase activity plays a major role in metabolizing cannabinoids by mouse hepatic microsomes." *Biochemical pharmacology* 46(3): 405-411.

**Webster**, K. A., R. M. Graham, et al. (2006). "Redox stress and the contributions of BH3-only proteins to infarction." *Antioxidants & redox signaling* 8(9-10): 1667-1676.

**Weyrich**, A. S., X. Y. Ma, et al. (1993). "In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury." *The Journal of clinical investigation* 91(6): 2620-2629.

**Wong**, G. H., P. F. Bartlett, et al. (1984). "Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells." *Nature* 310(5979): 688-691.

## X

---

**Xia**, J., W. Liu, et al. (2010). "IL-15 promotes regulatory T cell function and protects against diabetes development in NK-depleted NOD mice." *Clinical immunology* 134(2): 130-139.

## Y

---

**Yermakova**, A. and M. K. O'Banion (2000). "Cyclooxygenases in the central nervous system: implications for treatment of neurological disorders." *Current pharmaceutical design* 6(17): 1755-1776.

## Z

---

**Zeldin**, D. C. (2001). "Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism." *The Journal of biological chemistry* 276(39): 36059-36062.

**Zeng**, W., M. Xu, et al. (2009). "Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3." *Molecular cell* 36(2): 315-325.

**Zhang**, R. L., M. Chopp, et al. (1994). "Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat." *Neurology* 44(9): 1747-1751.

**Zhang**, Z. and M. Chopp (2002). "Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia." *Trends in cardiovascular medicine* 12(2): 62-66.

**Zhao**, B. Q., S. Wang, et al. (2006). "Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke." *Nature medicine* 12(4): 441-445.

**Zhu**, Y., G. Y. Yang, et al. (2002). "Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(10): 3898-3909.

**Ziegler**, G., D. Harhausen, et al. (2007). "TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia." *Biochemical and biophysical research communications* 359(3): 574-579.

**Zlokovic**, B. V. (2004). "Clearing amyloid through the blood-brain barrier." *Journal of neurochemistry* 89(4): 807-811.

Zlokovic, B. V. (2006). "Remodeling after stroke." *Nature medicine* 12(4): 390-391.

**Zlokovic**, B. V. (2008). "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." *Neuron* 57(2): 178-201.



# ***Annexes***

*En el següent apartat es recullen diferents treballs en els que he col·laborat, malgrat no tots formen part del tema principal de la tesi doctoral.*



## ***Annex I***

*Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NF $\kappa$ B signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways.*





## Astrocyte TLR4 Activation Induces a Proinflammatory Environment Through the Interplay Between MyD88-Dependent NF $\kappa$ B Signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 Pathways

ROSER GORINA, MIRIAM FONT-NIEVES, LEONARDO MÁRQUEZ-KISINOUSKY, TOMÁS SANTALUCIA, AND ANNA M. PLANAS\*

Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

### KEY WORDS

LPS; Stat1; NF $\kappa$ B; inflammation; glia; brain; rodent

### ABSTRACT

There is increasing evidence that astrocytes play important roles in immune regulation in the brain. Astrocytes express toll-like receptors (TLR) and build up responses to innate immune triggers by releasing proinflammatory molecules. We investigate signaling pathways and released molecules after astrocyte TLR4 activation. Purified rodent brain astrocyte cultures were treated with the TLR4 activator bacterial lipopolysaccharide (LPS). Tools used to interfere with this system include small interference RNA, inhibitory drugs, and MyD88 or Stat1 deficient mice. LPS induced early activation of the transcription factor NF $\kappa$ B, through the MyD88 adaptor, and expression of TNF- $\alpha$ , VCAM-1, IL-15, and IL-27. LPS also induced delayed Jak1/Stat1 activation, which was MyD88-independent but was not mediated by IFN- $\beta$ . Jak1/Stat1 activation induced the expression of negative cytokine regulator SOCS-1 and CXCL10 chemokine (IP-10). Mitogen-activated protein kinases (MAPK) were also involved in TLR4 signaling in a MyD88-independent fashion. p38 exerted a strong influence on LPS-induced gene expression by regulating the phosphorylation of Stat1 and the transcriptional activity of NF $\kappa$ B, while JNK regulated the Jak1/Stat1 pathway, and ERK1/2 controlled the expression of Egr-1 and influenced MyD88-dependent MMP-9 expression. Interplay between these signals was evidenced by the increased induction of MMP-9 in Stat1-deficient cells challenged with LPS, suggesting that Stat1 negatively regulates the expression of MMP-9 induced by LPS. Therefore, astrocytes are responsive to TLR4 activation by inducing a complex set of cell-dependent molecular reactions mediated by NF $\kappa$ B, MAPK and Jak1/Stat1 signaling pathways. Here we identified cross-talking signals generating a proinflammatory environment that will modulate the response of surrounding cells. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

agents and to build up immune responses. Immune responses in the CNS are mainly attributed to microglia (Rivest, 2009), due to the capacity of these cells to present antigens. However, astrocytes express toll-like receptors (TLR), respond to TLR agonists by releasing proinflammatory molecules (Gorina et al., 2009; van Noort et al., 2009), and can modulate the features of the immune responses (Dong and Benveniste, 2001; Farina et al., 2007). Astrocytes have a strategic location at the interface between blood vessels and brain parenchyma, as their feet surround an extensive surface of brain capillaries, they participate in BBB function (Zlokovic, 2008), and in cerebral blood flow regulation by releasing vasoactive mediators (Gordon et al., 2007), and they express molecules that are implicated in the pathogenesis of certain autoimmune disorders affecting the permeability of the BBB (Lennon et al., 2005; Hinson et al., 2010). Astrocytes form an intricate intercommunicating network with other neural cells. Therefore, signals from astrocytes can have an extensive impact on the neurovascular unit and affect brain function. Reactive astrocytes have complex and apparently opposite functions during the course of CNS injury and also depending on the type and extent of the injury, since they can prevent axonal regeneration through their prominent involvement in scar formation but they can also play important roles in functional recovery (Okada et al., 2006; Sofroniew et al., 2009). At the expense of inhibiting axonal regeneration, the glial scar has the beneficial effect of restricting the spread of inflammation after CNS injury (Bush et al., 1999), and several molecular determinants of this process have been identified (Herrmann et al., 2008; Sofroniew et al., 2009). Therefore, signaling

### INTRODUCTION

The brain has been classically considered an immunoprivileged organ due to its isolation from the periphery through the blood-brain barrier (BBB). Nonetheless, central nervous system (CNS) cells are equipped with recognition tools allowing them to become aware of infectious

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Ministerio de Educación y Ciencia; Grant number: SAF2008-04515; Grant sponsor: Generalitat de Catalunya; Grant number: CIDEA, RDITSCON07-1-0006; Grant sponsor: European Community; Grant number: FP7/2007-2013 (n°201024).

\*Correspondence to: Anna M. Planas, PhD, Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Roselló 161, planta 6, 08036-Barcelona, Spain. E-mail: amplanas@iibb.csic.es

Received 14 July 2010; Accepted 22 September 2010

DOI 10.1002/glia.21094

Published online 1 December 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

© 2010 Wiley-Liss, Inc.



modulation may affect the various functional responses of the astrocytes to CNS injury (Sofroniew et al., 2009).

Recent evidences support that TLR4 is involved in brain damage after stroke (Caso et al., 2007, 2008; Kilic et al., 2008; Tang et al., 2007) and in Alzheimer's disease (Cashman et al., 2008; Tang et al., 2008). Moreover, TLR4 might also play a role in autoimmune diseases affecting the CNS, as multiple sclerosis (Marta, 2009). Bacterial lipopolysaccharide (LPS) induces TLR4 dimerization and activation of adaptor molecules that recruit cytoplasmic proteins to the membrane to activate signaling cascades, induce changes in gene transcription, and promote inflammation. In monocytes, recruitment of the adaptor pair Mal and MyD88 induces early activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), whereas recruitment of the TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) activates IRF-3 and generates IFN- $\beta$  (Kawai and Akira, 2007; Núñez-Miguel et al., 2007; Yamamoto et al., 2003). These effects extensively amplify the initial extracellular stimuli and trigger inflammatory responses. Nonetheless, a previous study showed that astrocytes do not release IFN- $\beta$  after LPS (Krasowska-Zoladek et al., 2007) suggesting that astrocytes show cell-type specific responses to this agent. Here we used the typical TLR4 activator LPS in astrocytes to investigate the signaling pathways responsive to this agent and the release of proinflammatory mediators that can exert paracrine effects in neighboring cells, as well as autocrine effects promoting astroglial reactivity.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

MAPK inhibitors: MAP kinase kinase (MEK) inhibitor 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene (U0126); p38 MAPK inhibitor trans-4-[4-(4-Fluorophenyl)-5-(2-methoxy-4-pyrimidinyl)-1H-imidazol-1-yl] cyclohexanol (SB239063), stress-activated SAPK/MAPK inhibitor anthra (1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one (SP600125), and the proteasome inhibitor Z-Leu-Leu-Leu-H (aldehyde) (MG-132) were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). LPS (*Escherichia coli* 055:B5) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and was used throughout this work, excepting in several control experiments where ultrapure LPS obtained from *E.coli* 0111:B4 strain (#06B24-M from InvivoGen, San Diego, CA) was used for comparison purposes. siRNA sequences were purchased from Thermo Fisher Scientific Dharmacon Products (Lafayette, CO). Recombinant rat IFN- $\beta$  was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). A neutralizing antibody against rat IFN- $\beta$  was purchased from Cedarlane Laboratories (Ontario, Canada).

### Purified Astrocyte Cultures

Animal work was authorized by the Ethical Committee of the University of Barcelona (CEEA) and it was

performed in agreement with the local regulations and in compliance with the Directives of the European Community. Glial cell cultures enriched in astrocytes were prepared from the cerebral cortex of 1- to 2-day-old Sprague-Dawley rats (Charles-River, France), or mice (see below) as described previously (Gorina et al., 2009). Glial cells were plated in flasks (75 cm<sup>2</sup>, TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) and maintained in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco-BRL, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 20% foetal bovine serum (FBS; Gibco-BRL) and 4 mL/L of a mixture of penicillin/streptomycin 10,000U/10,000  $\mu$ g/mL (Gibco-BRL) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>-95% air. Medium was changed every four to five days with the incubation medium supplemented with 10% FBS. Glial cell culture reach confluence after 8-10 days in vitro (DIV), then cells were treated with 4  $\mu$ M of the antimitotic cytosine arabinoside (Ara-C, Sigma-Aldrich) for five days to eliminate dividing cells, i.e. mostly microglia and progenitors as described (Gorina et al., 2009). Flasks were shaken for 4 h at 200 rpm, and the remaining astrocyte adherent monolayer was detached with trypsin 0.05%/EDTA 0.2 mM and seeded at  $10 \times 10^4$  cells/well in 12-well plate (TPP) with incubation medium (see above). Astrocyte cultures were used five days after subculturing when they were confluent and contained a low percentage ( $2.01 \pm 1.68\%$ ) of contaminating microglia cells, as assessed by immunostaining with antibodies against ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1) and against glial fibrillary acidic protein (GFAP) to label microglia and astroglia, respectively, followed by cell counting in three separate astroglia cultures (See Supp. Info. Fig. 1). For mouse astrocytes, culture medium was Dulbecco's modified Eagle medium:F-12 nutrient (DFE) (1:1) (Gibco-BRL), supplemented with 10% FBS, and 4 mL/L of a mixture of penicillin/streptomycin 10,000U/mL (Gibco-BRL). Primary mouse astrocyte cultures were treated as described above for rat cells to obtain cultures highly enriched in astrocytes.

For experiments with MyD88<sup>-/-</sup> cells, knock-out (KO) mice with a C57BL/6 background were obtained from Oriental Bioservices, Inc. (Kyoto, Japan). MyD88<sup>-/-</sup> mice were backcrossed with wild type (wt) C57BL/6 mice (Charles River, Lyon, France) and a colony of MyD88<sup>+/-</sup> mice was kept in the animal house of the School of Medicine (University of Barcelona). Separated cultures were obtained from individual newborn animals that were then individually genotyped to select MyD88<sup>-/-</sup> (KO) and MyD88<sup>+/-</sup> (wt) cultures. Genotyping was carried out by doing PCR on DNA extracted from tail biopsies. The Extract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma) was used for the extraction of DNA and preparation of PCR reactions according to the manufacturer's instructions. The following set of primers (Okabe et al., 2005) were used for PCR: 5'-AGATGATCCGCAACTA GAACA-3' (sense, common), 5'-GAATCAGTCGCTTCTG TTGGAC-3' (antisense, wt), and 5'-GATTCGCAGCG CATCGCCCT-3' (antisense, mutant). The cycling parameters were optimized to 94°C, 5 min for initial denatura-

GLIA

tion, followed by 42 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, primer annealing at 65°C for 30 s, extension at 72°C for 1 min. The last cycle was followed by an additional extension step at 72°C for 5 min. Supporting Information Figure 2 depicts an example of a genotyping reaction.

For experiments with Stat1<sup>-/-</sup> astrocytes, Stat1 deficient mice (129.S6.SvEv-Stat) and wt mice of the same background (129.S6.SvEv-Wt) were obtained from Taconic Farms (Hudson, NY). Experiments in KO and wt cells were carried in parallel.

#### Purified Microglia Cultures

For comparison purposes, we did several experiments using purified microglia cultures that were obtained as previously reported (Gorina et al., 2009).

#### Drug Treatments

Astrocytes were exposed to 10 ng/mL LPS for different time periods ranging from 5 min to 24 h depending on the experiment. FBS was reduced to 1% for 16 h prior to stimulation with LPS. Cells were treated with U0126 (25  $\mu$ M), SB239063 (25  $\mu$ M), or SP600125 (10  $\mu$ M) 30 min prior to LPS treatment. MG-132 (10  $\mu$ M) was applied 15 h before LPS. Rat astrocytes were treated with 10 ng/mL rat recombinant IFN- $\beta$  or LPS in the presence or absence of 100 ng/mL anti-IFN- $\beta$  neutralizing antibody.

#### siRNA Transfection

Twenty-four hours after subculturing, rat astrocytes were transfected with specific siRNA sequences TARGETplus<sup>TM</sup> SMARTpool siRNA from Dharmacon directed against TLR4 (L-090819-00, Rat TLR4, NM\_019178), Stat1 (L-080050-01, Rat STAT1, NM\_001034164), NF $\kappa$ B p65 (L-0800033-01, Rat RelA, NM\_199267), Jak1 (L-101621-01, Rat Jak1, XM\_342872), Jak2 (L-088340-01, Rat JAK2, NM\_031514) and IFN- $\beta$  (L-094752-01-0010, Rat IFNB1, NM\_019127). ON-TARGETplus Nontargeting siRNA (D-001810-01, Dharmacon) was used as a negative control (ns). These siRNAs were pre-designed by the maker to minimize off-side effects (Gorina et al., 2009). siRNAs were used at 100 nM and were transfected with oligofectamine<sup>TM</sup> (Invitrogen) as previously described in Gorina et al. (2009). Astrocytes were used four days after siRNA transfection. The silencing effect was verified by RT-PCR and/or Western blotting.

#### NF $\kappa$ B Transcriptional Reporter Assay

A NF $\kappa$ B promoter reporter vector containing the firefly luciferase gene (pNF $\kappa$ B-Luc, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) was used to quantify NF $\kappa$ B-transcription

GLIA

activity. Transfection efficiency was normalized by co-transfection with pRL-CMV vector (Promega, Heidelberg, Germany) that contains the renilla luciferase gene. The pNF- $\kappa$ B-Luc vector (1  $\mu$ g) and the pRL-CMV vector (100 ng) were transfected with LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. Sixteen hours after transfection, astrocytes were treated with 10 ng/mL LPS and incubated for 4 h. Afterwards, cells were washed in PBS and lysed in 500  $\mu$ L of lysis buffer on ice. Luciferase activity was measured in a luminometer using the dual luciferase reporter assay system (Promega).

#### Western Blotting

Astrocytes were washed once with ice-cold PBS and lysed in RIPA buffer containing a protease inhibitor mixture (Complete; Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Nuclear protein fractions were prepared using Nuclear Extract kit (Active Motif). Protein concentrations were determined using Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules, CA). Totally, 20  $\mu$ g of protein extract were resolved by 8–10% SDS-PAGE and proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane according to standard protocols. Polyclonal primary antibodies directed against the following proteins were used: I $\kappa$ B- $\alpha$ , NF $\kappa$ B p65/RelA (p65), NF $\kappa$ B p50/RelB (p50), and VCAM-1 were diluted 1:1,000, and Jak1 and Jak2 were diluted 1:500, and were all purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); phospho-Stat1 (Tyr701), phospho-Stat3 (Tyr705), p44/42 MAPK (pERK1/2), phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (pJNK) were diluted 1:1,000, and IRF-3 and phospho-IRF3 (Ser396) were diluted 1:500, and were all obtained from Cell Signalling Technology (Beverly, MA); phospho-p38 (Thr180/Tyr182) (p-p38) was diluted 1:500 and was obtained from Abcam (Cambridge, UK). The monoclonal primary antibodies were against total Stat1 (BD Transduction Labs., Lexington, KY) diluted 1:1,000; TATA binding protein (TBP) (Abcam) diluted 1:1,000; and  $\beta$ -Tubulin diluted 1:50,000 and actin diluted 1:100,000 (Sigma). All antibodies were diluted in tris-buffered saline (TBS) containing 0.5% Tween-20 and were incubated overnight at 4°C. On the following day, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1,000; Bio-Rad) or goat anti-rabbit IgG (1:2,000; Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) for 2 h at room temperature. The blots were developed with the use of a chemiluminescent substrate (ECL advanced chemiluminescence detection system; Amersham Biosciences).

#### Immunofluorescence Detection

For immunofluorescence staining, astrocytes were seeded on polylysine-coated coverslips. After LPS treatment, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min.

After three washes, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 min, blocked with 10% goat serum in PBS for 1 h and incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibodies against NFκB p65 (Santa Cruz Biotechnology, CA) diluted 1:250 or against Iba-1 (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) diluted 1:1,000 in PBS containing 2% goat serum, or with a mouse monoclonal antibody against GFAP (Boehringer Mannheim, Germany) diluted 1:1,000 in PBS containing 2% horse serum. The next day, cells were washed and incubated with green-fluorescence Alexa Fluor 488 dye-labeled goat anti-rabbit IgG antibody (Molecular Probes) during 1h at room temperature. After the immunoreaction, astrocytes were stained with Hoechst to visualize the nuclei. The coverslips were mounted onto microscope slides using Mowiol mounting medium (Calbiochem, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany). Observations were performed with an Olympus IX70 fluorescence microscope. Image J was used for image processing.

#### Real-Time PCR

Total RNA was extracted using an RNeasy Mini kit (Qiagen) and RNA quantity and purity were determined using ND-1000 micro-spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). A total of 1 μg of total RNA was reverse-transcribed using a mixture of random primers according to the manufacturer's protocol (AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit, # 12328-040, Invitrogen). Real-time quantitative RT-PCR analysis was performed in the iCycler iQTM Multicolor Real-Time Detection System (Bio-Rad) by SYBR green I dye detection. PCR primers were designed to bridge the exon-intron boundaries within the gene of interest to exclude possible contamination by genomic DNA with the aid of the Primer3 software. The following rat specific primers were used for: β-actin (forward) 5'-CAACCTTCCTTG CAGCTCCTC-3' and (reverse) 5'-TTCTGACCCATACC CACCAT-3'; CD11b (forward) 5'-CTGGGAGATGT GAATGGAG-3' and (reverse) 5'-ACTGATGCTGGCTACT GATG-3'; Egr-1 (forward) 5'- AACAACCCCTACGAG CACCTG-3' and (reverse) 5'-AGGCCACTGACTAGGCT GAA-3'; IFN-β (forward) 5'-TGAGGCAGCTGAATG GAAGG-3' and (reverse) 5'-TGAATGGCAAAGGCAGTG TAAC-3'; IL-15 (forward) 5'-TAACTGAGGCTGGCAGT CAG-3' and (reverse) 5'- GGAGAAAGCAGTTCATTGC AG-3'; IL-27 (forward) 5'-CCCCAATGTTTCCCTGAC CTCC-3' and (reverse) 5'-ATTGCCACAGCTGCCTC CCTCTC-3'; IP-10 (forward) 5'- GGGCCATAGGAAAA CTTGAAATC-3' and (reverse) 5'-CATGTGGCAATGAT CTCAACAT-3'; MHC-II (forward) 5'-AGAGACCATCTG GAGACTTG-3' and (reverse) 5'-CATCTGGGGTGTG TTGGA-3'; MMP9 (forward) 5'-GTATTGGAAGTTCTC GAATCAC-3' and (reverse) 5'-CAAGTCGAATTTCCAGA TACG-3'; SOCS-1 (forward) 5'-TTCCGCACCTTCCGCT CCCACTCT-3' and (reverse) 5'- CGCCCCATGCACG CTCAGG-3'; TLR4 (forward) 5'-GTTGGATGGAAAAG CCTGA-3' and (reverse) 5'- CCTGTGAGGTCGTTG AGGTT-3'; and for rat and mouse TNF-α (forward)

5'-GGGGCCACCACGCTCTTCTGTC-3' and (reverse) 5'-TGGGCTACGGGCTTGTCACTCG-3'. Specific mouse primers were used for β-actin (forward) 5'-GCTCTTTC CAGCCTTCCTT-3' and (reverse) 5'- GTGCTAGGAGC CAGAGCAGT-3'; Egr-1 (forward) 5'-TAATAGCAGCAG CAGCACA-3' and (reverse) 5'- GAGTCGTTTGGCTGG GATAA-3'; IP-10 (forward) 5'-CAACTGCATCCATATC GATGAC-3' and (reverse) 5'- TTAGATTCCGGATTGAG ACATCTC-3'; MMP-9 (forward) 5'- CTTCTCTGGACGT CAAATGTG-3' and (reverse) 5'- AGAAGAATTTGCCA TGGCAG-3'; and SOCS-1 (forward) 5'-TGAGGTCTCCA GCCAGAAGT-3' and (reverse) 5'-CTGTGCCGACGAT TAAGT-3'. Primers were purchased from Roche. Optimized thermal cycling conditions were as follow: 5 min at 95°C followed by 45 cycles of 15 s at 95°C, 45 s at 59°C and 1:30 min at 72°C. Data were collected after each cycle and displayed graphically (iCycler iQTM Real-time Detection System Software, version 3.1, Bio-Rad). Melt curves were performed upon completion of the cycles to ensure that nonspecific products were absent. Quantification was performed by normalizing Ct (Cycle threshold) values with β-actin Ct and analyzed with the 2-ΔΔCT method (Livak and Schmittgen, 2001).

#### ELISA Assays

The concentration of IFN-β (VeriKine™, PBL InterferonSource, NJ) and of TNF-α (Diaclone, Bionova Cientifica, Madrid, Spain) was determined in cellular supernatants by using ELISA kits.

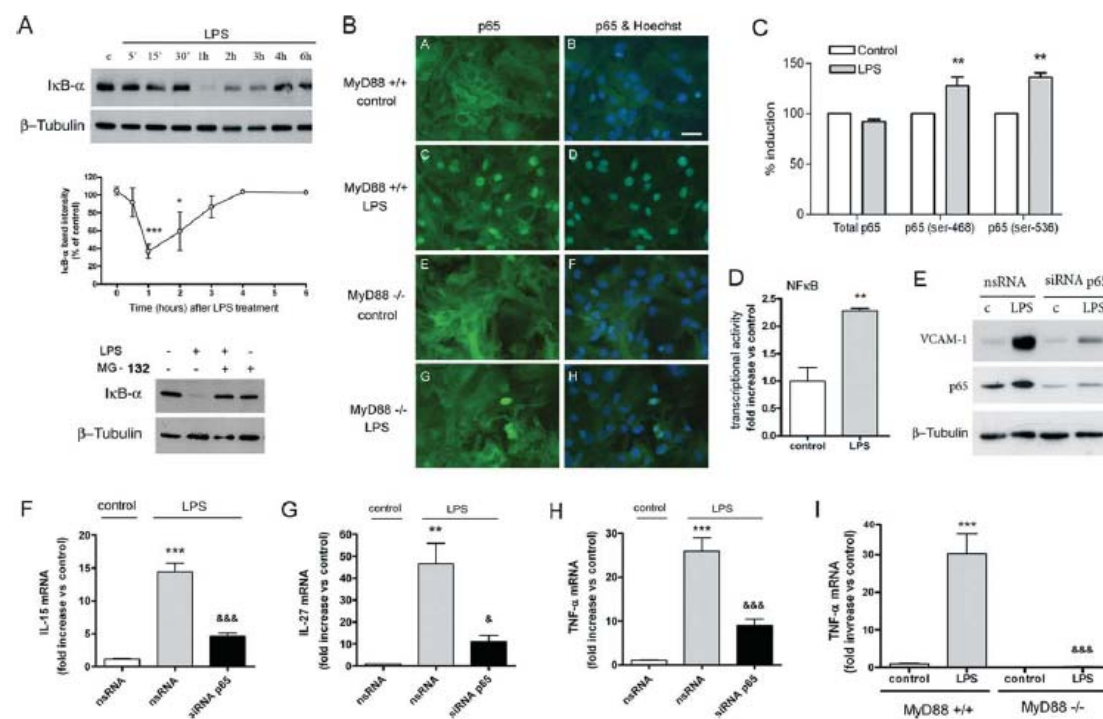
#### Fast-Activated Cell-Based p65 NFκB ELISA

Total and phospho-p65 NFκB were measured by a Fast-Activated Cell-based ELISA, FACE-ELISA (FACE™ NFκB p65 Profiler, Active Motif, CA). Briefly, astrocytes were cultured in 96-wells plate and after treatments cells were washed and fixed with 4% formaldehyde for 20 min. Then, cells were treated with quenching buffer, to suppress endogenous peroxidase activity, with blocking buffer and incubated with specific monoclonal antibodies against either total or phospho-NFκB p65 (S468 and S536) overnight at 4°C. Binding of primary antibodies to cells was detected by incubation with secondary antibody-HRP, and HRP activity was developed by hydrogen peroxide/TMB substrate. The reaction was stopped by 2N sulfuric acid and optical density was measured at 450 nm in a spectrophotometer (Labsystems iEMS Reader MF).

#### Histone Acetyltransferase (HAT) Assay

Astrocytes were exposed to LPS for 2 h in the presence or absence of the inhibitor of p38 phosphorylation SB239063 (25 μM, 30 min before LPS). Nuclear extracts were obtained using a kit (Active Motif). Nuclear protein extracts (100 μg) were used in the HAT assay that was

GLIA



**Fig. 1.** LPS induces rapid activation of NF $\kappa$ B. **A:** Time course expression of the inhibitory I $\kappa$ B- $\alpha$  subunit by Western blotting illustrates degradation after LPS treatment versus control (c). Quantification of band intensity shows maximal degradation at 1 h. Values are expressed as percentage of control and are the mean  $\pm$  SEM of  $n = 2-4$  experiments per time point, excepting 4 h and 6 h where  $n = 1$ . \*\*\* $P < 0.001$  and \* $P < 0.05$  vs. control. The proteasome inhibitor MG-132 (10  $\mu$ M) blocks I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation 1 h after LPS. **B:** Immunocytochemistry against p65 (green) and counterstaining with Hoechst (blue) to evidence the nuclei, shows nuclear translocation of the p65 NF $\kappa$ B subunit 2h after LPS (B<sub>C</sub> and B<sub>D</sub>) vs. control (B<sub>A</sub> and B<sub>B</sub>) in wt (MyD88<sup>+/+</sup>) mice. This effect of LPS was strongly abrogated in MyD88 deficient mice (MyD88<sup>-/-</sup>) (B<sub>E</sub>-B<sub>F</sub>). Bar scale = 30  $\mu$ m. **C:** Quantification of total p65 and phosphorylated p65 at ser-486 and ser-536 using fast activated cell-based ELISA assay shows that LPS enhanced p65 phosphorylations. Values are expressed as percentage of induction after 2.5-h exposure to LPS versus control and are the mean  $\pm$  SEM of  $n = 3$  per condition. \*\* $P < 0.01$  vs. control. **D:** The transcriptional activity of NF $\kappa$ B was evaluated following transfection

with a promoter-driven luciferase reporter vector containing the DNA consensus sequence for NF $\kappa$ B. LPS treatment (4 h) enhances the transcriptional activity of NF $\kappa$ B. Values are expressed as fold induction versus control and are the mean  $\pm$  SEM of  $n = 3$ . One-way Anova, \*\* $P < 0.01$  vs. control. **E:** Expression of VCAM-1 protein, as assessed by Western blotting, is induced 8h after LPS treatment in rat astrocytes, and this effect is prevented by silencing p65 expression with siRNA (siRNA p65). Nonsilencing RNA (nsRNA) is used as a treatment control. The effectiveness of siRNA against p65 is validated by examining p65 expression in the same gel.  $\beta$ -Tubulin is used to illustrate similar protein loading in each lane. Panels (F-H) show strong induction of IL-15, IL-27, and TNF- $\alpha$  mRNA 4h after LPS, and the inhibition of this effect after silencing p65 expression with siRNA in rat astrocytes. **I:** LPS does not induce TNF- $\alpha$  mRNA in cells of MyD88 KO (MyD88<sup>-/-</sup>) mice. Values in F-H were obtained by quantitative RT-PCR and are expressed as mean  $\pm$  SEM of  $n = 3-11$ . One-way Anova, LPS vs. control: \*\* $P < 0.001$  and \*\*\* $P < 0.01$ ; LPS-siRNA p65 vs. LPS-nsRNA: &&& $P < 0.001$  and & $P < 0.05$ ; MyD88<sup>-/-</sup> vs. MyD88<sup>+/+</sup>.

performed with p300/CBP immunoprecipitation-HAT Assay Kit (#17-284, Millipore, Temecula, CA). In brief, p300 was immunoprecipitated from the samples using 5  $\mu$ g of antibody (Millipore). An antibody anti-tubulin (Sigma) of the same isotype was used as a negative control. Immunocomplexes were captured by adding Protein G agarose. The agarose beads were collected and washed with ice-cold PBS followed by HAT assay buffer. Samples were incubated at 30°C for 30 min with HAT assay cocktail containing Histone H4 Peptide and AcetylCoA in the presence of 0.25mCi/ml [<sup>3</sup>H]AcetylCoA. Protein was fixed with 5% trichloroacetic acid in paper filters, and free [<sup>3</sup>H]AcetylCoA was washed out. After adding scintillation cocktail, the amount of radioactivity (dpm) bound to protein was measured in a  $\beta$ -scintillation counter (Beckman). Values are expressed as % of control.

GLIA

#### Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with one-way ANOVA followed by the Bonferroni test for multiple group comparisons, after testing for normal distribution.

### RESULTS

#### LPS Activates MyD88-Dependent NF $\kappa$ B

LPS induced early activation of NF $\kappa$ B, evidenced by proteasome-mediated degradation of the inhibitory subunit I $\kappa$ B- $\alpha$  within one hour after treatment (Fig. 1A), nuclear translocation of the NF $\kappa$ B subunits p65 (Fig. 1B) and p50 (see later an example in Fig. 2F), and p65 phosphorylation at residues ser-468 and ser-536 (Fig. 1C). We

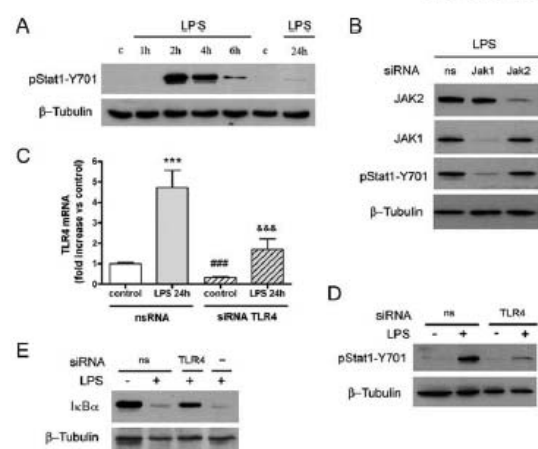


Fig. 2. LPS-induced Stat1 phosphorylation is mediated by Jak1 and downstream of TLR-4. **A:** LPS induces a delayed phosphorylation of Stat1 on tyrosine-701 (pStat1-Y701) that is only apparent at 2 h and persists for about 6 h in rat astrocytes. "c" indicates control. **B:** LPS-induced pStat1-Y701 is mediated by JAK1, not by JAK2, as demonstrated by silencing JAK1 and JAK2 expression with siRNA followed by Western blotting with specific antibodies against JAK1, JAK2 and pStat1-Y701. **C:** Expression of TLR4 mRNA after treatment with siRNA against TLR4 or nsRNA in the presence or absence of LPS (24 h) is shown to demonstrate effective reduction of TLR4 expression. Values are expressed as fold induction versus control and are the mean  $\pm$  SEM of  $n = 2-5$ . Anova analysis: \*\*\* $P < 0.001$  vs. control, ### $P < 0.001$  vs. control-nsRNA; ### $P < 0.001$  vs. LPS-nsRNA. **D,E:** Silencing TLR4 expression strongly abrogates LPS-induced pStat1-Y701, as shown by Western blotting after treatment with siRNA against TLR4 compared with control nsRNA (D), and it attenuates the degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  induced by LPS (E). The siRNA treatment is specified above the lanes. ns, treatment with non-silencing RNA as a control; -, no treatment.

then quantified the relative transcriptional activity of NF $\kappa$ B by using a basal promoter-driven luciferase reporter vector containing the DNA consensus sequence for NF $\kappa$ B after transient transfection into astrocytes. LPS increased NF $\kappa$ B-transcription from the reporter vector (firefly luciferase), relative to transcription of the basal vector (renilla luciferase), versus controls (Fig. 1D). We then verified that LPS induced the expression of NF $\kappa$ B target genes, such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (Fig. 1E), interleukin (IL)-15 (Fig. 1F), IL-27 (Fig. 1G) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Fig. 1H). The induction of these genes was dependent on NF $\kappa$ B since induction was reduced after silencing p65 expression with siRNA (Fig. 1E-H). This early NF $\kappa$ B-activation required the upstream participation of the TLR-adaptor molecule MyD88 since LPS did not cause p65 nuclear translocation (Fig. 1B) or induction of TNF- $\alpha$  mRNA expression in astrocytes lacking MyD88 (Fig. 1I).

#### Tyrosine Kinase Jak1 Is Involved in the Delayed Phosphorylation of Signal Transducer and Activator of Transcription-1 (Stat1)

Signal transducers and activators of transcription (Stat) proteins are latent transcription factors in the cytoplasm that become activated after tyrosine phospho-

rylation by members of the Janus kinase (Jak) family, and then dimerize and translocate to the nucleus where they can activate transcription (Levy and Darnell, 2002). In rat astrocytes, LPS induced tyrosine phosphorylation of Stat1 on tyrosine 701 (pStat1-Y701) (Fig. 2A), but not of Stat3 (not shown). Appearance of pStat1-Y701 was however delayed for 2 hours, and it was transient since it was strongly attenuated at 6 h. To find out the kinase involved in pStat1-Y701, we silenced gene expression with siRNA and found that it was mainly dependent on Jak1, rather than Jak2 (Fig. 2B). We also verified that pStat1-Y701 was mediated by TLR4 by silencing TLR4 expression (Fig. 2C,D). Altogether these findings show that tyrosine phosphorylation of Stat1 after LPS is downstream of TLR4 and Jak1.

After silencing TLR4 we also found that the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  induced by LPS was attenuated (Fig. 2E). These results demonstrate that LPS activated Stat1 and NF $\kappa$ B in astrocytes by acting on TLR4. However, several lines of evidence suggest that certain LPS preparations exert TLR4-independent effects by activating TLR2 (Yang et al., 1998), and this has been attributed to the presence of lipoprotein contaminants (Lee et al., 2002; Tapping et al., 2000). For comparative purposes, in several experiments we treated the astrocytes with ultrapure LPS also from E.coli (0111:B4). The latter LPS preparation induced Stat1 tyrosine-phosphorylation to a similar extent than our previous LPS (055:B5), but it caused lower expression of MyD88-dependent NF $\kappa$ B-target molecules, such as TNF- $\alpha$  and VCAM-1 (see Supp. Info. Fig. 3). This result suggests that LPS (055:B5) may activate the MyD88 pathway more than ultrapure LPS (0111:B4). Although the serotypes of these two LPS preparations are different and this might influence the signaling responses (Yang et al., 1998), we cannot fully exclude the possibility that the MyD88 pathway was activated by LPS (055:B5) more than by ultrapure LPS (0111:B4) due to the presence in the former of lipoprotein contaminants acting on TLR2, since this receptor also signals through MyD88.

#### LPS Promotes MyD88-Independent Tyrosine Phosphorylation of Stat1 Without Induction of IFN- $\beta$

In monocytes, macrophages, and dendritic cells LPS activates the MyD88-dependent pathway and also a MyD88-independent pathway mediated by recruitment of the Toll adaptors TRAM and TRIF that then activate interferon-regulatory factor 3 (IRF-3) (Fitzgerald et al., 2003; Núñez-Miguel et al., 2007). Phosphorylated IRF-3 dimerizes and translocates to the nucleus where it induces IFN- $\beta$  transcription (Hiscott et al., 1999), which promotes activation of Stat1 (Toshchakov et al., 2002). However, in astrocytes, LPS-induced phosphorylation of Stat1 on tyrosine 701 (pStat1-Y701) was not prevented by an IFN- $\beta$  neutralizing antibody, while this antibody effectively blocked the phosphorylation of Stat1 induced by treatment with recombinant IFN- $\beta$  (Fig. 3A). Likewise, silencing

GLIA

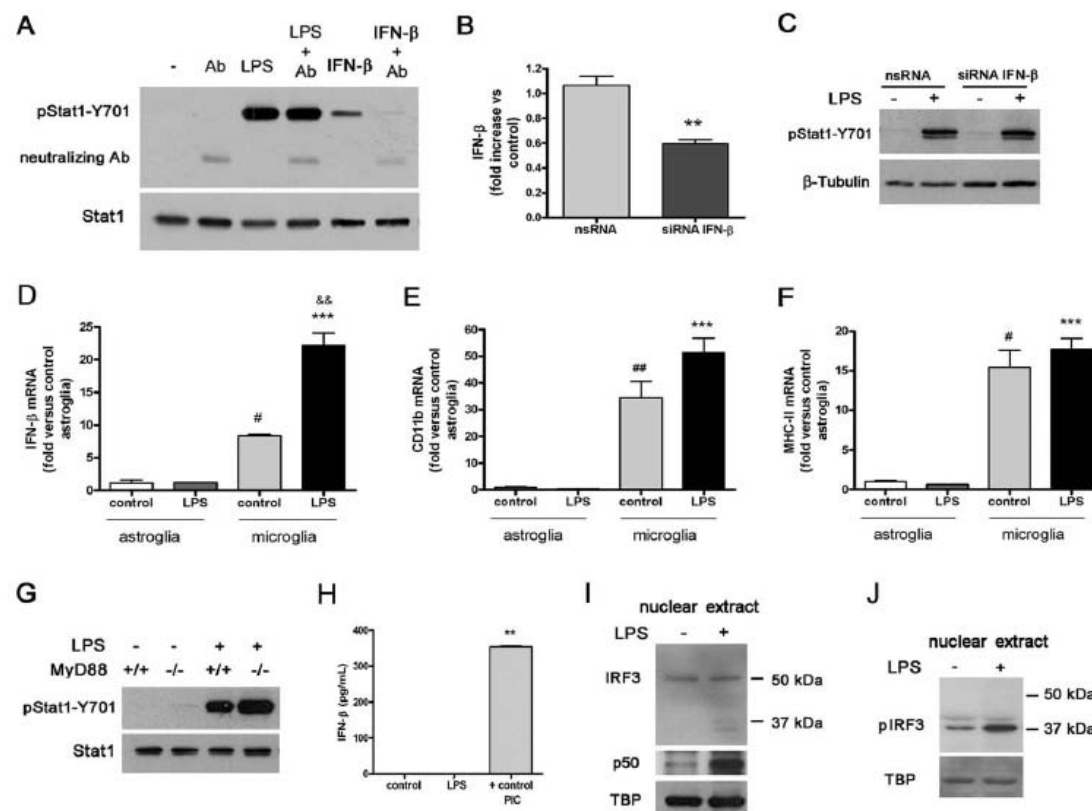


Fig. 3. LPS activates a MyD88-independent pathway in astrocytes, but does not induce IFN- $\beta$ . **A**: LPS induces tyrosine phosphorylation of Stat1 (pStat1-Y701) in rat astrocytes after 2 h. However, pStat1-Y701 is not mediated by IFN- $\beta$ , as shown by treating the cells with a neutralizing antibody (Ab) against IFN- $\beta$  (100 ng/mL). This antibody effectively prevents pStat1 induced by recombinant IFN- $\beta$  (10 ng/mL for 30 min). **B**: Silencing IFN- $\beta$  with siRNA reduces (\*\* $P$  < 0.01) the level of expression of IFN- $\beta$  mRNA, as assessed by RT-PCR, but does not prevent (C) LPS-induced pStat1-Y701 ( $n$  = 3). "nsRNA" indicates control nonsilencing RNA. Tubulin is shown as the Western blot loading control. **D**: LPS did not induce expression of IFN- $\beta$  mRNA after 4 h, while strong induction was observed in microglia. The purity of the astroglial cultures is illustrated by the negligible expression of CD11b mRNA (E) and MHCII mRNA (F) that are expressed by microglial

cells. ANOVA analysis followed by post-hoc Bonferroni test showed statistically significant differences between groups: \*\*\* $P$  < 0.001 vs. LPS astroglia; && $P$  < 0.01 vs. control microglia; # $P$  < 0.05 vs. control astroglia. **G**: LPS induces pStat1-Y701 in astrocytes from wt mice and MyD88-KO mice, demonstrating that phosphorylation of Stat1 is independent of the MyD88 pathway. Total Stat1 is shown as protein loading control for the ELISA assay was the medium of astrocytes treated with 100 ng/mL poly(I:C) (PIC) for 24 h. **I**: LPS does not induce changes in the level of expression of IRF-3 (50 kDa) in nuclear extracts ( $n$  = 3). **J**: However, LPS induces the phosphorylation of a short variant of IRF-3 (37 kDa) in nuclear extracts ( $n$  = 3). TBP is used as a protein loading control in nuclear extracts.

IFN- $\beta$  expression with siRNA (Fig. 3B) did not abrogate LPS-induced phosphorylation of Stat1 (Fig. 3C). Moreover, we did not detect induction of IFN- $\beta$  mRNA after LPS, whereas microglial cultures showed a significant increase in IFN- $\beta$  mRNA expression 4 h after LPS (Fig. 3D). To illustrate the very low contamination of microglia in the purified astroglia cultures we also show the comparative expression of the microglia markers CD11b (Fig. 3E) and MHC-II (Fig. 3F) in the astroglia and microglia cultures. These findings are in agreement with previous reports suggesting lack of activation of the MyD88-independent pathway after LPS in neutrophils (Tamassia et al., 2007), vascular endothelial

cells (Harari et al., 2006), and astrocytes (Krasowska-Zoladek et al., 2007). We therefore concluded that LPS-induced pStat1-Y701 in astrocytes was not mediated by IFN- $\beta$ . This might be due to lack of activation of the MyD88-independent IRF-3 pathway by LPS in astrocytes, as previously suggested (Krasowska-Zoladek et al., 2007). LPS-induced pStat1-Y701 was independent of MyD88, as phosphorylation also took place in astrocytes from MyD88-deficient mice (Fig. 3G). Since our previous experiments were carried out in rat astrocytes, we validated that IFN- $\beta$  was neither induced after LPS in mouse astrocytes (Fig. 3H). These findings demonstrate that LPS activated a MyD88-independent

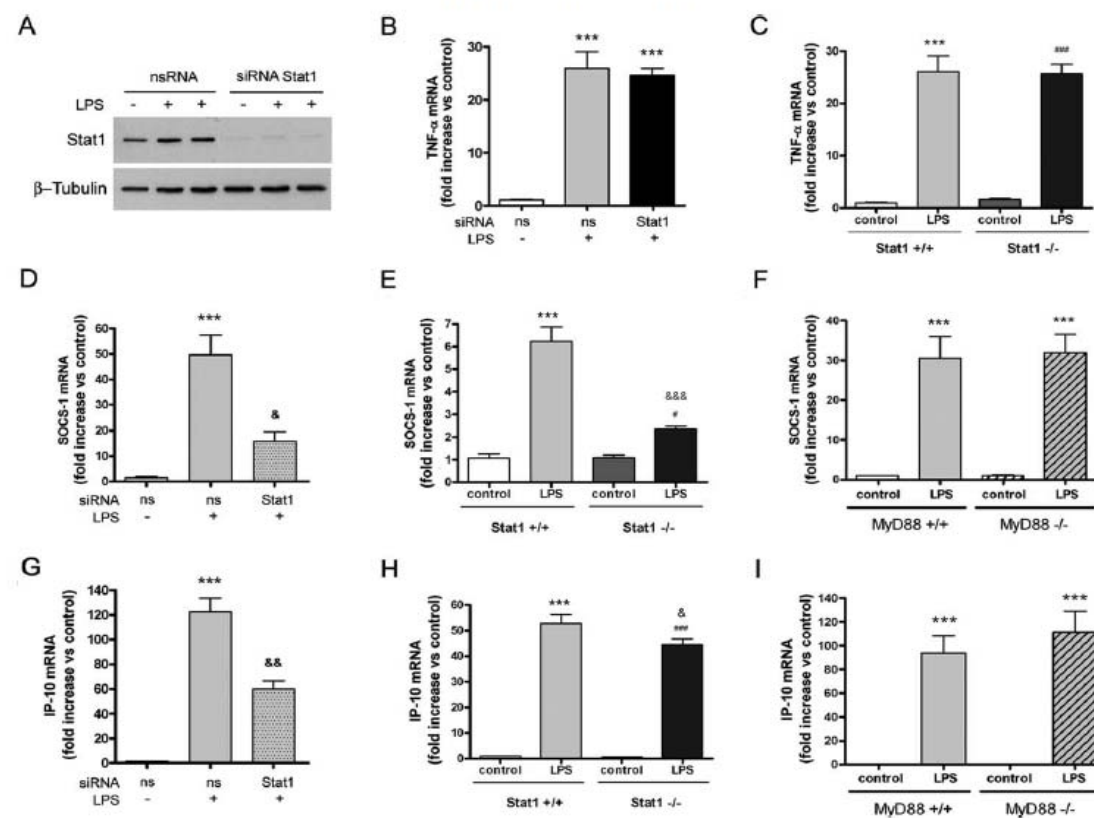


Fig. 4. Stat1 mediates gene expression after LPS. **A:** Silencing Stat1 with siRNA in rat astrocyte prevents Stat1 protein expression in the presence and in the absence of LPS. Results of protein expression were repeated in at least three independent experiments. "nsRNA" indicates control non-silencing double stranded RNA. **B,C:** Induction of TNF- $\alpha$  mRNA 4 h after LPS is not dependent on Stat1, as shown by silencing Stat1 with siRNA in rat astrocytes (B), and by studying Stat1 deficient mice (Stat1 $^{-/-}$ ) (C). **D-F:** SOCS-1 mRNA increases 4 h after LPS, but expression is reduced in rat astrocytes with silenced Stat1 (siRNA) (D), and in Stat1 KO mice (E), but not in MyD88 KO mice (F). **G-I:** LPS-induced IP-10 mRNA (4 h) is reduced in rat astrocytes treated with Stat1 siRNA (G) and it is slightly attenuated in astrocytes of Stat1 KO mice (&P < 0.05) (H), while it is not affected in astrocytes of MyD88 KO mice (I). Values are expressed as fold-induction versus control and are the mean  $\pm$  SEM of  $n = 3-8$  per condition and genotype. Anova, \*\*\*P < 0.001 vs. control; &P < 0.05, &&P < 0.01 vs nsRNA-LPS; &&&p < 0.001 vs. wt-LPS; ##P < 0.01 vs. KO control.

pathway in astrocytes that did not involve IFN- $\beta$ , thus suggesting that it was not mediated by the TRIF/IRF-3 pathway. The process of IRF-3 activation is very complex. Recent data support that IRF-3 phosphorylation on serine 386, dimerization and nuclear translocation are not invariable determinants of the transcriptional activity of IRF-3, as this can be induced even in the absence of those changes (Clément et al., 2008). In nuclear extracts, we did not observe increased nuclear translocation of IRF-3 after LPS (Fig. 3I), but we found enhanced serine-386 phosphorylation of a short form of IRF-3 (Fig. 3J). At least two isoforms of IRF-3 resulting from alternative splicing of the IRF-3 gene have been described in human HEC1B and 293 cell lines and tissues (Karpova et al., 2001), in hepatocellular carcinoma (Marozin et al., 2008), and in murine L929 cells and liver (Zhai et al., 2008). Furthermore,

several lines of evidence support that this IRF-3 variant might act as a negative regulator of the function of full length IRF-3 (Karpova et al., 2001; Zhai et al., 2008). Since the short-length variant is expressed in rat astrocytes, further studies are needed to find out their actual role in these cells. This data suggest that MyD88-independent phosphorylation of Stat1 takes place in the absence of IFN- $\beta$  production and IRF-3 activation.

#### LPS-Induced Stat1-Regulated Genes

Silencing Stat1 expression with siRNA in rat astrocytes (Fig. 4A) did not affect the transcription of typical NF $\kappa$ B target genes, such as TNF- $\alpha$  (Fig. 4B) but it reduced the LPS-induced expression of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) (Fig. 4D) and of the

GLIA

250

GORINA ET AL.

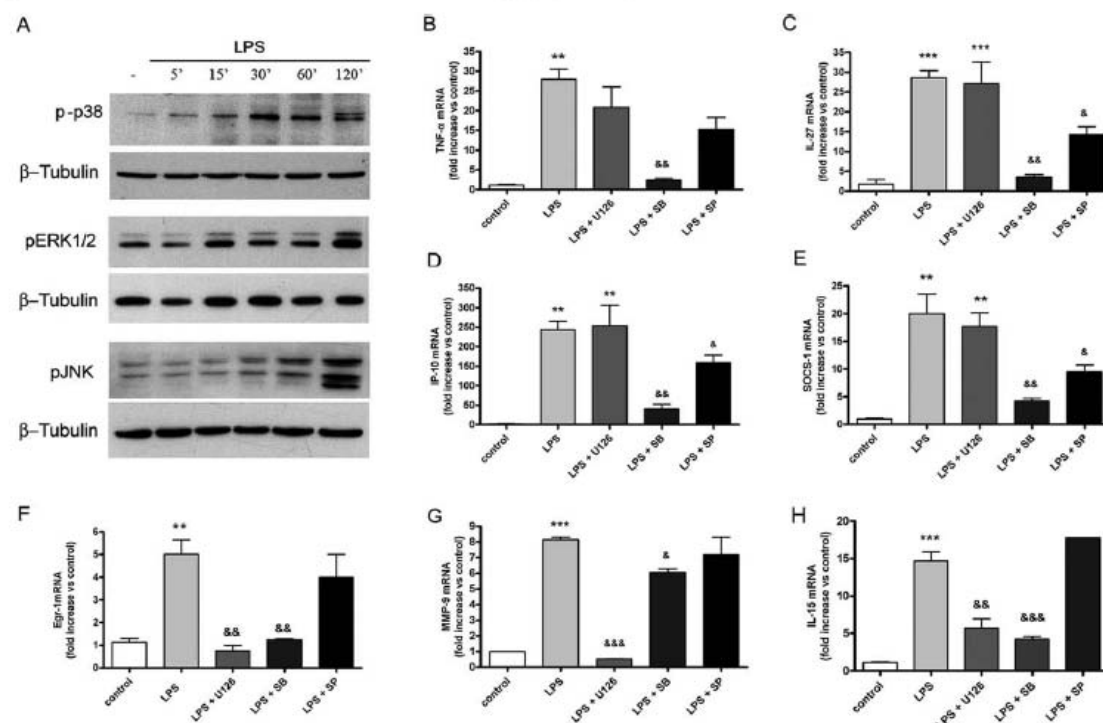


Fig. 5. MAPK modulate LPS-induced gene expression. **A:** Time-course induction of phosphorylation of p38 (p-p38), ERK1/2 (pERK1/2), and JNK (pJNK) after LPS in rat astrocytes. Time after exposure to LPS is indicated on the top of each lane.  $\beta$ -Tubulin is shown for each blot as the loading control. Results were reproduced at least three times. **B–H:** p38 MAPK inhibitor SB239063 (25  $\mu$ M), JNK inhibitor SP600125 (10  $\mu$ M), and MEK inhibitor U0126 (25  $\mu$ M) (all applied 30 min before LPS) are used to study MAPK involvement in the expression of several LPS-induced genes at 4 h of LPS treatment. p38 inhibi-

tor significantly reduces the induction of all the different genes studied here (B–H). JNK inhibitor significantly reduces the induction of Stat1-target genes, as IP-10 (D) and SOCS-1 (E), and affects the expression of IL-27 mRNA (C) and, to a lesser extent, TNF- $\alpha$  ( $P = 0.06$ ) (B). ERK1/2 inhibitor only attenuates the expression of LPS-induced Egr-1 (F), MMP-9 (G), and IL-15 (H) mRNA. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of  $n = 3$ –12 samples obtained in at least two independent experiments. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  vs. control; &#x2013; $P < 0.001$ , &#x2013; $P < 0.01$ , &#x2013; $P < 0.05$  vs. LPS.

chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10), also known as interferon-regulated protein 10 (IP-10) (Fig. 4G), demonstrating that these genes are downstream targets of Stat1. Furthermore, we verified in Stat1 KO mice that the induction of TNF- $\alpha$  after LPS was similar to that in the corresponding wt (Fig. 4C), whereas the induction of SOCS-1 was strongly reduced (Fig. 4E) and that of IP-10 was also attenuated (Fig. 4H). This suggests that SOCS-1 induction was mostly dependent on Stat1 in mice of the 129.S6.SvEv background, as it occurred in rats and in C57/B16 mice, whereas, comparatively, IP-10 induction after LPS was only partially dependent on Stat1 in the 129.S6.SvEv strain. We also noticed that the induction of these cytokines by LPS in the wt 129.S6.SvEv strain was smaller than in the wt C57/B16 mouse strain or than in rats, evidencing that the intensity of the inflammatory responses is, to some extent, strain- and species-dependent. In addition, we found that Stat1-regulated gene expression after LPS was independent of MyD88, since the induction of SOCS-1 (Fig. 4F) and IP-10 (Fig. 4I) mRNA after LPS

was not prevented in cultured astrocytes from MyD88 KO mice vs. the wt.

#### Involvement of MAPK in LPS Signaling

MAPK are involved in LPS signaling in monocytes (Guha and Mackman, 2001). We studied the time course of MAPK phosphorylation after LPS in astrocytes. Phosphorylation of p38 (Fig. 5A) was an early event already observed 5 min after LPS exposure and it was further enhanced at 30 min, while the activation of ERK1/2 and JNK was comparatively more delayed (Fig. 5A). We then examined whether MAPK were involved in LPS-mediated gene transcription in rat astrocytes. Inhibition of p38 activity with SB239063 strongly attenuated LPS-induced NF- $\kappa$ B-dependent genes TNF- $\alpha$  (Fig. 5B), IL-27 (Fig. 5C), and IL-15 (Fig. 5H), and the Stat1-dependent genes SOCS-1 (Fig. 5E) and IP-10 (Fig. 5D), as well as other genes such as early growth response-1 (Egr-1) (Fig. 5F), and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) (Fig. 5G). Inhibition of

GLIA



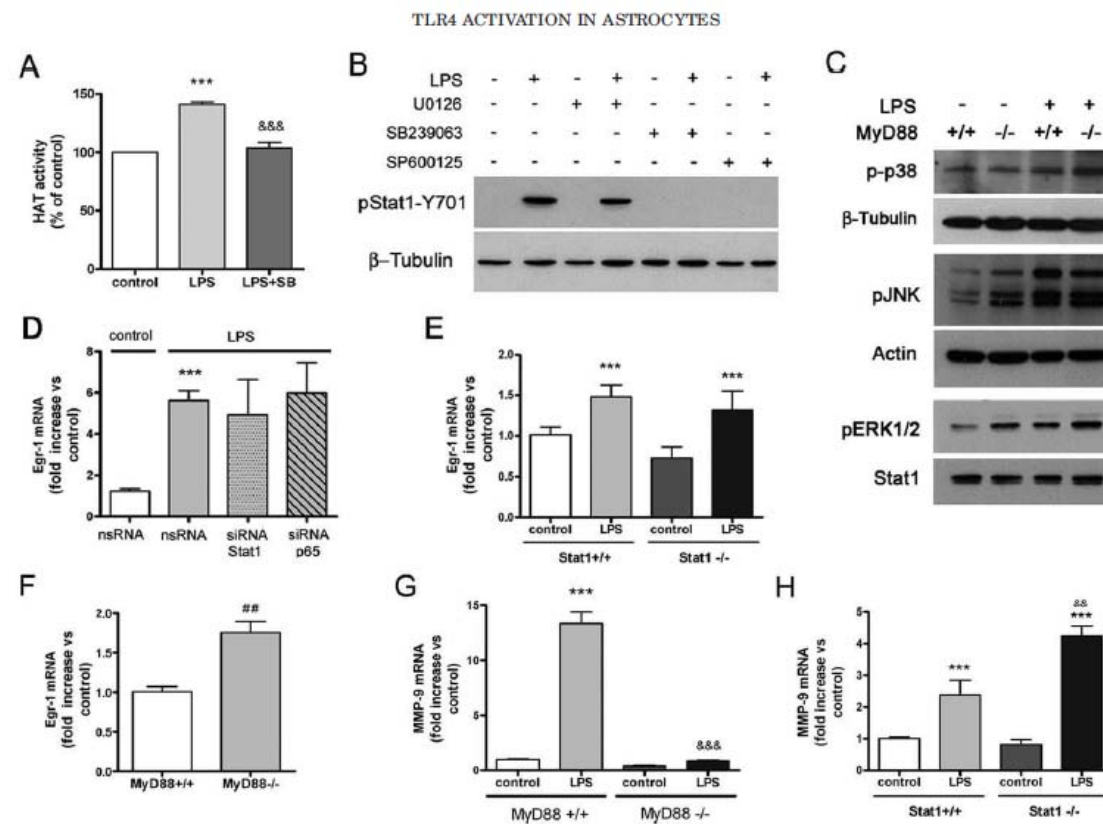


Fig. 6. Involvement of MAPK in LPS signaling. **A**: Histone acetyltransferase (HAT) activity increases after LPS and this effect is abrogated by SB239063. **B**: LPS-induced tyrosine phosphorylation of Stat1 (pStat1-Y701) at 2 h in rat astrocytes is prevented by the p38 inhibitor SB239063 (25  $\mu$ M, 30 min before LPS) and by the JNK inhibitor SP600125 (10  $\mu$ M, 30 min before LPS), but not by the MEK inhibitor U0126 (25  $\mu$ M, 30 min before LPS). **C**: Two-hour exposure to LPS increases the abundance of phosphorylated p38, JNK, and ERK1/2 versus control in MyD88 wt (MyD88<sup>+/+</sup>) and MyD88 KO (MyD88<sup>-/-</sup>) astrocytes, evidencing MAPK phosphorylation after LPS in the absence of MyD88. Total Stat1,  $\beta$ -Tubulin and actin are shown as protein loading controls. **D**: Silencing Stat1 or p65 expression with siRNA does not alter the expression of the ERK1/2 downstream gene Egr-1 induced by LPS. ns, non-silencing RNA that was used as a control. **E**: Egr-1 mRNA induced by LPS is not affected either in Stat1 KO mice versus corresponding WT. **F**: MyD88-deficient cells show higher expression of Egr-1 than corresponding wt cells. **G**: Cells deficient in MyD88 do not show induction of MMP-9 mRNA after LPS. **H**: However, the induction of MMP-9 by LPS is enhanced in Stat1-deficient cells vs. corresponding wild type, indicating a negative regulatory effect of Stat1 on MMP-9 induction. One-way ANOVA: \*\*\* $P$  < 0.001 vs. corresponding control; ### $P$  < 0.001 vs. wild type (wt); ### $P$  < 0.001 and \*\* $P$  < 0.01 vs. LPS in wt.

extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) with U0126 reduced the expression of Egr-1 (Fig. 5F), MMP-9 (Fig. 5G), and IL-15 (Fig. 5H), while it did not affect the expression of other genes. Finally, inhibition of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) with SP600125 attenuated the expression of the Stat1-regulated genes IP-10 (Fig. 5D) and SOCS-1 (Fig. 5E), and it also had some effect on the expression of IL-27 (Fig. 5C) and TNF- $\alpha$  (Fig. 5B). Overall these results underscore the important role of MAPK in regulating the expression of proinflammatory genes after LPS.

#### Crosstalk Between MAPK with NF $\kappa$ B and Jak1/Stat1 Signaling Pathways

Attenuation of LPS-induced NF $\kappa$ B-target genes in astrocytes treated with the inhibitor of p38 activity (see

above in Fig. 5B,C) might be attributable to the finding in other cellular systems that the transcriptional activity of NF $\kappa$ B requires p38 (Carter et al., 1999). The action of p38 on NF $\kappa$ B is mediated by acetyltransferase coactivator p300 (Saha et al., 2007). To test whether p300 activity was affected in our system, we obtained nuclear extracts of astrocytes under the different treatments and examined p300 histone acetyltransferase activity (HAT). LPS enhanced HAT, whereas inhibition of p38 activity with SB239063 abrogated this effect of LPS (Fig. 6A). This finding supports the view that nuclear p38-dependent acetyltransferase activity is required for the LPS-induced transcriptional activity of NF $\kappa$ B.

We then used these MAPK inhibitors to examine the involvement of MAPK in LPS-induced Stat1 activation. Inhibition of p38 and JNK pathways prevented Stat1 tyrosine phosphorylation induced by LPS (Fig. 6B),

GLIA

whereas blocking ERK1/2 did not (Fig. 6B). The fact that certain MAPK were involved in tyrosine Stat1 phosphorylation in a MyD88-independent fashion suggested that activation of MAPK should also be, at least in part, independent of MyD88. This possibility was validated by showing induction of MAPK phosphorylation by LPS in MyD88-KO astrocytes (Fig. 6C).

The above results showed the participation of p38 and JNK in LPS-induced Stat1 activation, whereas they suggested that ERK1/2 was not involved in this process. To further validate this view, we silenced the expression of Stat1 using siRNA in rat astrocytes and examined whether one of the ERK1/2 regulated genes, Egr-1 (see Fig. 5D), was affected. The induction of Egr-1 mRNA by LPS was not reduced by silencing either Stat1 or NF $\kappa$ B p65 (Fig. 6D). In agreement with this finding, LPS-induced Egr-1 mRNA expression was similarly activated in Stat1 KO mice and in the corresponding wt (Fig. 6E), supporting independence from Stat1. However, we found that MyD88-deficient astrocytes expressed higher basal levels of Egr-1 mRNA than corresponding controls (Fig. 6F), which might be associated to the higher basal levels of ERK phosphorylation in these cells (Fig. 6C). By examining the expression of another gene affected by ERK1/2, MMP-9, we found that induction of gene expression after LPS was fully dependent on MyD88 (Fig. 6G). However, Stat1-deficient cells showed higher induction of MMP-9 mRNA than corresponding wild type cells after the LPS challenge (Fig. 6H) suggesting that Stat1 exerted a negative regulatory effect on MMP-9 expression. Finally, we found that LPS-induced phosphorylation of ERK1/2 was mediated by TLR4 since it was prevented by silencing TLR4 with siRNA (Supp. Info. Fig. 3).

### DISCUSSION

The present results evidence the imbricate network of signals inducing the expression and release of proinflammatory molecules after TLR4 activation in astrocytes and underscore the powerful and complex response of these cells to innate immune triggers. We focused this study on the first hours after LPS treatment with the aim of identifying main initial molecular players. LPS promoted early, MyD88-dependent, activation of NF $\kappa$ B and induction of target genes, such as TNF- $\alpha$ . While NF $\kappa$ B activation was noticed within the first hour after LPS exposure, other events were comparatively more delayed. In particular, tyrosine phosphorylation of Stat1 did not take place until 2h after exposure of rat astrocytes to LPS, evidencing that it belonged to a secondary cascade of signaling after TLR4 activation. In monocytes/macrophages and dendritic cells (Kaisho et al., 2001; Núñez-Miguel et al., 2007; Yamamoto et al., 2003) LPS activates Stat1 by IFN- $\beta$  through a MyD88-independent pathway that is mediated by TRIF. However, in astrocytes, we did not detect induction of IFN- $\beta$  after LPS, in agreement with previous findings in neutrophils (Tamassia et al., 2007), vascular endothelial cells

(Harari et al., 2006), and astrocytes (Krasowska-Zoladek et al., 2007), suggesting cell type specific signaling responses to TLR4 activation. These latter studies also supported that the MyD88-independent pathway was not activated in those cells due to the lack of the protein adaptor TRAM. Our results agree with the view that the TRAM/TRIF/IRF-3/IFN- $\beta$  path is not activated by LPS in astrocytes, but support the involvement of a different MyD88-independent pathway leading to Stat1 activation. Stat1 tyrosine phosphorylation was mediated by Jak1, and was followed by induction of Stat1-activated genes, such as the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1), which negatively regulates cytokines by providing a negative feedback to Stat activation (Larsen and Röpke, 2002), and the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10, or IP-10), which is a chemoattractant for activated T lymphocytes, monocytes and NK cells (Farber, 1997).

LPS activated MAPK in astrocytes, as it does in monocytes (Guha and Mackman, 2001). MAPK influenced Stat1 activation since inhibition of p38 and JNK, but not ERK1/2, prevented Stat1 phosphorylation and the transcription of its target genes. In contrast, ERK1/2 was involved in the expression of a separate subset of genes, including Egr-1 and MMP-9, in a manner that appeared to be independent of Stat1. Egr-1 is an immediate-early gene product and zinc finger transcription factor involved in multiple pathological processes (Khachigian, 2006). Genes regulated by Egr-1 include transcription factors, growth factors and cytokines, and matrix proteins, amongst others (Fu et al., 2003). MMP-9 is a matrix metalloproteinase that can cause BBB damage and leukocyte recruitment to the CNS in several diseases, including multiple sclerosis (Sellebjerg and Sørensen, 2003) and stroke (Planas et al., 2001; Yang et al., 2007). Induction of MMP-9 after LPS is mediated by ERK1/2 in H9c2 cardiomyoblast cells (Cheng et al., 2009). Here we found that induction of MMP-9 by LPS was dependent on the MyD88 pathway and was positively regulated by ERK1/2, whereas Stat1 exerted a negative effect on LPS-induced MMP-9 expression. This finding suggests that Stat1 could exert a negative control on the expression of MMP-9, in agreement with a recent study showing downregulation of MMP-9 by Stat1 in B-CLL cells (Ugarte-Berzal et al., 2010). p38 influenced the expression of all the LPS-induced genes that were examined here, suggesting that it had a comparatively more upstream action. p38 is required for NF $\kappa$ B-dependent gene expression (Carter et al., 1999), since p38 controls the transcriptional activity of NF $\kappa$ B in human astrocytes by regulating p65 acetylation (Saha et al., 2007). Therefore, while p38 phosphorylation is an early target of LPS that exerts a wide regulatory action, phosphorylation of ERK1/2 and JNK are more delayed and each of them seems to be involved in the activation of separate signaling cascades. The results of the present study are schematically summarized in Fig. 7, where signal transduction and gene expression within the first hours after exposure of astrocytes to LPS are represented.

GLIA

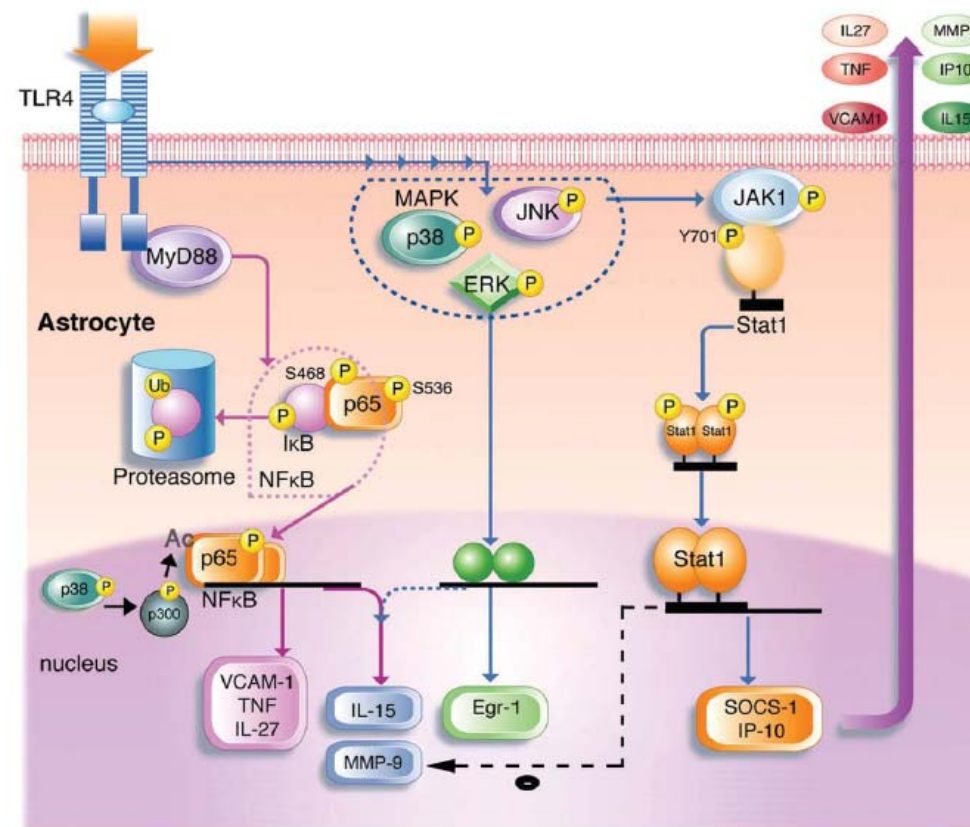


Fig. 7. Signaling pathways induced by LPS in astrocytes. LPS activates TLR-4 and induces early recruitment of MyD88 and subsequent activation of MyD88-dependent pathway leading to NF $\kappa$ B activation. NF $\kappa$ B is activated after degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ , p65 phosphorylation, and nuclear translocation of NF $\kappa$ B subunits (p65 and p50), followed by p38-dependent transcriptional activity of the NF $\kappa$ B complex and induction of target genes, such as TNF- $\alpha$ , IL-27, IL-15, MMP-9, and VCAM-1. Induction of IFN- $\beta$  is not detected in astro-

cytes, but a MyD88-independent pathway induces delayed, Jak1-mediated, tyrosine phosphorylation of Stat1, and activation of downstream genes IP-10 and SOCS-1. Tyrosine Stat1 phosphorylation is dependent on the MAPK, JNK and p38. Phosphorylation of ERK1/2 is involved in Egr-1, IL-15, and MMP-9 induction. Stat1 can exert a negative control on the expression of certain genes, such as MMP-9. MyD88-dependent paths are illustrated in purple, whereas MyD88-independent pathways (arrows) are marked in blue.

The above changes in gene expression induced through TLR4 activation in astrocytes are expected to have an impact on the surrounding environment. We found upregulation of molecules capable of inducing microglial reactivity, such as TNF- $\alpha$  (Syed et al., 2007) and IL-15 (Gómez-Nicola et al., 2010); BBB dysfunction, as MMP-9 (Yang et al., 2007), TNF- $\alpha$  (Worrall et al., 1997) and IL-15 (Pan et al., 2009); leukocyte attraction, as IP-10 (Farber, 1997) and IL-15 (Badolato et al., 1997; Wilkinson and Liew, 1995); and leukocyte adherence and infiltration, as VCAM-1 (Norman et al., 2008). IP-10 plays an important role in the recruitment of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes into the brain (Dufour et al., 2002). Then, certain up-regulated cytokines might influence specific responses in infiltrated cells. IL-15 supports basal proliferation and survival of CD8<sup>+</sup> memory T cells (Sandau et al., 2010), and dual roles of IL-15 on the

function of regulatory T cells (Treg) have been reported. Although IL-15 has the potential to promote regulatory T (Treg) cell function (Ben Ahmed et al., 2009; Xia et al., 2010), it can also have the opposite effects (Ben Ahmed et al., 2009). IL-15 can induce responses through a mechanism called trans-presentation (Stonier et al., 2010), suggesting a very local effect that depends on the cells and factors present in the surrounding microenvironment. IL-27, amongst other actions, can control autoimmune reactions and tissue inflammation by acting on CD4<sup>+</sup> cells and by inhibiting the generation of T helper (Th) 17 cells (Murugaiyan et al., 2009). Therefore, it is plausible that, by upregulating IL-27, the TLR4-activated astrocytes might not favor the development of autoimmune Th17 responses in the surrounding tissue, in agreement with the finding that TLR4-deficient mice are prone to certain autoimmune reactions (Marta et al.,

GLIA

2008, 2009). Taken altogether, these findings suggest that, after TLR4 activation, astrocytes may cause alterations on the BBB, promote inflammation, attract T lymphocytes, and modulate immune responses.

In conclusion, activation of TLR4 in astrocytes induces signaling through NF $\kappa$ B, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways, which in turn regulate the expression of a wide range of proinflammatory molecules. Despite that LPS does not appear to induce IFN- $\beta$  in astrocytes, it promotes Jak1/Stat1 activation in a MyD88-independent fashion, and we found evidence that Stat1 can negatively regulate the expression of genes induced through the MyD88 pathway. Overall, these results illustrate the imbricate network of signals triggered by TLR4 activation in astrocytes, and show that these glial cells are responsive to innate immune triggers in a cell-type specific manner and generate a proinflammatory environment that can affect the response of surrounding cells.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ms. Francisca Ruiz and Ms. Eva Roig for excellent technical assistance and we acknowledge the help of Dr. M. Glòria Sans-Fons.

#### REFERENCES

- Badolato R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T. 1997. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemoattractant protein 1 production in human monocytes. *Blood* 90:2804-2809.
- Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA Jr. 1993. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 177:57-68.
- Ben Ahmed M, Belhadj Hmida N, Moes N, Buyse S, Abdeladhim M, Louzir H, Cerf-Bennussan N. 2009. IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol* 182:6763-6770.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. 1999. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297-308.
- Carter AB, Knudtson KL, Monick MM, Hunninghake GW. 1999. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J Biol Chem* 274:30858-30863.
- Cashman JR, Ghirmai S, Abel KJ, Fiala M. 2008. Immune defects in Alzheimer's disease: New medications development. *BMC Neurosci* 9 (Suppl 2):S13.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I. 2007. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115:1599-1608.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Leza JC, Moro MA, Lizasoain I. 2008. Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke. *Stroke* 39:1314-1320.
- Cheng YC, Chen LM, Chang MH, Chen WK, Tsai FJ, Tsai CH, Lai TY, Kuo WW, Huang CY, Liu CJ. 2009. Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells. *Mol Cell Biochem* 325:15-23.
- Clément JF, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Grandvaux N, Bonnell E, Thibault P, Meloche S, Servant MJ. 2008. Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *J Virol* 82:3984-3996.
- Dong Y, Benveniste EN. 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36:180-190.
- Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. 2002. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 168:3195-3204.
- Farber JM. 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 61:246-257.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138-145.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- $\kappa$ B involves the Toll Adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198:1043-1055.
- Fu M, Zhu X, Zhang J, Liang J, Lin Y, Zhao L, Ehrenguber MU, Chen YE. 2003. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene* 315:33-41.
- Gómez-Nicola D, Valle-Argos B, Nieto-Sampedro M. 2010. Blockade of IL-15 activity inhibits microglial activation through the NF-kappaB, p38, and ERK1/2 pathways, reducing cytokine and chemokine release. *Glia* 58:264-276.
- Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA. 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55:1214-1221.
- Gorina R, Sanfeliu C, Galitó A, Messeguer A, Planas AM. 2007. Exposure of glia to pro-oxidant agents revealed selective Stat1 activation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Jak2-independent antioxidant features of the Jak2 inhibitor AG490. *Glia* 55:1313-1324.
- Gorina R, Santalucia T, Petegnief V, Ejarque-Ortiz A, Saura J, Planas AM. 2009. Astrocytes are very sensitive to develop innate immune responses to lipid-carried short interfering RNA. *Glia* 57:93-107.
- Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85-94.
- Harari OA, Alcáide P, Ahl D, Lusinskas FW, Liao JK. 2006. Absence of TRAM restricts toll-like receptor 4 signaling in vascular endothelial cells to the MyD88 pathway. *Circ Res* 98:1134-1140.
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV. 2008. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28:7231-7243.
- Hinson SR, McKeon A, Lennon VA. 2010. Neurological autoimmunity targeting aquaporin-4. *Neuroscience* 168:1009-1018.
- Hiscott J, Pitha P, Genin P, Nguyen H, Heylbroeck C, Mamane Y, Algarte M, Lin R. 1999. Triggering the interferon response: The role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* 19:1-13.
- Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 166:5688-5694.
- Karpova AY, Ronco LV, Howley PM. 2001. Functional characterization of interferon regulatory factor 3a (IRF-3a), an alternative splice isoform of IRF-3. *Mol Cell Biol* 21:4169-4176.
- Kawai T, Akira S. 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-469.
- Khachigian LM. 2006. Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ Res* 98:186-191.
- Kilic U, Kilic E, Matter CM, Bassetti CL, Hermann DM. 2008. TLR-4 deficiency protects against focal cerebral ischemia and axotomy-induced neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 31:33-40.
- Krasowska-Zoladek A, Banaszewska M, Kraszpulski M, Konat GW. 2007. Kinetics of inflammatory response of astrocytes induced by TLR3 and TLR4 ligation. *J Neurosci Res* 85:205-212.
- Larsen L, Röpke C. 2002. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* 110:833-844.
- Lee HK, Lee J, Tobias PS. 2002. Two lipoproteins extracted from *Escherichia coli* K-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major components responsible for Toll-like receptor 2-mediated signaling. *J Immunol* 168:4012-4017.
- Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 202:473-477.
- Levy DE, Darnell JE Jr. 2002. Stats: Transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:651-662.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR, the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 25:402-408.
- Marozin S, Altomonte J, Stadler F, Thasler WE, Schmid RM, Ebert O. 2008. Inhibition of the IFN-beta response in hepatocellular carcinoma by alternative spliced isoform of IFN regulatory factor-3. *Mol Ther* 16:1789-1797.
- Marta M. 2009. Toll-like receptors in multiple sclerosis mouse experimental models. *Ann NY Acad Sci* 1173:458-462.
- Marta M, Andersson A, Isaksson M, Kämpe O, Lobell A. 2008. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 38:565-575.
- Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL. 2009. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells. *J Immunol* 183:2435-2443.

GLIA

- Norman MU, James WG, Hickey MJ. 2008. Differential roles of ICAM-1 and VCAM-1 in leukocyte-endothelial cell interactions in skin and brain of MRL/lpr mice. *J Leukoc Biol* 84:68–76.
- Núñez Miguel R, Wong J, Westoll JF, Brooks HJ, O'Neill LA, Gay NJ, Bryant CE, Monie TP. 2007. A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS One* 2:e788.
- Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H. 2006. Conditional ablation of Stat3 or Soes3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med* 12:829–834.
- Pan W, Yu C, Hsueh H, Khan RS, Kastin AJ. 2009. Cerebral microvascular IL15 is a novel mediator of TNF action. *J Neurochem* 111:819–827.
- Planas AM, Solé S, Justicia C. 2001. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 8:834–846.
- Rivest S. 2009. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 9:429–439.
- Saha RN, Jana M, Pahan K. 2007. MAPK p38 regulates transcriptional activity of NF-kappaB in primary human astrocytes via acetylation of p65. *J Immunol* 179:7101–7109.
- Sandau MM, Kohlmeier JE, Woodland DL, Jameson SC. 2010. IL-15 Regulates both quantitative and qualitative features of the memory CD8 T cell pool. *J Immunol* 184:35–44.
- Sellebjerg F, Sørensen TL. 2003. Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system. *Brain Res Bull* 61:347–355.
- Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638–647.
- Stonier SW, Schluns KS. 2010. Trans-presentation: A novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol Lett* 127:85–92.
- Syed MM, Phulwani NK, Kielian T. 2007. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) regulates Toll-like receptor 2 (TLR2) expression in microglia. *J Neurochem* 103:1461–1471.
- Tamassia N, Le Moigne V, Calzetti F, Donini M, Gasperini S, Ear T, Cloutier A, Martinez FO, Fabbri M, Locati M, Mantovani A, McDonald PP, Cassatella MA. 2007. The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J Immunol* 178:7344–7356.
- Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP. 2007. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13798–13803.
- Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, Jo DG, Mughal MR, Cheng A, Siler DA, Markesbery WR, Arumugam TV, Mattson MP. 2008. Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol* 213:114–121.
- Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS. 2000. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol* 165:5780–5787.
- Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN. 2002. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 3:392–398.
- Ugarte-Berzal E, Redondo-Muñoz J, Eroles P, Del Cerro MH, Garcia-Marco JA, Terol MJ, Garcia-Pardo A. 2010. VEGF/VEGFR2 interaction down-regulates matrix metalloproteinase-9 via STAT1 activation and inhibits B chronic lymphocytic leukemia cell migration. *Blood* 115:846–849.
- van Noort JM, Bsibsi M. 2009. Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair. *Prog Brain Res* 175:139–148.
- Wilkinson PC, Liew FY. 1995. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J Exp Med* 181:1255–1259.
- Worrall NK, Chang K, LeJeune WS, Misko TP, Sullivan PM, Ferguson TB Jr, Williamson JR. 1997. TNF-alpha causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol* 273(Part 2):H2565–H2574.
- Xia J, Liu W, Hu B, Tian Z, Yang Y. 2010. IL-15 promotes regulatory T cell function and protects against diabetes development in NK-depleted NOD mice. *Clin Immunol* 134:130–139.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takoda K, Akira S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640–643.
- Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ. 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395:284–288.
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. 2007. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:697–709.
- Zhai J, Gao D, Liu W, Hong R, Qin Y, Ouyang H, Kong Y, Wang Y, Xie Y, Liu J. 2008. Characterization of a novel isoform of murine interferon regulatory factor 3. *Biochem Biophys Res Commun* 377:384–388.
- Zlokovic BV. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178–201.

## ***Annex II***

*Autophagy, and BiP level decrease are early key events in retrograde degeneration of motoneurons.*





## Autophagy, and BiP level decrease are early key events in retrograde degeneration of motoneurons

C Penas<sup>1</sup>, M Font-Nieves<sup>2</sup>, J Forés<sup>3</sup>, V Petegnief<sup>2</sup>, A Planas<sup>2</sup>, X Navarro<sup>1</sup> and C Casas<sup>1\*</sup>

Disconnection of the axon from the soma of spinal motoneurons (MNs) leads either to a retrograde degenerative process or to a regenerative reaction, depending on the severity and the proximity to the soma of the axonal lesion. The endoplasmic reticulum (ER) is a continuous membranous network that extends from the nucleus to the entire cytoplasm of the neuronal soma, axon and dendrites. We investigated whether axonal injury is sensed by the ER and triggers the activation of protective mechanisms, such as the unfolded protein response (UPR) and autophagy. We found early (at 3 days) accumulation of beclin1, LC3II and Lamp-1, hallmarks of autophagy, in both degenerating MNs after spinal root avulsion and in non-degenerating MNs after distal nerve section, although Lamp-1 disappeared by 5 days only in the former. In contrast, only degenerating MNs presented early activation of IRE1 $\alpha$ , revealed by an increase of the spliced isoform of *Xbp1* and accumulation of ATF4 in their nucleus, two branches of the UPR, and late BiP downregulation in association with cytoskeletal and organelle disorganization. We conclude that BiP decrease is a signature of the degenerating process, as its overexpression led to an increase in MN survival after root avulsion. Besides, *Bcl2* is strongly implicated in the survival pathway activated by BiP overexpression.

*Cell Death and Differentiation* advance online publication, 25 March 2011; doi:10.1038/cdd.2011.24

The mechanisms involved in degeneration and regeneration of adult spinal motoneurons (MNs) following axotomy and target deprivation are still poorly understood. Peripheral nerve injuries produce the disconnection and subsequent degeneration of the distal axon from the body of damaged neurons. The soma of axotomized neurons undergoes a series of phenotypic changes termed 'chromatolysis', which arise from dispersal of large Nissl bodies due to disintegration of stacked rough endoplasmic reticulum.<sup>1</sup> The accompanying metabolic changes are necessary for axonal regeneration, but the mechanisms involved in the neuronal reaction remain partially unknown.<sup>2</sup> However, in some instances the neuron is unable to survive the axotomy, particularly when the lesion is produced at sites near to the neuronal soma. Thus, after distal axotomy a nonsignificant loss of motoneurons has been found,<sup>3</sup> whereas lesions at the spinal root, due to traction or avulsion, in the adult lead to progressive and marked loss of the axotomized MNs.<sup>4,5</sup> There exist controversial studies about the processes that lead to this MN degeneration; some authors claimed that it is mainly an apoptotic process,<sup>4</sup> whereas others pointed to a rather necrotic death.<sup>6,7</sup> Axotomy produces an initial rupture of the plasma membrane that leads to calcium influx<sup>8</sup> and disassembly of the cytoskeleton, triggering long-lasting electrophysiological disturbances

involving the entire neuron.<sup>9</sup> Besides, axotomy interrupts retrograde axonal transport of target-derived trophic factors to the neuronal perikarya. The lack of these trophic factors in turn initiates the cell responses of neurons and surrounding glial after axotomy.<sup>10</sup>

The endoplasmic reticulum (ER) is a dynamic network of interconnected membrane tubules that essentially reaches every part of the cell, including dendrites<sup>11</sup> and axons<sup>12</sup> in neurons. ER is associated with microtubules<sup>13</sup> and largely contributes to local calcium homeostasis and signaling, and protein and lipid biosynthesis. Thus, the ER may be one of the main organelles that sense the rupture of the axon and react sending back information to the soma. Disturbances in calcium homeostasis may lead to ER stress that produces accumulation of unfolded or misfolded proteins in the ER lumen,<sup>14</sup> which takes place in several neurodegenerative events.<sup>15,16</sup> ER stress leads to the activation of self-protective mechanisms that include the ER-associated protein degradation (ERAD) pathway,<sup>17</sup> the unfolded protein response (UPR), and autophagy to avoid cell damage, although under conditions of severe ER stress, it may activate cell death programs as well.<sup>18</sup> The UPR is triggered by BiP, a reticulum-resident chaperone, when unbound from three major effectors:<sup>19</sup> the RNA-activated protein kinase-like ER kinase

<sup>1</sup>Group of Neuroplasticity and Regeneration, Institute of Neurosciences, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain; <sup>2</sup>Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institute for Biomedical Research of Barcelona (IIBB), Spanish Research Council (CSIC), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain and <sup>3</sup>Hand and Peripheral Nerve Unit, Hospital Clínic i Provincial, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

\*Corresponding author: C Casas, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Institute of Neurosciences, Unitat de Fisiologia Mèdica, Edif. M, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain. Tel: +34 935811966; Fax: +34 935812986; E-mail: Caty.Casas@uab.cat

**Keywords:** spinal root avulsion; axotomy; motoneuron; neurodegeneration; endoplasmic reticulum stress; autophagy

**Abbreviations:** ATF4, activating transcription factor 4; ATF6 $\alpha$ , activating transcription factor 6  $\alpha$ ; BAD, Bcl-2-associated death promoter; BiP, immunoglobulin heavy chain-binding protein; ChAT, choline acetyltransferase; Grp78, glucose-regulated protein; eIF2 $\alpha$ , eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated protein degradation; GADD153/CHOP, growth arrest- and DNA damage-inducible gene; GFAP, glial fibrillar acidic protein; IRE1 $\alpha$ , inositol-requiring protein-1  $\alpha$ ; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; IB4, isolectin B4; MN, motoneuron; PERK, PRK (RNA-dependent protein kinase)-like ER kinase; UPR, unfolded protein response; XBP-1, X-box binding protein-1

Received 20.5.10; revised 09.2.11; accepted 10.2.11; Edited by D Rubinsztein





2

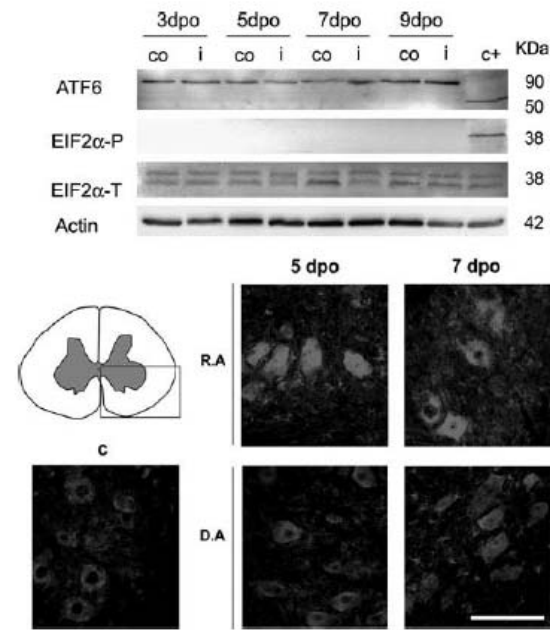
(PERK), inositol-requiring protein-1 alpha (IRE1 $\alpha$ ), and activating transcription factor-6 alpha (ATF6 $\alpha$ ).<sup>20</sup> In addition, ER stress could also induce macroautophagy (referred hereafter as autophagy) activation.<sup>21–23</sup> Autophagy is a non-stop life-sustaining renewal process that is active under normal conditions and is further enhanced in response to tissue injury. It involves the formation of double membrane cisternae, which engulf cytoplasmic materials or whole organelles to become vacuoles called autophagosomes that fuse with lysosomes for degrading its content.<sup>24</sup> During the formation of autophagosomal membranes, cytosolic microtubule-associated protein light chain 3 (LC3I) is conjugated to phosphatidylethanolamine,<sup>25</sup> to convert to a membrane bound protein, LC3-II, becoming a structural component of the double-membrane cisterns or autophagosomes. Beclin-1 is required for autophagy initiation of cytoplasmic proteins under starvation conditions. Both Beclin-1 and LC3II are considered hallmarks of autophagy initiation and propagation.<sup>26</sup> BiP is also required for stress-induced autophagy.<sup>27</sup> In cells, in which BiP expression is knocked down, despite spontaneous activation of UPR pathways and LC3 conversion, autophagy is blocked and the ER is massively expanded and disorganized.<sup>27</sup>

In this study, we aimed to investigate whether ER stress and autophagy are involved in the degeneration of MNs after spinal root avulsion, and compared this lesion with a distal nerve injury that does not produce MN degeneration.

## Results

**Degenerating motoneurons accumulate ATF4 early after root avulsion.** We investigated the presence of ER stress markers in degenerating MNs after root avulsion by analyzing which of the three branches of the UPR were activated. One branch is mediated by ATF6 $\alpha$  (90 kDa), a ER resident protein that, when unbound to BiP due to ER stress, is cleaved in the Golgi apparatus and shed a 50 kDa fragment.<sup>19</sup> We did not detect any cleavage of ATF6 $\alpha$  in the ventral horns of the L4–L5 segments in the avulsed or the axotomized spinal cords at any time tested (Figure 1). A second branch of the UPR is mediated by PERK, activation of which inhibits the translation initiation factor eIF2 $\alpha$  by phosphorylation, thereby reducing protein synthesis.<sup>19</sup> One exception is the transcription factor ATF4 that escapes from the global shut-down translation promoted by eIF2 $\alpha$  phosphorylation.<sup>20</sup> Although we did not observe the presence of phosphorylated eIF2 $\alpha$  at any time after lesion (Figure 1), we found an increase in ATF4 immunoreactivity in MNs at both sides of the ventral horn from 3 dpo, and with maximal expression at 5 dpo after root avulsion (Figure 1, bottom). In contrast, such increase was not observed after distal sciatic nerve lesion (Figure 1). To further characterize this pathway, we looked for the presence of the pro-apoptotic factor CHOP, coding gene of which is a main target of ATF4. No significant differences were detected regarding the transcript or protein levels of *Chop* in the avulsed ventral horns from 3 dpo, by quantitative real-time PCR, western blot, and immunohistochemistry (Figure 2). Besides, we did not find signs of apoptotic activation, neither caspase 12 or caspase 3

Cell Death and Differentiation

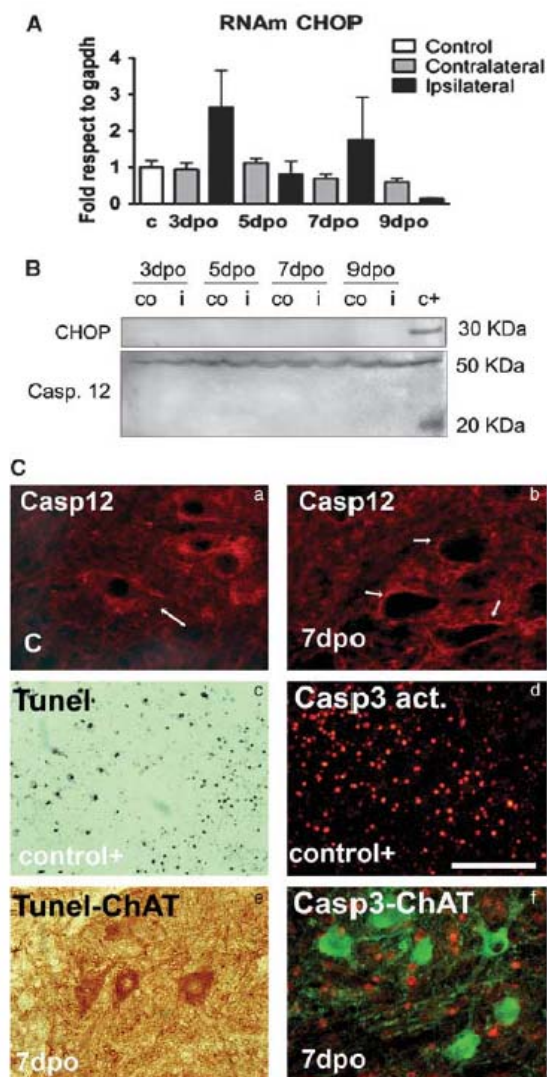


**Figure 1** Top: western blots reveal the presence of the full-length 90 kDa fragment of ATF6 $\alpha$  but absence of its cleaved product and lack of phosphorylated eIF2 $\alpha$ : referred to actin levels or total quantity of eIF2 $\alpha$ , respectively, in the ventral horns of the L4–L5 spinal cord segments either at the ipsilateral (i) and the contralateral (co) sides at 3, 5, 7, and 9 days after root avulsion. Note that we added a positive control from samples of animals submitted to spinal cord injury (c+).<sup>40</sup> Bottom: microphotographs of the ventral horn spinal cord (highlighted in the left picture) from an immunohistochemical analysis of ATF4 distribution in the spinal MNs of the ipsilateral side from control animals (c), and animals that were submitted to root avulsion (R.A) or to distal axotomy by nerve section (D.A) at 5 and 7 dpo. Note the increased immunoreactivity in the R.A model. Bar = 100  $\mu$ m

activation nor TUNEL-positive staining in MNs (Figure 2), in spite that at 7-days post avulsion there is loss of more than 25% of the MNs.<sup>5</sup>

In summary, these results showed that ATF4 protein levels differentially rose in the nucleus of degenerating *versus* non-degenerating MNs after axotomy. However, this increase did not correlate with CHOP protein accumulation and was not accompanied by signs of apoptosis in the degenerating MNs.

**IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway is differentially activated in avulsed *versus* axotomized MNs.** The third branch of the UPR is mediated through the activation of the ribonuclease activity of IRE1 $\alpha$  that generates a non-conventional processing of the transcript of *Xbp1* in the cytoplasm. Once processed, the open reading frame of *Xbp1* changes and is translated to an active form of a transcription factor (XBP1s, 50 kDa), which can bind to several UPR response elements.<sup>20</sup> The non-processed form (XBP1u) can function as a negative regulator of XBP1s.<sup>28</sup> We found an increase of XBP1s after root avulsion but an increase of XBP1u after distal nerve lesion, producing that the ratio XBP1s/XBP1u increased significantly in the root-avulsed ventral horn at



**Figure 2** (A) Histogram of mean values obtained by quantitative real-time PCR for *Chop* mRNA referred to *Gapdh* levels in the ventral horn of the spinal cord of control rats and in the ipsilateral and contralateral sides of root-avulsed rats. Samples were significantly different according to one-way ANOVA ( $P < 0.05$ ), however, *post-hoc* analysis did not show up differences between ipsilateral and contralateral or control sides. (B) Western blot analysis of CHOP protein levels and full-length (50 kDa) or cleaved fragment (25 kDa) of caspase 12 at different time points in the ipsilateral (i) and contralateral (co) ventral horns of the spinal cord of root-avulsed animals. Note that we added a positive control from samples of animals submitted to spinal cord injury (c+). (C) Microphotographs of control and avulsed ventral horns immunostained for caspase 12 (a and b), and cleaved caspase 3 (red) (d and f) alone (d) or versus Choline acetyl transferase (ChAT, green) (f) at different times post-injury in control-positive animals (d) or root-avulsed ones (e and f). Note that caspase 12 completely disappears from 7 dpo in the MNs and there is no colocalization between ChAT and cleaved caspase 3 immunostaining. TUNEL staining (black) was also performed in a positive control section of brain tissue from an excitotoxic rat model (c), and in the root-avulsed model (e) colabeled for ChAT (brown). Bar = 100  $\mu$ m.

3 dpo in comparison with the nerve distal axotomy model (Figure 3, top). The immunohistochemical analysis conducted with an anti-panXBP1 revealed that the factor was localized into the nucleus of MNs at the ipsilateral ventral horn of the spinal cord in both models from 3 dpo, and thus independently of the isoform upregulated (Figure 3, bottom).

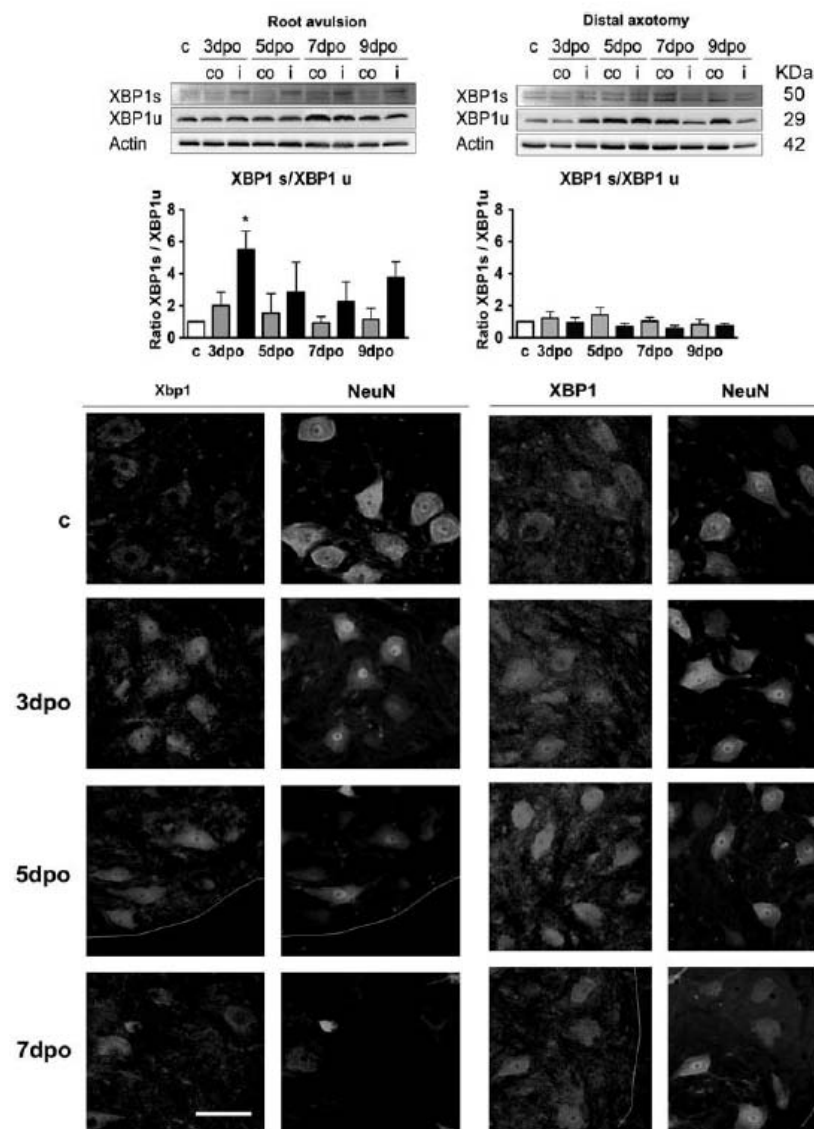
These results suggested that root avulsion produces an activation of the ribonuclease activity of IRE1 $\alpha$ , leading to an increase of XBP1s. In contrast, although XBP1u levels increase following distal axotomy/reconnection and nuclearized in MNs, there was not activation of IRE1 $\alpha$  in non-degenerating MNs.

**BiP levels are distinctly reduced in degenerating versus non-degenerating motoneurons.** We analyzed BiP levels by western blot, as they are crucial to activate the self-protecting mechanisms of UPR and autophagy.<sup>27</sup> BiP levels remained statistically unchanged after root avulsion (Figure 4a). In contrast, in the distally axotomized spinal cords, BiP protein levels increased with a maximum at 5 dpo in both sides of the ventral horn ( $3.4 \pm 0.2$  fold) (Figure 4a). By immunohistochemical analysis, we observed that in degenerating MNs, BiP presented the normal ER localization until 5 dpo, and later on it progressively disappeared as shown in Figure 4b. In contrast, in non-degenerating MNs of the distal axotomy model, BiP presented a normal localization at all time-points analyzed (Figure 4b). Therefore, it seems that there is a marked and specific difference between degenerating and non-degenerating MNs regarding BiP downregulation around 5–7 days post lesion, which is hardly detected by western blot probably because of its sustained expression in glial cells.

In addition to BiP, we analyzed the Bcl-2 family of proteins that are considered critical in the regulation of ER functions, as well as in the transmission of the apoptotic signal from the ER to the mitochondria during ER stress.<sup>29</sup> We found that Bcl-2 was transiently reduced in non-degenerating MNs around 5 dpo, but permanently reduced in degenerating MNs after root avulsion (Figure 4b).

**Degenerating MNs have disordered organelles and microtubule disassembly.** As labeling of BiP and caspase 12, two ER proteins, disappeared by 5–7 dpo, we analyzed the organelles of the secretory pathway in degenerating MNs using structural markers. Using the H69 antibody that labels a structural glycoprotein of the ER membrane,<sup>30</sup> we observed a progressive decrease in the MNs to be absent by 7 dpo (Figure 5). Similarly, we found that the Golgi apparatus labeled with either the anti-58-K-Golgi or the  $\alpha$ -giantin antibody, presented a fragmented appearance by the same time (Figure 5). In contrast, no obvious alterations were detected in MNs after distal axotomy at the same time points. Contralateral MNs after both lesions maintained the normal immunoreactivity for these markers (data not shown).

Considering that organization and movement of organelles are maintained by direct linkage to microtubules,<sup>31</sup> we investigated whether there was any abnormality on the microtubule network. As expected, microtubule-associated protein 2A/B (MAP2A/B) staining disappeared progressively,

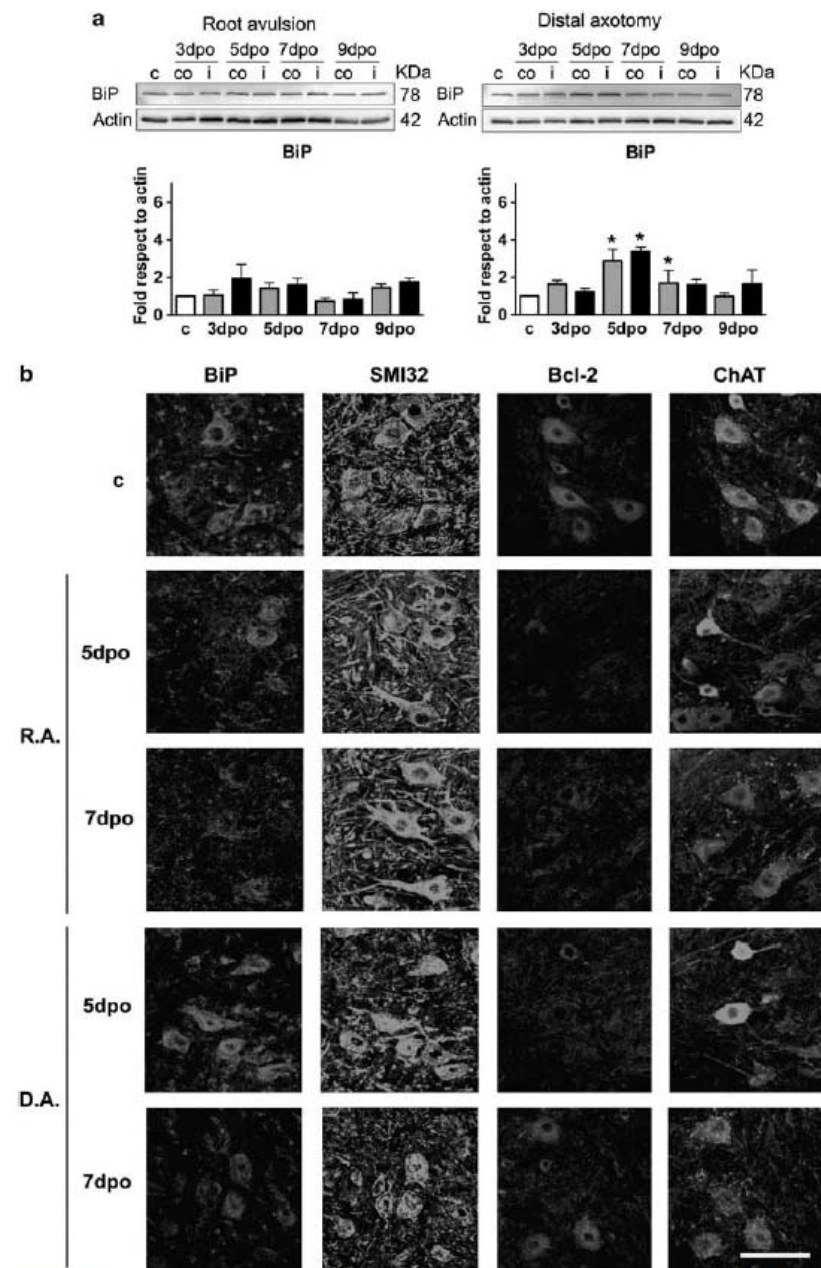


**Figure 3** Top: analysis of the presence of the spliced (XBP1s) or uncut (XBP1u) isoform of XBP1 by western blot. Histograms show the mean ratio for each isoform and referred to actin levels in ventral horns of control intact rats (c, empty bars), and of contralateral (gray bars) and ipsilateral (black bars) ventral horns of rats after root avulsion or after distal nerve axotomy. \* $P < 0.05$  Bottom: microphotographs of transverse sections of the spinal cord of control and axotomized showing the MNs at the ventral horns immunostained with anti-pan-XBP1 colocalizing with neuronal-specific immunostaining for NeuN in both models at different time points. Dotted lines separate white and gray matter at the ventral side of the spinal cord. Bar = 200  $\mu\text{m}$

being more evident in the soma of the MNs from 7dpo onwards after root avulsion (Figure 5 and data not shown). In contrast, the immunostaining of MAP2 maintained its normal aspect after distal nerve lesion. On the other hand,  $\beta$ -tubulin-III staining was unaltered in both models (Figure 5). These results showed that there is a disorganization of the endomembrane system and microtubule network in

root-avulsed MNs, whereas distally axotomized MNs do not show any organelle alteration.

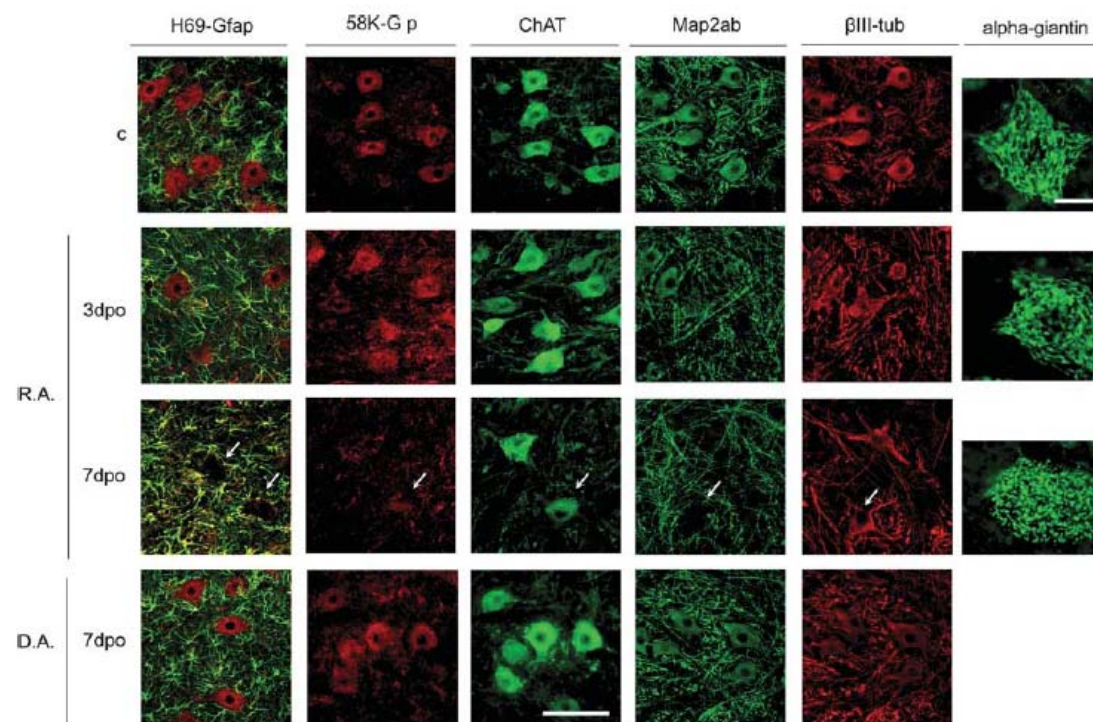
**Autophagy is activated in avulsed and axotomized MNs.** In light of these alterations in organelles and cytoskeleton and as autophagy is activated upon ER stress as a defensive mechanism for survival,<sup>32</sup> we investigated



**Figure 4** (a) Western blots and histogram showing the analysis of BiP protein levels in control animals (c), root avulsed (R.A.) and distal axotomized (D.A.) ventral horns ipsilateral (i) and contralateral (co) to the lesion. (b) Microphotographs showing immunostaining for BiP versus neurofilament (SMI32) and for Bcl2 versus ChAT in both injury models at different time points. Bar = 200  $\mu$ m. \* $P < 0.05$

whether autophagy might be implicated. For that purpose, we analyzed three markers of autophagy in spinal cord sections of control and lesioned animals: LC3, Beclin, and Lamp-1. The increase and redistribution of conjugated LC3-II was

analyzed by western Blot, and we observed a significant increase in the conversion from LC3-I to LC3-II by 3 dpo in both ipsilateral ( $6.9 \pm 1.8$  fold and  $11.7 \pm 5.6$ ) and contralateral ( $4.7 \pm 0.6$  and  $10 \pm 5.3$  fold) sides of the



**Figure 5** Microphotographs of control, root avulsed (R.A) and axotomized (D.A) MNs immunostained for an ER structural protein with the antibody H69 (red) versus GFAP-positive astrocytes (green); for a Golgi apparatus structural protein with the antibody 58 K (red) versus ChAT (green) and cytoskeletal proteins such as Map2 a/b (green) versus  $\beta$ -Tubulin III (red) at different time points. Another marker ( $\alpha$ -giardin) was used to better illustrate the fragmentation of the Golgi apparatus in the root avulsed MNs at different time points. Bar = 100  $\mu$ m for all microphotographs except for  $\alpha$ -giardin, in which bar = 40  $\mu$ m. Arrows indicate where MNs are located

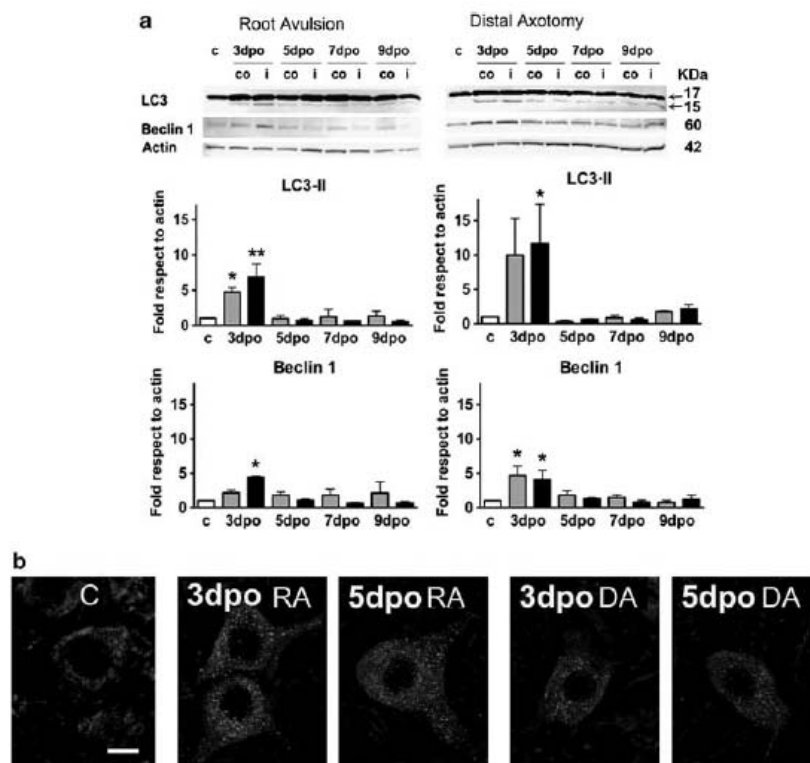
ventral horn, after root avulsion and distal axotomy, respectively (Figure 6a). Thereafter, the protein levels returned to basal levels in both types of injury. At the same time point, 3 dpo, Beclin-1 levels reached a statistically significant increase to  $4.4 \pm 0.1$  fold in ipsilateral ventral horn after root avulsion, and to  $4.1 \pm 1.3$  and  $4.7 \pm 1.3$  fold in the ipsilateral and the contralateral ventral horns after distal axotomy (Figure 6a). Confocal analysis showed that Beclin-1 presented a speckled autophagosome-like pattern of distribution in the MNs after both types of injury by 3–5 dpo (Figure 6b).

Formed autophagosomes develop into mature degradative vacuoles by progressive fusion with late endosomes and lysosomes. Therefore, we analyzed by immunohistochemistry the distribution of a 110-kDa lysosomal membrane glycoprotein (Lamp-1), which has been reported to be essential for the correct fusion with the autophagosome.<sup>33</sup> Control animals revealed a weak immunostaining for Lamp-1, indicating basal lysosomal traffic (Figure 7). At 3 days after root avulsion, the Lamp-1 immunostaining increased substantially in MNs after both types of injury. However, from 5 days onwards the lysosomal marker completely disappeared only in root-avulsed MNs (Figure 7). Contralateral MNs maintained the Lamp-1 staining observed at 3 dpo at all time points analyzed (data not shown). In contrast, in MNs

after distal axotomy, Lamp-1 immunoreactivity maintained the same earlier profile with sustained high staining from 3 dpo till 7 dpo, when it returned to basal levels (Figure 7 and data not shown). In this model, contralateral MNs had also an increased immunoreactivity for Lamp-1 at all time points analyzed. We discarded anomalies in lysosomal content by analyzing cathepsin b expression, which confirmed a normal distribution in avulsed MNs at 7 dpo (Figure 7).

These results indicated that autophagy is initiated following nerve injury independently of the distance and severity of the lesion. However, the normal autophagy outflow might be compromised in degenerating MNs in comparison with non-degenerating ones.

**BiP overexpression protect root-avulsed MNs.** Considering that BiP is a key chaperone involved in the regulation of autophagy and because of the different dynamic regulation observed in degenerating *versus* non-degenerating MNs, we promoted its overexpression using adenoviral vectors. Intratecal injection of the virus at the lumbar region resulted in infection of all neural cell types (Supplementary Figure 1), including MNs. We delivered the virus immediately after root avulsion, and followed up the animals for 3 weeks. The histological assessment showed a significant increase in the number of surviving MNs, from  $37.7 \pm 2.4$  % in the untreated to



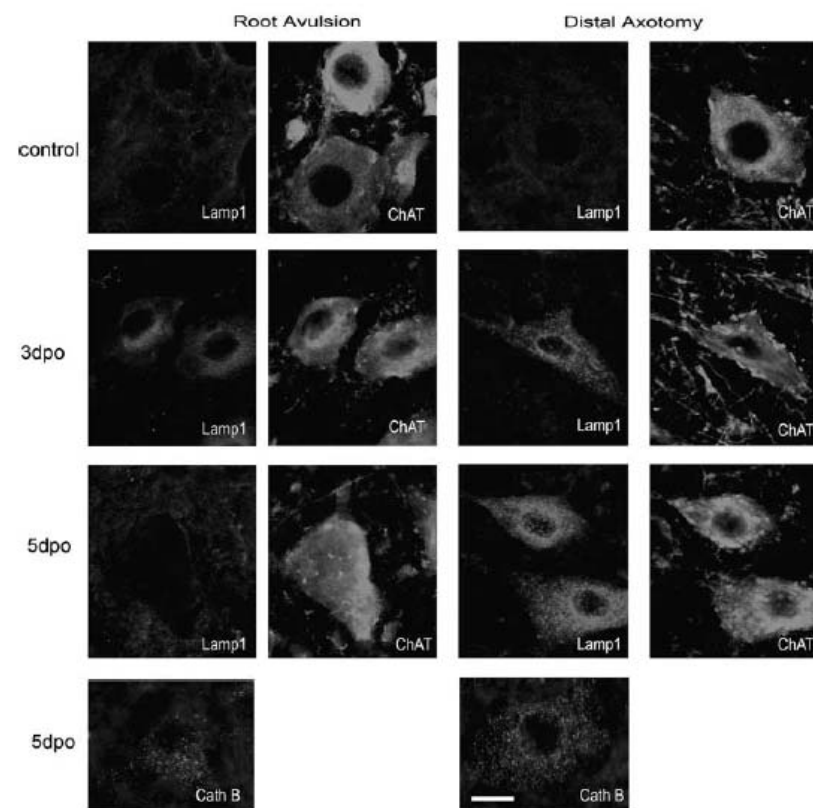
**Figure 6** (a) Western blots of LC3I (superior arrow), LC3II (inferior arrow) and Beclin-1 from L4–L5 ventral spinal cords segments of control and lesioned animals at different days post-operation (dpo), referred to actin levels in control (c), contralateral (co) and ipsilateral (i) sides. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . (b) Confocal images of the distribution of Beclin-1 in the MNs from control rats (C), the root avulsed (RA) and the distal axotomy (DA) models. Bar = 100 μm

54.7 ± 5.6 % per section in the root-avulsed rats treated with AdCMVBIP (Figure 8a). We analyzed molecular changes related to neuroprotection in samples taken at 7 dpo, when the most obvious changes in the root-avulsed MNs were observed. The expression of Bcl-2 in the avulsed MNs was restored in the BiP-overexpressing rats compared with their respective controls (Figure 8b). However, the expression of Beclin-1, Lamp-1, and MAP2A did not show differences between control and BiP-treated rats after root avulsion (data not shown). Thus, we analyzed treated and untreated rats at 3 dpo, when obvious upregulation of LC3II was observed in injured animals. In avulsed rats treated with AdCMVBIP there was an inversion in the LC3 bands with reduced formation of LC3II (Figure 8c), suggesting either lack of autophagy or a rapid dissipation due to increased autophagic flow that prevent LC3II accumulation. We also checked the corresponding increase in BiP levels. We observed higher levels, although without statistical significance in part due to the normal increase produced at 3 dpo after root avulsion, as observed in samples from rats treated with AdCMVβgal. These findings suggested that overexpression of BiP promotes survival of root-avulsed MNs and that neuroprotection may be operating through a specific function on the autophagic flow, as well as the activation of Bcl-2 pro-survival factor.

#### Discussion

We aimed to determine the molecular and cellular changes that contribute to the degeneration of MNs following spinal root avulsion. We found that root avulsion caused ER stress, revealed by an early activation of the IRE1α/Xbp1 and ATF4-mediated branches of the UPR, and initiation of autophagy, with concomitant disorganization of the cytoskeleton and organelles from the secretory pathway. In contrast, the regenerative MN reaction following distal axotomy and reconnection did not induce ER stress, and it triggered only autophagy. The GRP78/BiP protein-level reduction found specifically in MNs around 7 dpo after root avulsion seems to be one of the key events in the degenerative process, as its overexpression led to a significant increase in MN survival.

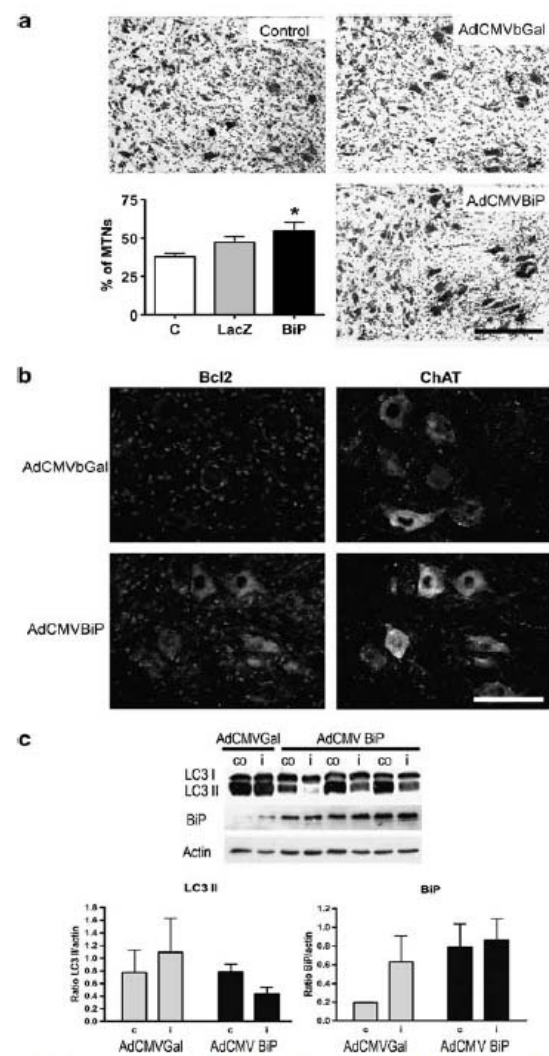
The MN reaction after axotomy is produced by retrograde signals that convey information of axon damage from the periphery to the cell body. At the very beginning, calcium homeostasis disturbances<sup>9</sup> and trophic factor withdrawal<sup>10</sup> occurs after axotomy and participate in this neuronal response. Both events had already been linked to ER stress *in vitro*.<sup>34</sup> Therefore, it was of interest to investigate the presence of ER stress after axotomy and its relationship with MN death *in vivo*. To cope with ER stress, the cell may



**Figure 7** Immunohistochemical analysis of Lamp-1 lysosomal distribution versus ChAT immunostaining in MNs from root avulsion and nerve section models at different time points. The presence of another lysosomal marker Cathepsin B was also analyzed at 5 dpo. Bar = 40  $\mu$ m

respond activating UPR and autophagic events. We have found that following root avulsion, degenerating MNs initially suffer ER stress and respond increasing the ribonuclease activity of IRE1 $\alpha$  and raising ATF4 levels. These molecular events are distinctive from MNs that do not degenerate after distal nerve lesion and are allowed to regenerate. Considering the influence of trophic factor withdrawal from proximal nerve stump for axotomized MN survival, it is possible that this might trigger UPR activation as a protective self-defense mechanism. In fact, it has been proposed that ATF4 accumulation allows the cell to survive for a longer period, following a process of slow program death in contrast to a faster apoptotic program.<sup>35</sup> This slow process culminates with severe Golgi and ER fragmentation together with cytoskeletal abnormalities in the microtubule network that were not apparent in non-degenerating MNs. Considering that prolonged UPR leads to cell death via apoptosis, we expected to find any sign in this respect but we failed what was in agreement with previous reports suggesting rather a necrosis process implicated in the MN death.<sup>6,7</sup> Thus, considering that ER stress can trigger autophagy and continued autophagy is detrimental to cell survival as a consequence of excess organelle and

macromolecular catabolism, we investigate the presence of that event. Autophagy may be triggered by a PERK-independent ATF4 accumulation that induces LC3II formation.<sup>35</sup> IRE1/Xbp1 has been also implicated in the initiation of autophagy.<sup>21</sup> In the root-avulsed model, ATF4 accumulation and IRE1/Xbp1 activation in MNs was found coincident with early LC3 II and Beclin-1 accumulation and it persisted thereafter. It was surprising to find early detection of these events also in non-degenerating MNs, in which UPR was not triggered. These results suggested that although in gross, autophagy was early activated in both cases, substantial differences make MNs to render vulnerable to cell death or not. Autophagy might be initiated likely due to the rapid activation of several calcium-dependent kinases, such as calmodulin kinase II, because of axonal membrane rupture and massive calcium influx.<sup>36</sup> Thus, autophagy may be activated as a self-defense mechanism in response to the insult. In damaged MNs, this activation may supply energy while the cell re-programs its mode to initiate axonal regeneration.<sup>5</sup> However, the autophagy process may be different depending on concomitant activation of other mechanisms, such as the UPR, to be detrimental or to



**Figure 8** (a) Representative pictures of cresyl-violet stained ipsilateral ventral horns of untreated (U) root-avulsed rats showing the reduction of MNs at 21 dpo, and the injured rats treated with either the AdCMVbGal or the AdCMVBIP viral vectors. The histogram represents the mean percentage of surviving MNs in the ipsilateral with respect to contralateral side. \* $P < 0.05$ . (b) Immunohistochemical analysis of the expression of Bcl2 in MNs labeled with anti-ChAT at 7 dpo in root-avulsed rats treated with the different vectors. Bar = 100  $\mu\text{m}$ . (c) Representative membranes of western blots for LC3I (top band), LC3II (bottom band), and BiP from L4-L5 ventral spinal cord segments of injured rats treated with either AdCMVbGal or AdCMVBIP viral vectors. Bar graph representations (bottom) of band densitometry relative to actin levels ( $n = 4$ ). C stands for contralateral and I for ipsilateral

become protective in regenerating MNs. We have found two molecular signatures that mark these differences: vanishing of Lamp-1 staining from 5-days post lesion, and a distinctive decrease of BiP levels around 7 dpo. The total absence of

Lamp-1 is unusual, and we cannot discard that may be an artefact due to changes in cell phenotype that affect antigen presentation in the immunohistochemical analysis, but it seems to be specific for Lamp-1 as cathepsin B was well present. Lamp-1 is essential for the last steps in the autophagic flow and its reduction may affect also the resolution of the protective mechanism. On the other hand, we have found that BiP level is a key event in the survival of MNs following root avulsion. It is well known that BiP has essential roles in orchestrating ER stress and managing misfolded proteins through interactions with proteasome and autophagic initiation.<sup>17,27</sup> In light of our results, it seems that raising the levels of BiP early after lesion modifies the outcome of the autophagic flow leading to promotion of survival pathways with Bcl-2 upregulation. Both events might be linked as Bcl-2 can regulate autophagy by sequestering Beclin-1 and thus, inhibiting the promotion of autophagy.<sup>37-39</sup> Therefore, the increase of Bcl-2, promoted by BiP overexpression, may decrease caspase-independent cell death<sup>39</sup> after root avulsion. Although we have not seen changes in Beclin-1 after Bcl-2 overexpression, further analyses of Bcl-2 on the autophagic flux should be conducted in order to shed light into these mechanisms. It is out of the scope of this study to decipher the detailed nature of these interactions in the context of MN degeneration, but we think that BiP-Bcl2 connection and the autophagic process deserve further study in relation to neuronal degeneration and survival after axonal damage. It may also lead to therapeutic perspectives in spinal cord trauma and MN diseases, as the root avulsion model has been proposed as non-genetic model for some neurodegenerative diseases.<sup>4</sup> In this regard, gene therapy promoting overexpression of BiP seems a promising strategy.

#### Materials and Methods

**Surgical procedures.** Sprague-Dawley female rats aged 12 weeks were kept under standard conditions of light and temperature and fed with food and water ad libitum. Surgical procedures were carried out under sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) anesthesia. For spinal root injury, an extralaminar avulsion of L4 and L5 roots was carried out as previously described.<sup>5</sup> Briefly, after a midline skin incision, the right sciatic nerve was identified and the L4-L5 spinal nerves were separated. A moderate traction was applied away from the intervertebral foramina, delivering the mixed spinal nerves that contained the motor and sensory roots and dorsal root ganglia. The left roots were kept intact. To produce distal axotomy, the right sciatic nerve was exposed at mid thigh and freed from surrounding tissues; then, the nerve was transected and immediately repaired by fascicular suture (10-0, Ethicon).<sup>3</sup> After both types of lesions, the wound was sutured by planes, disinfected with povidone iodine and the animals allowed recovering in a warm environment. Groups of rats ( $n = 4-5$ ) with root avulsion or nerve lesion and unoperated controls were used at different time intervals (1, 3, 5, 7, 10 and 21 days post operation (dpo)). All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee of our institution, and followed the European Community Council Directive 86/609/EEC.

**Construction, purification, and infection with recombinant adenoviruses.** cDNA encoding grp78 (ATCC, LGC Promochem) was cloned into the pAC.CMV shuttle vector. Recombinant adenoviruses were constructed by homologous recombination in HEK293 cells as described earlier,<sup>40</sup> and were replication deficient and included the cytomegalovirus (CMV) promoter. A control adenovirus-expressing bacterial  $\beta$ -galactosidase (AdCMV $\beta$ gal) was a kind gift of C.B. Newgard (Duke University, Durham, NC, USA). Viruses were purified using the Vivapure AdenoPackTM 20 kit according to the instructions of the manufacturer (Sartorius, Goettingen, Germany). For viral infection, immediately after root avulsion the animals were injected with 14  $\mu\text{l}$  of either AdCMVgrp78 or AdCMV $\beta$ gal viruses ( $10^8$  pfu/ml) by means of a 30-gauge needle into the thecal space at the lumbar site.



**Table 1** List of antibodies used for immunohistochemistry (IHC) and/or Western blot (WB)

Name	Host		Dilution for IHC	Dilution for WB
Cleaved casp 3 (Asp175)	Polyclonal	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA	1/20	
GRP78/BIP	Polyclonal	Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada	1/200	1/10 000
CREB2/ATF4	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA	1/50	1/200
H69	Polyclonal	Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, USA	1/100	
NeuN	Monoclonal	Chemicon, Temecula, CA, USA	1/100	
$\alpha$ -giantin	Monoclonal	kindly provided by Enrique Claro	1/1000	
58K-Golgi prot.	Polyclonal	Abcam, Cambridge, UK	1/1000	
Casp 12	Polyclonal	Sigma	1/350	
Beclin-1	Polyclonal	Abcam	1/200	1/500
Lamp-1	Polyclonal	Developmental Studies Hybridoma Bank	1/200	
ChAT	Polyclonal	Chemicon	1/75	
GFAP	Polyclonal	Dako	1/1000	
SMI32	Monoclonal	Stenberger Monoclonals, Baltimore, MD, USA	1/2500	
MAP2	Mouse	Sigma	1/500	
$\beta$ -III-tubulin	Mouse	Covance, Berkeley, CA, USA	1/100	
CC1/APC	Mouse	Abcam, Cambridge, UK	1/400	
IB4	Polyclonal	Vector, Burlingame, CA, USA	1/1000	
Bcl-2	Polyclonal	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	1/200	

At 1-minute post infusion, the needle was removed and the incision closed. Untreated animals with root avulsion were also used as controls.

**Histology and immunohistochemistry.** Control and lesioned animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) and perfused with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) at 3, 5, 7, and 10 dpo ( $n=4$  at each time post lesion). The L4 and L5 segments (5-mm total length) of the spinal cord were removed, post fixed in the same fixative for 24 h and cryopreserved in 30% sucrose. Transverse sections (20- $\mu$ m thick) were cut with a cryotome (Leica, Heidelberg, Germany). The sections were distributed in 50 series of five sections each, and each series was prepared for immunohistochemical analysis by blocking with 10% bovine serum in tris-buffered saline (TBS) for 2 days at 4°C with different primary antibodies (Table 1). After washes, sections were incubated for 1 day at 4°C with biotinylated secondary antibodies (Vector, Burlingame, CA, USA, 1:200) with Cy-2 or Cy-3 conjugated donkey anti-rabbit antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, 1:200). Slides were counterstained with DAPI (Sigma, St Louis, MO, USA, 1:1000), dehydrated and mounted with DPX (Fluka, Buchs, Switzerland). Sections from different time points of injured and control animals were processed in parallel for immunohistochemistry. Images of the ventral area of the spinal cord were taken under the same exposure time, sensibility, and resolution for each marker analyzed, with the aid of a digital camera (Olympus DP50) attached to the microscope (Olympus BX51). Confocal microscope examinations were performed with a Leica TCS SP2 AOBS laser scanning confocal system (Leica). Images were collected with a 1.4 numerical aperture oil-immersion 63 $\times$  objective. Confocal images were obtained using two separate photomultiplier channels, either concurrently or in separate runs, and were separately projected and merged using a pseudocolor display showing green for Cy2, red for Cy3, and yellow for colocalization.

Spinal cords obtained from animals at 21 dpo were cut at 40- $\mu$ m thickness. One series of five sections (separated by 200  $\mu$ m) of each mm for each spinal cord was stained with cresyl violet for MN counting as previously described.<sup>5</sup> Only cells localized in the lateral ventral horn, with diameters ranging 30–70  $\mu$ m, with a prominent nucleolus and polygonal in shape were accepted to selectively count the population of  $\alpha$ -MNs.

Spinal cord sections from animals receiving the injection of AdCMV/ $\beta$ gal virus were incubated in 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside (X-gal, 1 mg/ml final concentration from a 20 mg/ml stock solution in *N,N*-dimethyl formamide) and buffer 100 mM sodium phosphate, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM K<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 3 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> at pH 7.3 for 3 h at 37°C and mounted on slides as previously described.<sup>41</sup>

For Terminal dUTP Nick End Labeling (TUNEL) staining, tissue sections were rinsed in Tris buffer (10 mM, pH 8) and EDTA (5 mM), and then immersed in the same buffer plus proteinase K (20 g/ml) for 15 min at room temperature. After washes with EDTA, sections were incubated for 10 min in TdT buffer (Tris 30, 140 mM sodium cacodylate, 1 mM cobalt chloride, pH 7.7), and then in TdT buffer plus 0.161 U/ml TdT enzyme (Terminal Transferase, 3333566 Roche, Mannheim,

Germany) and 0.0161 nmol/ml biotin-16-dUTP (1093070, Roche) for 30 min at 37°C. The reaction was stopped with citrate buffer (300 mM sodium chloride, 30 mM sodium citrate, 5 mM EDTA). After washes, sections were incubated with HRP-conjugated streptavidin (1:400, SA5004, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and the peroxidase reaction product was visualized in a solution containing 0.02% DAB, 2.4% nickel ammonium, 0.04% chloride ammonium, 0.2% glucose D+, and 0.0027% glucose oxidase in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0). The positive controls used for TUNEL and caspase-3 immunostaining were kindly provided by Dr Bernardo Castellano and Dra. Berta Gonzalez from a well-characterized *in vivo* model of excitotoxicity in postnatal rats.<sup>42</sup>

**Protein extraction and western blot.** Rats were anesthetized and decapitated at 3, 5, 7, and 9 days for sample preparation ( $n=3$  per time point). The L4–L5 spinal cord segments were removed and divided into quarters to isolate the ventral part of each side. For protein extraction, the ipsilateral and contralateral ventral parts of L4–L5 cord segments were separately homogenized in RIPA modified buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.5% DOC Na, 0.2% SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) with 10  $\mu$ l/ml of a Protease Inhibitor Cocktail (Sigma). After clearance, protein concentration was measured by the BCA method assay (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL, USA). A measure of 20  $\mu$ g of protein were loaded from each sample in 12% SDS-polyacrylamide gels. The transfer buffer was 25 mM Trizma-base, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8.4. The primary antibodies used are summarized in Table 1. The membrane was visualized by enhanced chemiluminescence method, and the images analyzed with Gene Snap and Gene Tools softwares, and Gene Genome apparatus (Syngene, Cambridge, UK). The positive controls for ATF6, phosphorylated and total eIF2 $\alpha$ , CHOP and caspase 12 are thoracic eight (T8) samples of animals submitted to spinal cord injury (c+).<sup>43</sup>

**Statistical analysis.** All values are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical comparisons between means were made by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests. A probability of 95% was taken to indicate significant differences.

**Acknowledgements.** We thank Dr Rosa Gasa from the Department of Diabetes, IDIBAPS, Barcelona (Spain) for her technical support and advice in the preparation and use of adenoviral vectors, and Drs Berta Gonzalez and Bernardo Castellano for helpful advice on the study of TUNEL and caspase 3 activation. This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Grants SAF2006-08682, SAF2009-12495), the Ministerio de Sanidad (FIS P081932) and funds from Red de Terapia Celular (TERCEL) and from the Centro de Investigación biomédica en Red para enfermedades neurodegenerativas (CIBERNED) of Spain.

1. Nissl F. über die Veränderungen der Ganglienzellen am Facialiskern des Kaninchens nach Ausreißung der Nerven. *Allg Z Psychiatr* 1892; **48**: 197–198.

2. Hanz S, Fainzilber M. Retrograde signaling in injured nerve—the axon reaction revisited. *J Neurochem* 2006; **99**: 13–19.
3. Valero-Cabre A, Tsironis K, Skouras E, Navarro X, Neils WF. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. *J Neurotrauma* 2004; **21**: 95–108.
4. Martin LJ, Kaiser A, Price AC. Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. *J Neurobiol* 1999; **40**: 185–201.
5. Penas C, Casas C, Robert I, Fores J, Navarro X. Cytoskeletal and activity-related changes in spinal motoneurons after root avulsion. *J Neurotrauma* 2009; **26**: 763–779.
6. Li L, Houenou LJ, Wu W, Lei M, Prevette DM, Oppenheim RW. Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. *J Comp Neurol* 1996; **396**: 158–168.
7. Park OH, Lee KJ, Rhyu IJ, Geum D, Kim H, Buss R *et al.* Bax-dependent and -independent death of motoneurons after facial nerve injury in adult mice. *Eur J Neurosci* 2007; **26**: 1421–1432.
8. Ziv NE, Spira ME. Axotomy induces a transient and localized elevation of the free intracellular calcium concentration to the millimolar range. *J Neurophysiol* 1995; **74**: 2625–2637.
9. Timus MJ, Faber DS. Axotomy-induced alterations in the electrophysiological characteristics of neurons. *Prog Neurobiol* 1990; **35**: 1–51.
10. Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 1988; **336**: 123–128.
11. Spacsek J, Harris KM. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 1997; **17**: 190–203.
12. Westrum LE, Gray EG. New observations on the substructure of the active zone of brain synapses and motor endplates. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1986; **229**: 29–38.
13. Faiguin F, Ferreira A, Kosik KS, Caiores A. Kinesin-mediated organelle translocation revealed by specific cellular manipulations. *J Cell Biol* 1994; **127**: 1021–1039.
14. Fatova J, Krekac D, Hrstka R, Vojtesek B. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett* 2006; **11**: 489–505.
15. Penas C, Guzman MS, Verdu E, Fores J, Navarro X, Casas C. Spinal cord injury induces endoplasmic reticulum stress with different cell-type dependent response. *J Neurochem* 2007; **102**: 1242–1255.
16. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J* 2007; **274**: 630–658.
17. Tamura T, Cormier JH, Hebert DN. Sweet bays of ERAD. *Trends Biochem Sci* 2008; **33**: 298–300.
18. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 1004–1010.
19. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 326–332.
20. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000; **101**: 451–454.
21. Ogata M, Hino S, Saito A, Motokawa K, Kondo S, Kanemoto S *et al.* Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 9220–9231.
22. Kuroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H *et al.* ER stress (PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 230–239.
23. Ito M, Nakagawa H, Okada T, Miyazaki S, Matsuo S. ER-stress caused by accumulated intracisternal granules activates autophagy through a different signal pathway from unfolded protein response in exocrine pancreas cells of rats exposed to fluoride. *Arch Toxicol* 2009; **83**: 151–159.
24. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 211–216.
25. Sou YS, Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. Phosphatidylethanolamine in addition to phosphatidylinositol is an *in vitro* target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16. *J Biol Chem* 2006; **281**: 3017–3024.
26. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; **43**: 67–93.
27. Li J, Ni M, Lee B, Barron E, Hinton DR, Lee AS. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1460–1471.
28. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol* 2006; **172**: 565–575.
29. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; **116**: 205–219.
30. Hughes EN, August JT. Characterization of plasma membrane proteins identified by monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 1981; **256**: 664–671.
31. Waterman-Storer CM, Salmon ED. Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr Biol* 1998; **8**: 798–806.
32. Ding WX, Ni HM, Gao W, Hou YF, Melan MA, Chen X *et al.* Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* 2007; **282**: 4702–4710.
33. Binker MG, Cosen-Binker LI, Terebiznik MR, Mallo GV, McCaw SE, Eskelinen EL *et al.* Arrested maturation of Neisseria-containing phagosomes in the absence of the lysosome-associated membrane proteins, LAMP-1 and LAMP-2. *Cell Microbiol* 2007; **9**: 2153–2166.
34. Brewster JL, Linseman DA, Bouchard RJ, Loucks FA, Precht TA, Esch EA *et al.* Endoplasmic reticulum stress and trophic factor withdrawal activate distinct signaling cascades that induce glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and a caspase-9-dependent apoptosis in cerebellar granule neurons. *Mol Cell Neurosci* 2006; **32**: 242–253.
35. Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, Generali D *et al.* The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res* 2009; **69**: 4415–4423.
36. Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 2007; **82**: 163–201.
37. Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G *et al.* Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by bedin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 1998; **72**: 8586–8596.
38. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin-1-dependent autophagy. *Cell* 2005; **122**: 927–939.
39. Rashmi R, Pillai SG, Vijayalingam S, Ryerse J, Chinnadurai G. BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells. *Oncogene* 2008; **27**: 1366–1375.
40. Becker TC, Noel RJ, Coats WS, Gomez-Fox AM, Alam T, Gerard RD *et al.* Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol* 1994; **43** (Part A): 161–189.
41. Mannes AJ, Caudle RM, O'Connell BC, Iadarola MJ. Adenoviral gene transfer to spinal-cord neurons: intrathecal vs. intraparenchymal administration. *Brain Res* 1998; **793**: 1–6.
42. Acarin L, Villapol S, Faiz M, Rohn TT, Castellano B, Gonzalez B. Caspase-3 activation in astrocytes following postnatal excitotoxic damage correlates with cytoskeletal remodeling but not with cell death or proliferation. *Glia* 2007; **55**: 954–965.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)



## ***Annex III***

*Nitric oxide mediates NMDA-induced persistent inhibition of protein synthesis through dephosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and eukaryotic initiation factor 4G proteolysis.*



## Nitric oxide mediates NMDA-induced persistent inhibition of protein synthesis through dephosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and eukaryotic initiation factor 4G proteolysis

Valérie PETEGNIEF<sup>\*1</sup>, Miriam FONT-NIEVES<sup>\*</sup>, M. Elena MARTÍN<sup>†</sup>, Matilde SALINAS<sup>†</sup> and Anna M. PLANAS<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Departamento de Isquemia Cerebral y Neurodegeneración, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, Roselló 161, Barcelona 08036, Spain, and <sup>†</sup>Departamento de Bioquímica-Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar Km9, Madrid 28034, Spain

Cerebral ischaemia causes long-lasting protein synthesis inhibition that is believed to contribute to brain damage. Energy depletion promotes translation inhibition during ischaemia, and the phosphorylation of eIF (eukaryotic initiation factor) 2 $\alpha$  is involved in the translation inhibition induced by early ischaemia/reperfusion. However, the molecular mechanisms underlying prolonged translation down-regulation remain elusive. NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) excitotoxicity is also involved in ischaemic damage, as exposure to NMDA impairs translation and promotes the synthesis of NO (nitric oxide), which can also inhibit translation. In the present study, we investigated whether NO was involved in NMDA-induced protein synthesis inhibition in neurons and studied the underlying molecular mechanisms. NMDA and the NO donor DEA/NO (diethylamine–nitric oxide sodium complex) both inhibited protein synthesis and this effect persisted after a 30 min exposure. Treatments with NMDA or NO promoted calpain-dependent eIF4G cleavage and 4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1) dephosphorylation and also abolished the formation of eIF4E–eIF4G complexes; however, they did not

induce eIF2 $\alpha$  phosphorylation. Although NOS (NO synthase) inhibitors did not prevent protein synthesis inhibition during 30 min of NMDA exposure, they did abrogate the persistent inhibition of translation observed after NMDA removal. NOS inhibitors also prevented NMDA-induced eIF4G degradation, 4E-BP1 dephosphorylation, decreased eIF4E–eIF4G-binding and cell death. Although the calpain inhibitor calpeptin blocked NMDA-induced eIF4G degradation, it did not prevent 4E-BP1 dephosphorylation, which precludes eIF4E availability, and thus translation inhibition was maintained. The present study suggests that eIF4G integrity and hyperphosphorylated 4E-BP1 are needed to ensure appropriate translation in neurons. In conclusion, our data show that NO mediates NMDA-induced persistent translation inhibition and suggest that deficient eIF4F activity contributes to this process.

**Key words:** calpain, eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1), eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G), excitotoxicity, ischaemia, nitric oxide (NO).

### INTRODUCTION

Brain ischaemia induces early and deep inhibition of protein synthesis that is persistent in vulnerable neurons such as CA1 hippocampal and striatal neurons [1–3]. In this regard, long-lasting inhibition of protein synthesis is one of the alterations that best correlates with neuronal injury after ischaemia. Indeed, translation recovery is associated with survival, whereas neurons unable to overcome protein synthesis blockade are destined to die [4]. Translation is mainly inhibited via regulation of the initiation and elongation steps, by impairing the activity of certain eukaryotic initiation or elongation factors (eIFs or eEFs). Modulation of the phosphorylation status and/or degradation of these proteins accounts for their inactivation. For instance, changes in the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$ , 4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1) or eEF2 are known to modulate the rate of protein synthesis [5]. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  by PERK [double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER (endoplasmic reticulum) kinase] is sufficient to abrogate protein synthesis soon after reperfusion following an ischaemic episode [6–9]. In addition, a number of other factors are affected. For instance, depletion of ATP activates eEF2 kinase through AMPK (AMP-

activated protein kinase) in cortical neurons and slows elongation [10]. Furthermore, global cerebral ischaemia leads to eIF4G and eIF4E breakdown [11–13]. Ischaemia triggers the production of NO (nitric oxide) that is involved in inflammation and cerebral damage [14]. In addition, NO decreases protein synthesis through eIF2 $\alpha$  phosphorylation [15–17]; however, the contribution of NO to translation regulation under ischaemic conditions has not been investigated thoroughly.

Likewise, excitotoxicity is one of the main promoters of neuronal loss after an ischaemic episode, and is also known to inhibit protein synthesis [18–21]; however, the underlying mechanisms are not fully elucidated. The rise in intracellular Ca<sup>2+</sup> induced by glutamate activates eEF2 kinase, which in turn phosphorylates eEF2 and results in the transient blockade of elongation [18]. The increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration following NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) exposure activates the cysteine protease calpain [22]. eIF4G, the scaffolding protein that enables the assembly of eIF4E and eIF4A with the mRNA and the ribosomal 40 S subunit, is a substrate of calpain [13] and is thus a possible target of NMDA. However, most studies of eIF4G cleavage have reported that eIF4G is the target of caspase 3 under apoptotic conditions (reviewed in [23]). Caspase 3 cuts eIF4GI

Abbreviations used: AU, arbitrary units; DEA/NO, diethylamine–nitric oxide sodium complex; DIV, day *in vitro*; eEF, eukaryotic elongation factor; eIF, eukaryotic initiation factor; 4E-BP1, eIF4E-binding protein 1; ER, endoplasmic reticulum; FAG, fragment of apoptotic cleavage of eIF4G; LDH, lactate dehydrogenase; m<sup>7</sup>GTP, 7-methyl-GTP; MEM, minimal essential medium; mTOR, mammalian target of rapamycin; L-NAME, *N*<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NOS, nitric oxide synthase; nNOS, neuronal NOS; NPLA, *N*<sup>o</sup>-propyl-L-arginine; PERK, double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase; PI, propidium iodide; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TCA, trichloroacetic acid.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email vpetegnief@iibb.csic.es).

© The Authors. Journal compilation © 2008 Biochemical Society

at two sites to generate three fragments, referred to as FAGs (fragments of apoptotic cleavage of eIF4G), N-FAG, M-FAG and C-FAG, corresponding to the N-terminal, middle and C-terminal parts of the protein respectively (reviewed in [23]). M-FAG<sub>533–1176</sub> is the only fragment that remains able to promote some cap-dependent translation. Therefore proteolysis of eIF4G is presumably associated with the switch from cap-dependent to cap-independent translation and favours, for example, the translation of specific IRES (internal ribosome entry site)-containing mRNAs [23]. Unlike with FAG, the role of eIF4G fragments resulting from calpain activity has not been explored.

4E-BP1 is another key regulator in protein synthesis because it associates with eIF4E [24]. In cell cultures, insulin, amino acids and rapamycin modulate the phosphorylation status of 4E-BP1 through mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling [25,26]. In the hypophosphorylated form, 4E-BP1 competes with the binding site of eIF4G and sequesters eIF4E, whereas the hyperphosphorylated  $\gamma$  form dissociates from eIF4E, enabling it to engage with other components of the eIF4F complex [24,27–31]. Therefore proteolysis of eIF4G, together with dephosphorylation of 4E-BP1, precludes the formation of eIF4F complexes [32] that may decrease the cap-mRNA translation.

There is compelling evidence of cross-talk between NO and NMDA. In pure neuron cultures, uncoupling between the NMDA receptor and nNOS (neuronal NO synthase) signalling pathways [33] and pharmacological inhibition of nNOS [34] strongly prevent neuronal death after an excitotoxic challenge. Reciprocally, production of NO by iNOS (inducible NO synthase) in activated glia leads to neuronal death, which is prevented by MK-801, an NMDA receptor antagonist [35–37], thus suggesting that NO leads to glutamate release [38] in a positive-feedback loop. Furthermore, NO challenge triggers excitotoxicity in cerebellar neurons [39]. The mechanisms responsible for NO toxicity are not completely elucidated, but energy depletion is likely to be involved. NO induces a fast depolarization of the mitochondria, which leads to decreased ATP production [40]. In addition, NO exposure triggers the activation of PARP [poly(ADP-ribose) polymerase], which leads to ATP consumption and may therefore account for energy depletion [41].

In the present study, we addressed the molecular mechanisms underlying NMDA-mediated long-term inhibition of protein synthesis in neuronal cultures, and considered whether NO is involved in this process.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

All products for culture, except for MEM (minimal essential medium), were purchased from Invitrogen. ATP bioluminescence assay kit, somatic cell ATP-releasing agent, chemicals and reagents were obtained from Sigma–Aldrich, unless stated otherwise. DEA/NO (diethylamine–NO sodium complex) was purchased from Tocris. The calpain inhibitors calpeptin and MDL28170, as well as rapamycin, were from Calbiochem. The non-specific NOS inhibitor L-NAME (*N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester) and the nNOS inhibitor NPLA (*N*<sup>G</sup>-propyl-L-arginine) were purchased from Sigma–Aldrich. The mouse antibodies against eIF4E and STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) were from BD Transduction Laboratories. The goat antibodies against eIF4G (N-20) and anti-eIF2 $\alpha$  were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (Ser<sup>51</sup>) was from Epitomics, Temecula, CA, U.S.A. and mouse anti-spectrin was from Chemicon, Burlingame, CA, U.S.A. Anti-4E-BP1 antibody was obtained from Cell Signaling Technology, Danvers, MA,

U.S.A. Anti-mouse, anti-goat and anti-rabbit HRP (horseradish peroxidase)-conjugated antibodies were from GE Healthcare. Complete™ protease inhibitor cocktail and the antibody against  $\beta$ -tubulin were from Boehringer Mannheim. L-[4,5-<sup>3</sup>H]leucine (specific radioactivity = 73 Ci/mmol) and m<sup>7</sup>GTP (7-methyl-GTP)–Sepharose were purchased from GE Healthcare.

### Cell cultures and treatments

Mixed primary cortical cultures of neurons and glia were prepared from 18-day-old Sprague–Dawley rat embryos (Charles River Laboratories), as described previously [20]. Animals were anaesthetized and killed by cervical dislocation. All procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Use (CEEA) at the University of Barcelona. Neuron-enriched cultures were prepared as mixed cultures, but Ara-C (cytosine arabinoside) was added on DIV (day *in vitro*) 4 and then in the subsequent partial medium changes on DIV 7 and 10 to limit glial proliferation. Cells were seeded on 24-well plates at a density of 3680 cells/mm<sup>2</sup>. For the ATP content measurement, cells were seeded on six-well plates. All experiments were performed on 11–13 DIV cultures.

DEA/NO was prepared as a 20 mM stock in NaOH (pH 10) to avoid NO release and was stored at –20 °C until further use. A 2 mM DEA/NO solution in NaOH (pH 10) was prepared extemporaneously and added to the culture medium in order to achieve a final concentration of 4–40  $\mu$ M. Cells were exposed for 30 min to DEA/NO and medium was thereafter replaced with MEM supplemented with B27 and gentamycin. Excitotoxic lesion was performed by treating cultures for 30 min with 35  $\mu$ M NMDA. NOS inhibitors (L-NAME and NPLA) were added simultaneously with NMDA and also after medium change. Calpain inhibitors were added at 30  $\mu$ M, unless stated otherwise, 1 h before NMDA or DEA/NO and also after medium change. Thapsigargin at 1 or 10  $\mu$ M was added for 30 min and rapamycin at 1 or 2  $\mu$ M for 3 h with no previous medium change. Calpeptin, MDL28170, thapsigargin and rapamycin were dissolved in DMSO.

### Measurement of LDH (lactate dehydrogenase) activity

Cell death was estimated 24 h after the lesion by measuring the activity of LDH released into the medium as described previously [20]. Briefly, the decrease in 0.75 mM NADH absorbance at 340 nm was followed in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) in the presence of 4.2 mM pyruvic acid as substrate. The kinetic assay of NADH consumption was monitored for 4 min, and the slope values of decreased absorbance at 340 nm (negative values) were converted into positive values and expressed in arbitrary units (AU).

### PI (propidium iodide) nuclear staining

Cells were treated for 30 min with 35  $\mu$ M NMDA and then fixed and stained with PI 24 h later as described previously [20]. PI-positive nuclei were counted in three fields per well, and the sum of the three, corresponding to a total area of 0.4416 mm<sup>2</sup>, was calculated. The results were expressed as PI-positive cells/mm<sup>2</sup>.

### Incorporation of [<sup>3</sup>H]leucine into proteins

Culture medium was withdrawn, and cells were incubated in 300  $\mu$ l of MEM/B27 containing 396  $\mu$ M unlabelled leucine and 4  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]leucine for 30 min at 37 °C. NMDA or DEA/NO was added immediately after the [<sup>3</sup>H]leucine to evaluate its effect on protein synthesis at 30 min. To assess protein synthesis

2 h after transient exposure to NMDA or DEA/NO, cells were incubated with NMDA or DEA/NO for 30 min, medium was changed to MEM/B27, and, 90 min later, cells were incubated with [<sup>3</sup>H]leucine for 30 min as described above. Medium was removed, proteins were precipitated with TCA (trichloroacetic acid), and lysates were processed as described previously [20] for the determination of [<sup>3</sup>H]leucine incorporation into proteins. Results are expressed as d.p.m. in the TCA fraction/mg of protein per min.

#### Measurement of ATP levels

After drug treatments, cells were washed with cold PBS and collected in a 5 mM EDTA and 0.1 M sodium phosphate (pH 7.5) buffer. After a 5 min spin at 590 g at 4 °C, pellets were resuspended in 200  $\mu$ l of the same buffer, sonicated and centrifuged again at 10000 g for 15 min at 4 °C. ATP content was determined in the fresh supernatants using an ATP bioluminescent assay kit and following the manufacturer's instructions. Samples were run together with a 0.05–8  $\mu$ M ATP standard curve, and luminescence was monitored in an Orion microplate luminometer (Berthold Detection Systems). RLU (relative light units) were converted into pmol of ATP, and results are expressed as nmol of ATP/mg of protein.

#### Western blot

Neuron-enriched cultures were treated with NMDA, NMDA and L-NAME and NPLA, or DEA/NO for 30 min. After 90 min, cultures were washed with cold 10 mM PBS and were harvested in RIPA (radioimmunoprecipitation) lysis buffer (10 mM PBS, 1% Igepal AC-630, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% SDS) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete™) and 1 mM sodium orthovanadate. Protein content was determined using the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories). Proteins (30  $\mu$ g) were separated by electrophoresis on 7, 12 or 17% polyacrylamide gels (for spectrin-eIF4G, eIF2 $\alpha$  and 4E-BP1 respectively) under denaturing conditions and transferred on to 0.2- $\mu$ m-pore-size PVDF Immun-Blot® membranes (Bio-Rad Laboratories). Membranes were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: goat anti-eIF4G (diluted 1:500), goat anti-eIF2 $\alpha$  (diluted 1:2000), rabbit anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (Ser<sup>51</sup>) (diluted 1:2000), rabbit anti-4E-BP1 (diluted 1:2000), mouse anti-spectrin (diluted 1:4000), mouse anti-STAT3 and mouse anti-eIF4E (each diluted 1:1000). After two washes in TBST (Tris-buffered saline containing Tween 20), membranes were then incubated for 1 h at room temperature (22 °C) with horseradish-peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat antibodies. The reaction was visualized using a chemiluminescence detection system based on the luminol reaction. Autoradiograms were scanned with a GS-800 Densitometer scanner (Bio-Rad Laboratories), and band density was quantified with the Quantity One image analysis software (Bio-Rad Laboratories). For the analysis of eIF2 $\alpha$  phosphorylation, the phosphorylated/total protein ratio was calculated for each sample. Since the molecular masses of spectrin and eIF4G are 240 and 220 kDa respectively, we decided to use the 90 kDa protein STAT3 of higher molecular mass than tubulin, to check for equal loading, since none of the treatments affected STAT3 expression (results not shown). The densities of the 145–150 kDa bands corresponding to cleaved spectrin were quantified together. The spectrin/STAT3 and eIF4G/STAT3 ratios were calculated for each sample. Data from all quantifications are expressed as a percentage of controls. In the case of 4E-BP1, the proportion of each phosphorylated form ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) was calculated as a percentage of total 4E-BP1, as in [32].

#### Determination of the formation of eIF4E–eIF4G and eIF4E–eIF4E-B1 complexes

After the different treatments, cells were washed with buffer A containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.6), 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzimidazole, 120 mM KCl, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, 10  $\mu$ g/ml antipain, 50 mM sodium fluoride, 10 mM glycerophosphate and 10 mM sodium molybdate. They were then lysed with buffer A containing 0.5% Igepal AC-630 and 0.1% Triton X-100. Cell extracts were spun at 12000 g for 10 min at 4 °C, and the supernatants were collected and frozen at –80 °C until further use. Proteins (200  $\mu$ g) were incubated with m<sup>7</sup>GTP–Sepharose for 45 min at 4 °C in buffer A containing 0.1 mM GTP. Proteins were eluted from m<sup>7</sup>GTP–Sepharose with SDS loading buffer and subjected to 7.5–17% SDS/PAGE and Western blot analysis. Membranes were incubated separately with antibodies against eIF4G, eIF4E and 4E-BP1.

#### Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. for *n* replicates, as indicated in the legend to each Figure. Unless indicated, one-way ANOVA with the Bonferroni post-hoc test was performed to evaluate significant differences between groups. Kruskal–Wallis analysis followed by Dunn's test for multiple comparisons was used to compare groups with non-homogenous variance.

## RESULTS

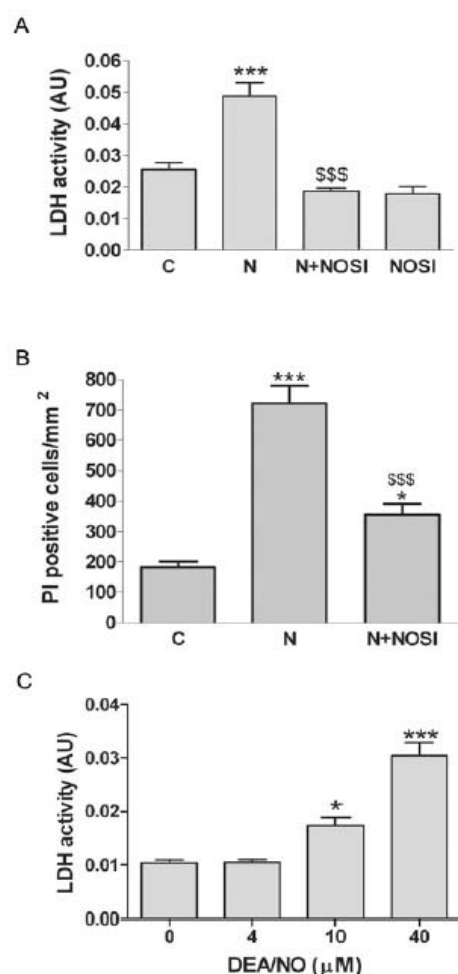
### NOS inhibitors protect against NMDA toxicity in mixed and neuron-enriched cultures

One of our objectives was to determine whether NO participates in NMDA-induced inhibition of protein synthesis in our primary cultures. First, we confirmed that NMDA toxicity was dependent on NO. When testing the effect of several NOS inhibitors, we found that the combination of the non-specific NOS inhibitor L-NAME with the specific nNOS inhibitor NPLA, at 2 mM and 100  $\mu$ M respectively, provided almost complete protection against transient (30 min) exposure to 35  $\mu$ M NMDA in mixed neuron/glia and neuron-enriched cultures, as assessed by LDH activity and PI staining assays (Figures 1A and 1B). Further experiments were therefore performed with the NAME + NPLA combination of NOS inhibitors (referred to as NOS inhibitors hereafter). Treatment with the above concentrations of NOS inhibitors did not affect neuronal viability (Figure 1A). To check for direct NO toxicity, i.e. that not induced by NMDA, we performed a dose–response study with DEA/NO, an NO donor. DEA/NO was applied for 30 min, and toxicity was assessed at 24 h. At 40  $\mu$ M, DEA/NO induced toxicity similar to that induced upon treatment with 35  $\mu$ M NMDA (Figure 1C), and this concentration of DEA/NO was therefore selected to perform further experiments.

### NMDA and NO induce protein synthesis failure

We have demonstrated previously that NMDA decreases the protein synthesis rate after 1 h of exposure [20]. In the present study, we explored whether transient exposure to NMDA caused long-lasting inhibition of protein synthesis. A time-course study showed that NMDA inhibited the incorporation of [<sup>3</sup>H]leucine into proteins after 30 min of exposure in mixed (Figure 2A) and neuron-enriched (Figure 2B) cultures by 52 and 43% respectively. After removal of NMDA, protein synthesis recovered partially, but remained significantly lower than in controls 2 h later (i.e. 90 min after NMDA removal) in both mixed (Figure 2A)

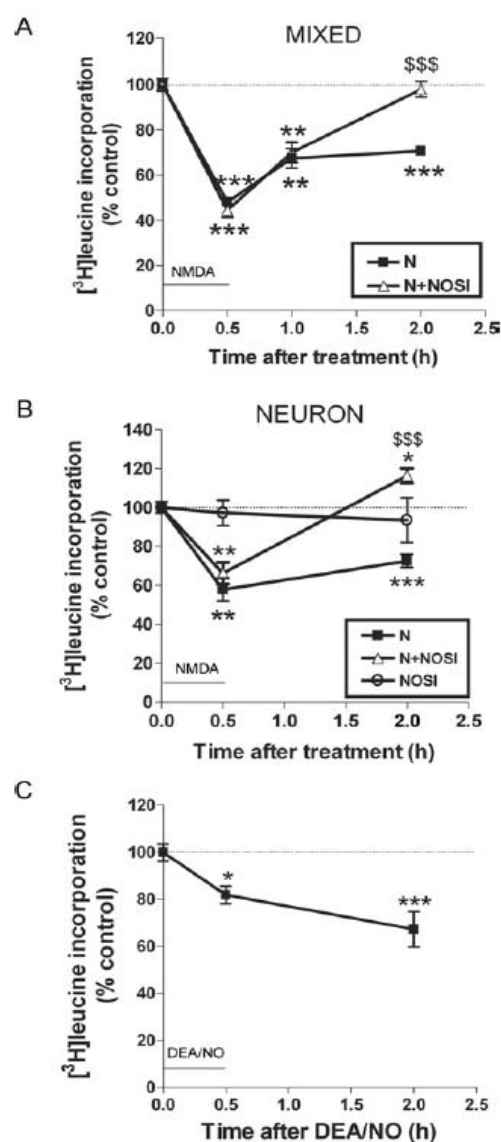




**Figure 1** Neuronal death induced by NMDA and NO

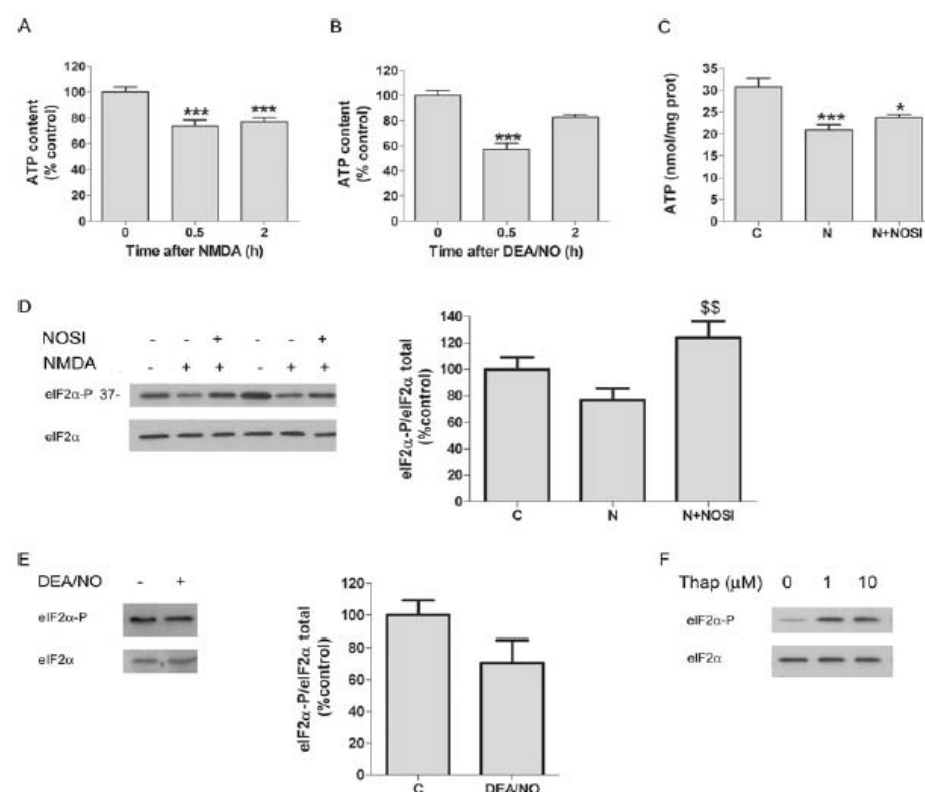
(A) Neuron-enriched cortical cultures at 11–12 DIV were co-incubated with 2 mM L-NAME plus 100 μM NPLA (NOSI) and NMDA for 30 min. Medium was then removed and replaced with fresh medium supplemented with the same concentration of NOS inhibitors. LDH activity was determined 24 h later. Results (in AU) are means ± S.E.M. for four to eight individual determinations. (B) Mixed cultures were treated with NMDA and NOSI as indicated in (A). At 24 h post-injury, cells were fixed and stained with PI. The number of PI-stained nuclei was counted under a fluorescence microscope. Results are expressed as means ± S.E.M. PI-positive neurons/mm<sup>2</sup> for six replicates per condition from two different experiments. (C) Dose-response study (4–40 μM) for DEANO toxicity in mixed cultures. LDH activity was determined in culture medium 24 h after a 30 min exposure to DEANO. Results are means ± S.E.M. for seven or eight replicates from two different experiments. \**P* < 0.05; \*\*\**P* < 0.001 compared with control cultures; \$\$\$*P* < 0.001 compared with NMDA-treated cultures. C, control; N, NMDA; NOSI, NOS inhibitors (L-NAME + NPLA).

and neuron-enriched (Figure 2B) cultures. NOS inhibitors were ineffective at 30 min (during NMDA exposure), but did promote complete recovery of protein synthesis at 2 h. Treatment with NOS inhibitors alone had no effect on protein synthesis (Figure 2B). DEANO also led to a slight decrease in protein synthesis (less than 20%) at the end of a 30 min exposure, and the effect was more pronounced 2 h later (33% decrease) in neuron-enriched cultures (Figure 2C). Altogether, these data suggest that NO



**Figure 2** Long-lasting inhibition of protein synthesis induced by NMDA and NO in cortical cultures

(A) Protein synthesis was assessed by incorporation of [<sup>3</sup>H]leucine into proteins in mixed cultures. [<sup>3</sup>H]leucine was added simultaneously with NMDA (0.5 h), 30 min (1 h) or 90 min (2 h) after a 30 min incubation with NMDA. NOS inhibitors were added immediately before NMDA and after NMDA removal. Results were calculated as d.p.m./mg of protein per min and are expressed as the percentage relative to the control (*n* = 4–16). (B) Incorporation of [<sup>3</sup>H]leucine into proteins in neuronal cultures was performed as for mixed cultures. Results are means ± S.E.M. (*n* = 4–15). (C) Protein synthesis was assessed by measuring incorporation of [<sup>3</sup>H]leucine into proteins in neuronal cultures. [<sup>3</sup>H]leucine was added simultaneously with DEANO (0.5 h) or 90 min (2 h) after a 30 min incubation with 40 μM DEANO. Results were calculated as d.p.m./mg of protein per min and are expressed as the percentage relative to the control. Results are means ± S.E.M. (*n* = 9–17). \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 compared with control cultures; \$\$\$*P* < 0.001 compared with NMDA-treated cultures. C, control; N, NMDA; NOSI, NOS inhibitors (L-NAME + NPLA). Horizontal lines represent the duration of incubation with NMDA or DEANO.



**Figure 3** Effect of NMDA and NO on ATP content and phosphorylation status of eIF2 $\alpha$

(A) Neuron-enriched cultures were incubated for 30 min with NMDA. Cells were scraped either at the end of the 30 min incubation (0.5 h) or 90 min after medium change (2 h) and processed for ATP determination. Results were calculated as nmol/mg of protein and expressed as the percentage relative to the control. Results are means  $\pm$  S.E.M. for eight to eighteen replicates. (B) Neuron-enriched cultures were treated for 30 min with DEA/NO. ATP content was determined at 0.5 or 2 h after DEA/NO as in (A). Results are means  $\pm$  S.E.M. for ten to twenty replicates from three different experiments. (C) Neuron-enriched cultures were incubated with NMDA or co-incubated for 30 min with NMDA and NOS inhibitors. Cells were scraped 90 min after medium change and processed for ATP determination as in (A). Results are means  $\pm$  S.E.M. for nine replicates for each condition from two different experiments. Neuron-enriched cultures were treated with NMDA or NMDA + NOSI (D) or with DEA/NO (E) for 30 min. After 90 min, cells were collected, proteins were separated by SDS/12% PAGE and processed for Western blotting. Membranes were incubated first with an anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P) antibody and then re-probed with the antibody recognizing eIF2 $\alpha$  independently of its phosphorylation state. The position of the 37 kDa band is indicated in (D). The right panel shows quantitative analysis of the blots. Band density was measured, the phospho-eIF2 $\alpha$ /total eIF2 $\alpha$  ratio was calculated for each sample, and results are expressed as the percentage relative to the control. Results are means  $\pm$  S.E.M. for 11–13 replicates in (D) and nine to twelve replicates in (E). \* $P$  < 0.05; \*\*\* $P$  < 0.001 compared with control cultures; \*\* $P$  < 0.01 compared with NMDA-treated cultures. Unpaired Student's  $t$  test was performed for statistical analysis in (E) and (F). Neurons were treated with thapsigargin for 30 min and phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was examined by Western blot analysis as described in (D). C, control; N, NMDA; NOSI, NOS inhibitors (L-NAME + NPLA); Thap, thapsigargin.

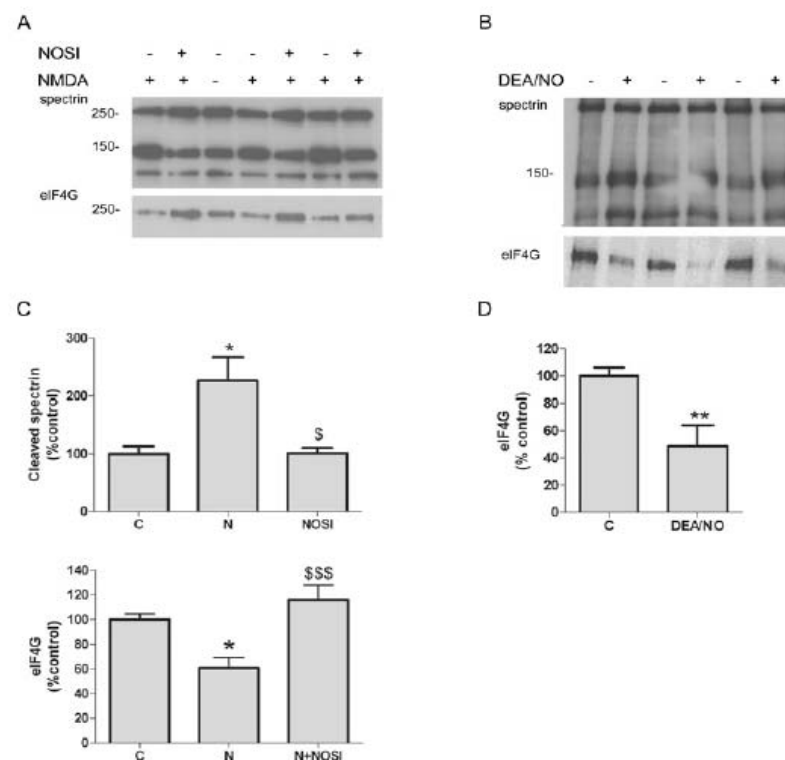
impairs translation and contributes to the late phase of protein synthesis inhibition induced by NMDA.

#### NMDA and NO induce a moderate decrease in ATP content and do not regulate the phosphorylation of eIF2 $\alpha$

ATP depletion can induce ER stress, which leads to phosphorylation of eIF2 $\alpha$  and subsequent inhibition of protein synthesis [15,42]. In the present study, we evaluated ATP content after the treatments to determine whether ATP depletion was involved in the observed inhibition of protein synthesis. NMDA caused a 26% decrease in ATP levels at the end of the 30 min exposure, and this effect was maintained 2 h later (Figure 3A). Although DEA/NO decreased ATP content to 53% after 30 min of exposure, this effect was not significantly different from controls 2 h later (Figure 3B), thus indicating that, in contrast with NMDA,

the action of NO on ATP is not long-lasting. NOS inhibitors did not prevent the ATP decrease 2 h after NMDA exposure (Figure 3C), and this illustrates that NO was not involved in the persistent ATP decrease after NMDA. Our data suggest that the late protein synthesis inhibition caused by NMDA is not mediated by the corresponding decreased ATP levels.

Phosphorylated eIF2 $\alpha$  binds to the GDP/GTP exchanger eIF2B and inhibits its function (reviewed in [30]). The inability to restore the binding of GTP to eIF2 prevents the formation of new eIF2·GTP·Met-tRNA<sub>i</sub> (initiator methionine tRNA) ternary complexes and consequently protein synthesis is inhibited. NMDA and NO did not induce eIF2 $\alpha$  phosphorylation on Ser<sup>51</sup> (Figures 3D and 3E), indicating that eIF2 activity was not inhibited. In order to determine whether our cultures might show increased phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , neurons were treated for 30 min with thapsigargin. This ER stress inducer is known to cause



**Figure 4**  $\alpha$ -Spectrin and eIF4G cleavage after NMDA and NO treatment

(A) NMDA leads to the proteolysis of  $\alpha$ -spectrin and eIF4G. Neuron cultures were exposed to NMDA or NMDA + NOS inhibitors (NOSI) for 30 min as in Figure 3(D). Proteins were separated by SDS/7% PAGE and processed for eIF4G immunoblotting. Membranes were then re-probed with an antibody recognizing  $\alpha$ -spectrin. NMDA treatment induced a loss of eIF4G (lower blot) and of full-length  $\alpha$ -spectrin and the generation of the 150 kDa spectrin fragment, but not of the 120 kDa product (lowest band, upper blot). NOS inhibitors impeded spectrin and eIF4G proteolysis. (B) Neuronal cultures were exposed for 30 min to DEA/NO as in Figure 3(E). Proteins were processed for eIF4G and  $\alpha$ -spectrin Western blot analysis as in (A). DEA/NO triggered calpain-mediated breakdown of spectrin (upper blot) and eIF4G (lower blot). Blots are representative of two different experiments. (C) Quantitative analysis of cleaved spectrin (upper panel) and eIF4G (lower panel). Cells were treated as in (A). Results were calculated as AU and expressed as the percentage relative to the control. Results are means  $\pm$  S.E.M. for four to six replicates for spectrin and eight to thirteen replicates for eIF4G. (D) Quantitative analysis of cleaved eIF4G after DEA/NO treatment. Cells were treated as in (B). Results are means  $\pm$  S.E.M. for seven replicates. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  compared with control cultures; † $P < 0.05$ ; \$\$\$ $P < 0.001$  compared with NMDA-treated cultures. C, control; N, NMDA; NOSI, NOS inhibitors (L-NAME + NPLA). Molecular masses are indicated in kDa in (A) and (B).

eIF2 $\alpha$  phosphorylation through PERK activation. Figure 3(F) shows that thapsigargin triggers eIF2 $\alpha$  phosphorylation when compared with control cells.

#### NMDA and NO lead to calpain activation and eIF4G proteolysis

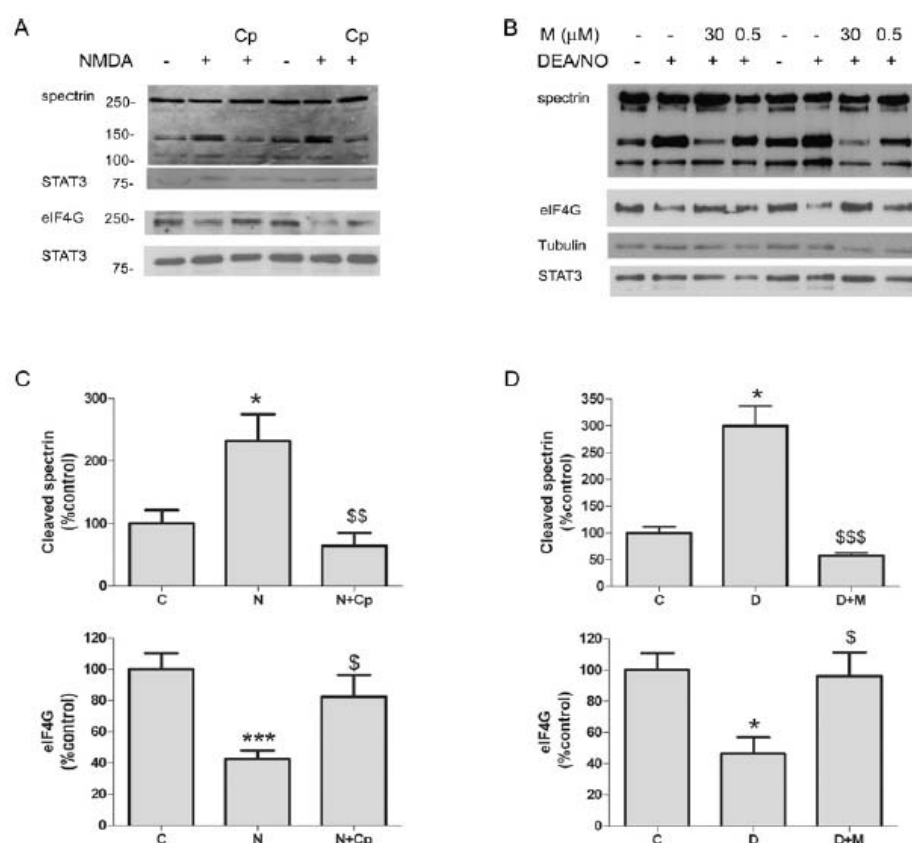
NMDA is known to induce a cytosolic  $Ca^{2+}$  increase [10,20] during the period of exposure. As expected, NMDA activated calpain, a  $Ca^{2+}$ -dependent cysteine protease, which was assessed by the proteolysis of  $\alpha$ -spectrin (Figures 4A and 4C). The 240 kDa full-length protein is processed into 150 and 145 kDa fragments by calpain and to 150 kDa and 120 kDa fragments by caspase 3 [43]. NMDA generated the formation of the 145–150 kDa fragments only (Figure 4A), this being indicative of calpain-dependent hydrolysis. Furthermore, eIF4G was cleaved 2 h after NMDA exposure (39% decrease,  $P < 0.05$ ; Figures 4A and 4C). Proteolysis of both spectrin and eIF4G was blocked completely in the presence of NOS inhibitors (Figures 4A and 4C), thus indicating an NO-dependent mechanism. In agreement with a previous report [39], NO dramatically stimulated calpain and decreased eIF4G levels by 52% (Figures 4B and 4D). Several

calpain inhibitors were then used to determine the contribution of calpain to eIF4G processing, and we found that two of them, calpeptin and MDL28170, completely inhibited calpain activation and blocked the eIF4G degradation induced by NMDA (Figures 5A and 5C) and DEA/NO (Figures 5B and 5D). Therefore eIF4G degradation was totally dependent on calpain activation.

#### NMDA and DEA/NO induce the dephosphorylation of 4E-BP1 and abrogate the formation of eIF4F complexes

The formation of eIF4F complexes plays a key role in the regulation of translation initiation. Since eIF4E is a component of the eIF4F complex and it is a rate-limiting translation factor for cap-mRNA, we measured its level of expression, observing that none of the treatments altered its cell content (Figure 6A).

The phosphorylation status of 4E-BP1 also governs the formation of eIF4F complexes. 4E-BP1 resolves into three electrophoretic forms,  $\gamma$ ,  $\beta$  and  $\alpha$ , of increasing migration velocity. Only the hyperphosphorylated  $\gamma$  form of 4E-BP1 does not bind eIF4E [31] and it therefore increases the availability of eIF4E to interact with eIF4G. We studied the phosphorylation of 4E-BP1 and



**Figure 5** Effect of calpain inhibitors on  $\alpha$ -spectrin and eIF4G cleavage

(A) Neuron-enriched cultures were pre-treated for 1 h with 30  $\mu$ M calpeptin (Cp) and exposed to NMDA for 30 min. Molecular masses are indicated in kDa. (B) Neuron-enriched cultures were pre-treated for 1 h with 30  $\mu$ M MDL28170 and then exposed to DEA/NO. Sister cultures were treated with vehicle. At 90 min after medium change, cells were collected and processed for eIF4G and  $\alpha$ -spectrin Western blot analysis as in Figure 4. The calpain inhibitors completely blocked spectrin and eIF4G proteolysis. M, concentration. (C) Quantitative analysis of cleaved spectrin (upper panel) and eIF4G (lower panel). Cells were treated as in (A). Results are means  $\pm$  S.E.M. for five replicates for spectrin and nine to ten replicates for eIF4G. (D) Quantitative analysis of cleaved spectrin (upper panel) and eIF4G (lower panel). Cells were treated as in (B). Results are means  $\pm$  S.E.M. for nine to ten replicates. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  compared with control cultures;  $^{\#}P < 0.05$ ;  $^{\#\#}P < 0.01$ ;  $^{\#\#\#}P < 0.001$  compared with NMDA- or DEA/NO-treated cultures. C, control; Cp, calpeptin; D, DEA/NO; M, MDL28170; N, NMDA; NOS, NOS inhibitors (L-NAME + NPLA).

performed a semi-quantitative analysis of the proportion of  $\gamma$ ,  $\beta$  and  $\alpha$  forms with respect to total 4E-BP1 (Figure 6B and Table 1). NMDA was observed to promote a shift from the  $\gamma$  form to the  $\alpha$  form (Table 1), an effect that was abrogated by NOS inhibitors (Figure 6B and Table 1). Furthermore, DEA/NO induced the dephosphorylation of 4E-BP1, illustrated by a decrease in the  $\gamma$  form and an increase in the  $\alpha$  form, which is the band of lowest mobility (Figure 6B and Table 1). In contrast, none of the treatments affected the  $\beta$  form.

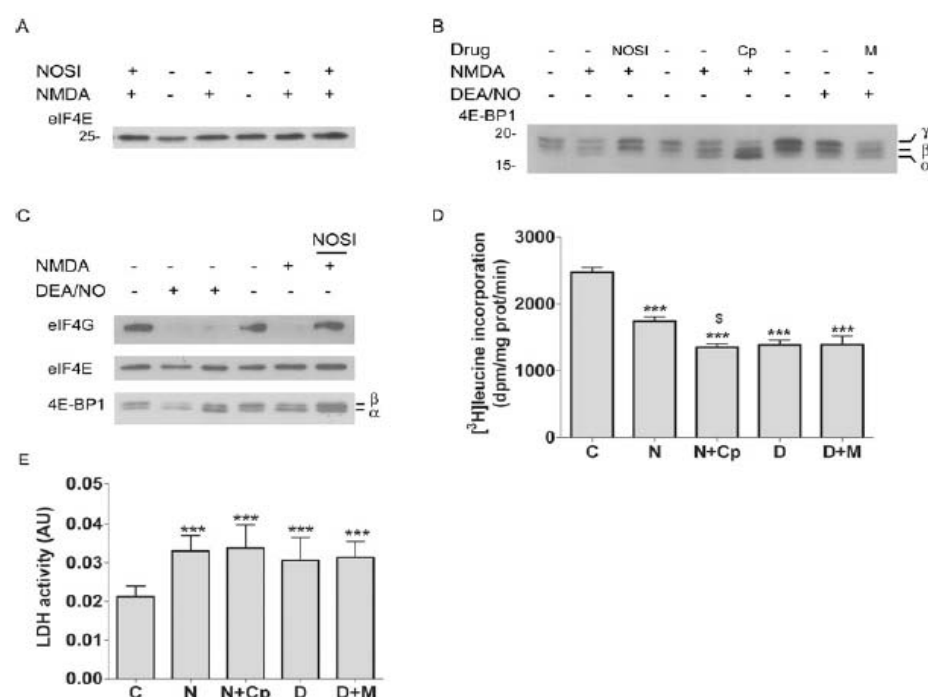
Since eIF4G and 4E-BP1 compete for the same binding site in eIF4E, we evaluated the proteins bound to eIF4E after its purification by  $m^7$ GTP-Sepharose affinity chromatography. DEA/NO and NMDA almost completely abolished the interaction between eIF4G and eIF4E, and the NMDA effect was prevented by NOS inhibitors (Figure 6C).

We also studied whether calpain inhibitors influenced the phosphorylation status of 4E-BP1. Calpeptin and MDL28170 did not reverse the dephosphorylation of 4E-BP1 induced by NMDA and DEA/NO respectively (Figure 6B and Table 1). Moreover,

calpeptin decreased the  $\gamma$  form and enhanced the formation of the  $\alpha$  form compared with NMDA alone (Figure 6B and Table 1). When the rate of protein synthesis was measured, we observed that none of the calpain inhibitors prevented the blockade of protein synthesis induced by NMDA or DEA/NO (Figure 6D), thus suggesting that the prevention of eIF4G cleavage alone is not sufficient to abrogate the inhibition of protein synthesis. In contrast, NOS inhibitors that blocked eIF4G processing and dephosphorylation of 4E-BP1 did promote the complete recovery of translation (Figures 2B, 4C and 6B). In addition, we observed that none of the calpain inhibitors rescued neurons from death (Figure 6E), suggesting that survival is compromised when the normal rate of protein synthesis is not achieved.

#### Rapamycin decreases the formation of eIF4F complexes and inhibits protein synthesis in a similar way to NMDA

In order to determine whether hypophosphorylation of 4E-BP1 was by itself sufficient to decrease the formation of eIF4F



**Figure 6** Phosphorylation status of 4E-BP1 and eIF4E-eIF4G complexes formation after NMDA and NO treatment: effect of calpain inhibitors on 4E-BP1 dephosphorylation and protein synthesis inhibition induced by NMDA or DEA/NO

(A) Neuron-enriched cultures were treated with NMDA or NMDA + NOS inhibitors for 30 and 90 min after medium change, cells were collected and processed for eIF4E Western blot analysis. (B) Cultures were pre-treated for 1 h with 30  $\mu$ M calpeptin or MDL28170. Then NMDA or DEA/NO were added to the culture medium. After 30 min, medium was changed and replaced with fresh medium containing the same concentration of calpain inhibitors. Sister cultures were treated with NMDA or NMDA + NOS inhibitors. At 90 min after medium change, cells were collected and processed for 4E-BP1 Western blot analysis. (C) Cultures were treated with NMDA or NMDA + NOS inhibitors or DEA/NO. At 90 min after NMDA or DEA/NO exposure, cells were processed for the purification of eIF4E by m<sup>7</sup>GTP-Sepharose affinity chromatography. Proteins were then eluted in SDS loading buffer and subjected to SDS/7.5–17% PAGE followed by Western blotting for eIF4G, eIF4E and 4E-BP1. (D) Neuron-enriched cultures were pre-treated for 1 h with 30  $\mu$ M calpeptin or MDL28170. NMDA or DEA/NO was then added to the culture medium. After 30 min, the medium was changed and replaced with fresh medium containing the same concentration of calpain inhibitors. At 90 min after medium change, cells were incubated for 30 min with [<sup>3</sup>H]leucine and then processed for the determination of leucine incorporation into proteins. Results calculated in d.p.m./mg of protein per min are means  $\pm$  S.E.M. for four to nine replicates from two different cultures. None of the calpain inhibitors impeded NMDA- or DEA/NO-induced translation inhibition. (E) Cultures were treated as in (D). LDH activity was determined 24 h later. Results proceeding from two different experiments are expressed in AU. Results are means  $\pm$  S.E.M. for seven to sixteen replicates. None of the inhibitors enabled rescue from neuronal death induced by NMDA or DEA/NO. \*\*\**P* < 0.001 compared with control cultures; \**P* < 0.05 compared with NMDA-treated cultures. C, control; Cp, calpeptin; D, DEA/NO; M, MDL28170; N, NMDA; NOSI, NOS inhibitors (L-NAME + NPLA). Molecular masses are indicated in kDa in (A) and (B).

complexes in the absence of eIF4G degradation, we incubated neurons with rapamycin, an inhibitor of the 4E-BP1 kinase mTOR (reviewed in [30]). At 3 h after addition of rapamycin, we observed a dephosphorylation of 4E-BP1, but no loss of eIF4G (Figure 7A). When we looked at the amount of eIF4G bound to eIF4E after m<sup>7</sup>GTP-Sepharose affinity chromatography, we found that rapamycin induced a dose-dependent inhibition of eIF4G binding to eIF4E (Figure 7B) that correlated with a decrease in protein synthesis (Figure 7C) of similar proportions to that achieved with NMDA (Figure 6D).

#### DISCUSSION

The present study investigated the mechanisms underlying excitotoxicity-mediated translation repression. In particular, we explored the contribution of eIF4G proteolysis and 4E-BP1 dephosphorylation to NMDA- and DEA/NO-induced protein synthesis inhibition. To our knowledge, this is the first study

to report molecular changes in translation factors that might be involved in the long-lasting inhibition of protein synthesis after transient exposure to NMDA. We showed that neurons can withstand a transient blockade of translation with limited neuronal loss, and also provided evidence that protein synthesis recovery closely correlates with neuronal survival, as is observed in animal models of stroke [1]. Indeed, the inactivation of NOS enabled full recovery of global protein synthesis, along with an almost complete rescue from NMDA-induced neurotoxicity; this latter finding has been reported previously by other groups [44,45]. Interestingly, NOS inhibitors were able to prevent the delayed, but not the initial, inhibition of protein synthesis following NMDA exposure. Similarly, ischaemic pre-conditioning suppresses persistent, but not acute, inhibition of translation (reviewed in [46]).

NOS inhibitors did not impede NMDA-induced decreased ATP levels, despite the fact that they promoted a complete recovery of protein synthesis. Therefore the moderate decrease in ATP

**Table 1** Phosphorylation status of 4E-BP1 after NMDA and NO treatment: effect of calpain or NOS inhibitors

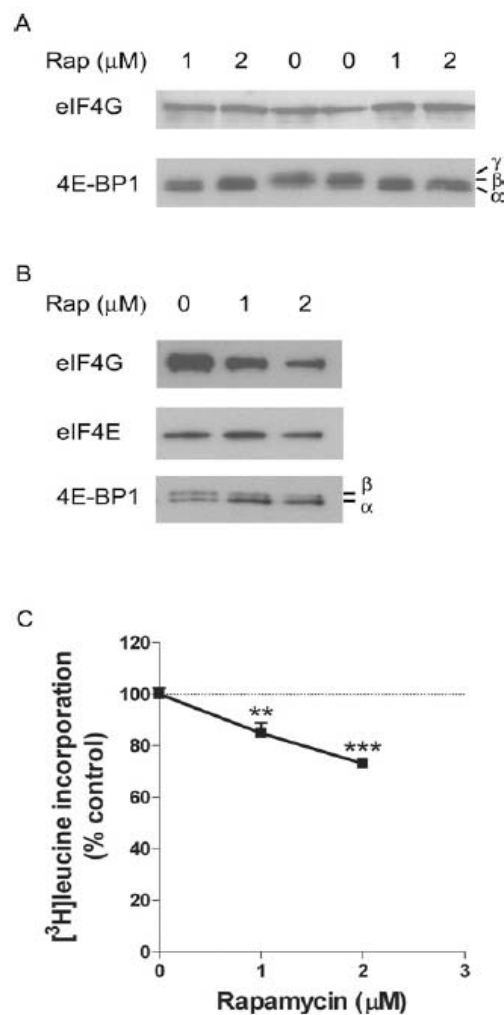
Neuron-enriched cultures were treated with NMDA, NMDA and NOS inhibitors, or DEA/NO for 30 min. Calpain inhibitors were added as described in Figure 5. At 90 min after NMDA or DEA/NO removal, cells were collected and processed for 4E-BP1 Western blotting. For each sample, the proportion of each phosphorylated form of 4E-BP1 ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) was calculated as the percentage of each band over the total as explained in the Materials and methods section. Results are means  $\pm$  S.E.M. for five to ten replicates. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  compared with control cultures; and  $^{\#}P < 0.05$ ;  $^{\#\#}P < 0.01$ ;  $^{\#\#\#}P < 0.001$  compared with NMDA-treated cultures. NOSI = NOS inhibitors.

Sample	Proportion of isoform (%)		
	$\gamma$	$\beta$	$\alpha$
Control	34.9 $\pm$ 5.6	42.9 $\pm$ 4.7	22.2 $\pm$ 4.7
NMDA	28.3 $\pm$ 5.2	39.7 $\pm$ 4.9	32.0 $\pm$ 5.4**
NMDA + NOS inhibitors	39.4 $\pm$ 5.6 <sup>#</sup>	42.3 $\pm$ 4.1	18.3 $\pm$ 4.4 <sup>#</sup>
DEA/NO	24.4 $\pm$ 6.2**	38.8 $\pm$ 2.7	36.8 $\pm$ 3.8***
Control	39.1 $\pm$ 1.7	39.9 $\pm$ 1.6	20.4 $\pm$ 0.8
NMDA	30.0 $\pm$ 2.9	41.0 $\pm$ 1.2	29.0 $\pm$ 2.0*
NMDA + calpeptin	23.2 $\pm$ 2.3***	40.4 $\pm$ 0.9	36.4 $\pm$ 2.3*** <sup>§</sup>
Control	33.2 $\pm$ 1.4	43.8 $\pm$ 1.3	23.0 $\pm$ 1.7
DEA/NO	23.3 $\pm$ 1.7*	40.9 $\pm$ 0.6	35.9 $\pm$ 1.7**
DEA/NO + MDL28170	22.6 $\pm$ 3.6*	39.9 $\pm$ 0.7*	37.5 $\pm$ 3.6**

after NMDA and DEA/NO treatments is unlikely to be the cause of protein synthesis inhibition. This result is in agreement with previously published data showing that severe protein synthesis inhibition precedes the ATP decrease after treatment with an NO donor [17]. Furthermore, suppression of protein synthesis occurs in the penumbra where ATP levels are maintained in transient focal ischaemia [3]. Interestingly, our data are in accordance with studies suggesting that transient inhibition of protein synthesis is not lethal, whereas the persistent phase of translation suppression is related to neurodegeneration [18,46–48].

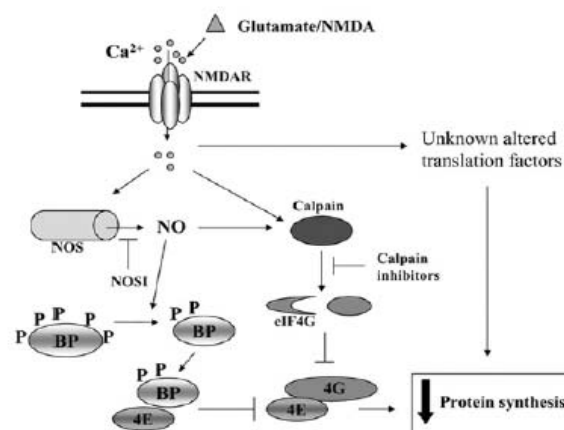
Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from ER stores through blockade of  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase with thapsigargin [17] was shown to induce protein synthesis alterations due to phosphorylation of eIF2 $\alpha$ . Glutamate also mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  from ER reservoirs, but depresses protein synthesis in an eIF2 $\alpha$ -phosphorylation-independent manner [19], in agreement with our data. We did not detect phosphorylation of eIF2 $\alpha$  after exposure to DEA/NO, a fast NO-releasing complex, in contrast with previous observations in neuroepithelial cells [16]. SNAP (*S*-nitroso-*N*-acetyl-DL-penicillamine), a slow NO-releasing agent, has been shown to mobilize thapsigargin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  ER stores in neurons [17] and to phosphorylate eIF2 $\alpha$  similarly to thapsigargin in neuroblastoma [15]. The shorter exposure time, faster NO release and lower concentration of NO donor used in the present study may explain the discrepancies with those studies. Therefore, under our experimental conditions, DEA/NO inhibited translation by a mechanism that was independent of eIF2 $\alpha$  phosphorylation, at least in the late phase. Our data suggest that NO does not contribute to the initial inhibition of protein synthesis by NMDA, but rather takes part in delayed translation deterioration.

Calpain activation and subsequent proteolysis of its substrates is known to occur after excitotoxicity in neurons [22,39,43]. Although some studies have indicated an attenuation of NMDA toxicity with pharmacological inhibitors of calpain [22], other studies, including this present one, indicated no protection [43]. Nevertheless, we found that calpain was responsible for eIF4G breakdown after exposure to NMDA or DEA/NO, in accordance with previous observations in the ischaemic brain [13]. Proteolysis

**Figure 7** Effect of rapamycin on phosphorylation status of 4E-BP1 and eIF4E-eIF4G complex formation and protein synthesis

Neuron-enriched cultures were treated for 3 h with rapamycin (Rap; 1 or 2  $\mu\text{M}$ ) or vehicle (0) and were then processed for eIF4G or 4E-BP1 Western blot analysis (A) or for eIF4E purification and subsequent determination of the eIF4E-eIF4G and eIF4E-4E-BP1 complexes (B). (C) Protein synthesis was assessed by measuring incorporation of  $^3\text{H}$ leucine into proteins in neuron cultures 3 h after addition of rapamycin (1 or 2  $\mu\text{M}$ ) or vehicle (0). Results were calculated as d.p.m./mg of protein per min and expressed as a percentage relative to the control ( $n = 5-11$ ). \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  compared with control cultures.

of several translation factors has been reported, mainly under apoptotic conditions. Research has shown that eIF2 $\alpha$  and 4E-BP1 are the substrates for caspase 3 (reviewed in [23]), whereas eIF4E and 4E-BP1 are the substrates for calpain *in vitro* [12,49]. However, to the best of our knowledge, there is no evidence that eIF4E and 4E-BP1 are cleaved by calpain *in vivo* [12,49]. In the present study, we did not observe any degradation of eIF2 $\alpha$ , eIF4E or 4E-BP1, suggesting that calpain specifically processed eIF4G in our experimental set-up. The eIF4G fragment generated



**Figure 8** NMDA targets responsible for delayed translation repression

Following the stimulation of NMDA receptors, NO is produced and induces the hypophosphorylation of 4E-BP1 and the subsequent binding to eIF4E, thus decreasing its availability to interact with eIF4G. Increased intracellular  $Ca^{2+}$  activates calpain that cleaves eIF4G into fragments unable to bind eIF4E. Lower amounts of full-length eIF4G together with the sequestration of eIF4E result in the formation of fewer eIF4E–eIF4G complexes and translation inhibition. Alterations of additional translation factors by regulation of phosphorylation status and/or degradation probably contribute to achieve the full inhibition of translation. BP, 4E-BP1; NOSI, NOS inhibitors (L-NAME + NPLA).

by calpain cleavage does not bind to eIF4E, thus precluding the formation of eIF4F complexes, as shown in both the present study and a model of global cerebral ischaemia [32]. It is therefore likely that the strong proteolysis of eIF4G contributed to impaired translation in our experimental conditions.

The binding of 4E-BP1 to eIF4E also compromises the association of eIF4F components [24]. We observed that NMDA and DEA/NO insults led to the dephosphorylation of 4E-BP1, which is expected to facilitate its binding to eIF4E. A similar process has been described after global ischaemia and was shown to cause a deficit in eIF4E–eIF4G complexes and therefore to contribute to translation inhibition [32]. NOS inhibitors enabled the complete recovery of protein synthesis by preventing eIF4G proteolysis and by precluding the dephosphorylation of 4E-BP1. The lack of protein synthesis recovery in the presence of a normal amount of eIF4G (in the presence of calpain inhibitors) suggests that the hypophosphorylation of 4E-BP1 is sufficient to decrease the protein synthesis rate. This result is supported by the data obtained with rapamycin. Rapamycin, which dephosphorylated 4E-BP1, but maintained eIF4G integrity, decreased the rate of protein synthesis. The rapamycin-induced inhibition of translation correlated with the decreased formation of eIF4E–eIF4G complexes. eIF4E is crucial for cap-dependent translation initiation and is a mandatory element of the eIF4F complex since it functions as the cap-binding protein. Decreased availability of eIF4E resulting from protease-mediated degradation or trapping by 4E-BP1 would severely compromise cap-mRNA translation. Therefore eIF4E is a rate-limiting factor, and its sequestration by 4E-BP1 might slow down the process of translation. The lower amount of full-length eIF4G may worsen the process by decreasing the probability of eIF4E–eIF4G binding. Our data suggest that preventing eIF4G degradation and 4E-BP1 dephosphorylation are necessary to unlock translation repression. The maintenance of eIF4G levels while 4E-BP1 is hypophosphorylated is not sufficient to prevent protein synthesis inhibition.

© The Authors Journal compilation © 2008 Biochemical Society

Our results are in agreement with research showing that ischaemic tolerance, which promotes translation recovery, tends to prevent eIF4G processing and to favour the phosphorylation of 4E-BP1 [47,50].

Since eIF4G and eIF4E play a key role in the translation of cap-mRNAs, we propose that limited availability of both proteins accounts for long-lasting translation failure (summarized in Figure 8) and contributes to neuronal loss after NMDA and NO challenges. Further studies are required to unravel the mechanisms controlling 4E-BP1 dephosphorylation.

We thank Araceli Salinas and Elisabet Gomez for their excellent technical assistance and the Language Advice Service from the University of Barcelona for revising the English. V.P. is a recipient of a Ramon y Cajal grant, and M.F.-N. is a recipient of an FPI (Formación de Personal Investigador) grant from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC). This study was supported by grants FIS05/0271 from the Spanish Ministry of Health and SAF2005-05793-C01 from the Ministry of Education and Science.

## REFERENCES

- Hossmann, K. A. (1993) Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death. *Prog. Brain Res.* **96**, 161–177.
- Dienel, G. A., Pulinelli, W. A. and Duffy, T. E. (1980) Regional protein synthesis in rat brain following acute hemispheric ischaemia. *J. Neurochem.* **35**, 1216–1226.
- Hata, R., Maeda, K., Hermann, D. and Hossmann, K. A. (2000) Evolution of brain infarction after transient cerebral ischaemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **20**, 937–946.
- Hermann, D. M., Kilic, E., Hata, R., Hossmann, K. A. and Mies, G. (2001) Relationship between metabolic dysfunctions, gene responses and delayed cell death after focal cerebral ischaemia in mice. *Neuroscience* **104**, 947–955.
- Rhoads, R. E. (1999) Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 30337–30340.
- Burda, J., Martin, M. E., Garcia, A., Alcazar, A., Fando, J. L. and Salinas, M. (1994) Phosphorylation of the  $\alpha$  subunit of initiation factor 2 correlates with the inhibition of translation following transient cerebral ischaemia in the rat. *Biochem. J.* **302**, 335–338.
- DeGracia, D. J., Adamczyk, S., Folbe, A. J., Konkoly, L. L., Pittman, J. E., Neumar, R. W., Sullivan, J. M., Scheumer, D., Kaufman, R. J., White, B. C. and Krause, G. S. (1999) Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase and phosphatase activity during postischemic brain reperfusion. *Exp. Neurol.* **155**, 221–227.
- Kumar, R., Azam, S., Sullivan, J. M., Owen, C. R., Cavener, D. R., Zhang, P., Ron, D., Harding, H. P., Chen, J., Han, A. et al. (2001) Brain ischemia and reperfusion activates the eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase, PERK. *J. Neurochem.* **77**, 1418–1421.
- Paschen, W., Aulenberg, C., Holop, S. and Mengesdorf, T. (2003) Transient cerebral ischaemia activates processing of xbp1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 449–461.
- Maus, M., Torrens, Y., Gauchy, C., Bretin, S., Nairn, A. C., Glowinski, J. and Premont, J. (2006) 2-Deoxyglucose and NMDA inhibit protein synthesis in neurons and regulate phosphorylation of elongation factor-2 by distinct mechanisms. *J. Neurochem.* **96**, 815–824.
- DeGracia, D. J., Neumar, R. W., White, B. C. and Krause, G. S. (1996) Global brain ischemia and reperfusion: modifications in eukaryotic initiation factors associated with inhibition of translation initiation. *J. Neurochem.* **67**, 2005–2012.
- Neumar, R. W., DeGracia, D. J., White, B. C., McDermott, P. J., Evans, D. R. and Krause, G. S. (1995) Eukaryotic initiation factor 4E degradation during brain ischemia. *J. Neurochem.* **65**, 1391–1394.
- Neumar, R. W., DeGracia, D. J., Konkoly, L. L., Khoury, J. I., White, B. C. and Krause, G. S. (1998) Calpain mediates eukaryotic initiation factor 4G degradation during global brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 876–881.
- Warner, D. S., Sheng, H. and Balitic-Haberle, I. (2004) Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J. Exp. Biol.* **207**, 3221–3231.
- DeGracia, D. J. and Montie, H. L. (2004) Cerebral ischemia and the unfolded protein response. *J. Neurochem.* **91**, 1–8.
- Uma, S., Yun, B. G. and Matt, R. L. (2001) The heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 14875–14883.
- Doulthel, J., Allhausen, S., Treiman, M. and Paschen, W. (2000) Effect of nitric oxide on endoplasmic reticulum calcium homeostasis, protein synthesis and energy metabolism. *Cell Calcium* **27**, 107–115.
- Marin, P., Nastsiuk, K. L., Daniel, N., Girault, J. A., Czernik, A. J., Glowinski, J., Nairn, A. C. and Premont, J. (1997) Glutamate-dependent phosphorylation of elongation factor-2 and inhibition of protein synthesis in neurons. *J. Neurosci.* **17**, 3445–3454.











