



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Deleció condicional de C/EBP β a les cèl·lules de la micròglia. Nova eina per a l'estud i la modulació de l'activació glial en models de neurodegeneració

Marta Pulido Salgado

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

Departament de Ciències Fisiològiques I

Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular

Deleció condicional de C/EBP β a les cèl·lules de la micròglia. Nova eina per a l'estudi i la modulació de l'activació glial en models de neurodegeneració.

Tesi doctoral presentada per:

Marta Pulido Salgado

Per a obtenir el grau de:

Doctora per la Universitat de Barcelona

Directors de la tesi: **Dr. Josep Saura Martí**

Dra. Carme Solà Subirana

Barcelona, gener de 2016

Tesi Doctoral

Deleció condicional de C/EBP β a les cèl·lules de la micròglia. Nova eina per a l'estudi i la modulació de l'activació glial en models de neurodegeneració.

Programa de Doctorat en Biomedicina

Treball realitzat per Marta Pulido Salgado a la Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular del Departament de Ciències Fisiològiques I de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona i el Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC), sota la direcció dels Drs. Josep Saura Martí i Carme Solà Subirana.

Barcelona, gener de 2016

L'autora:

Els directors:

Marta Pulido Salgado

Josep Saura Martí

Carme Solà Subirana

Als meus pares, per tot.

A vosaltres petits peluts, perquè sou l'ànima d'aquesta tesi.

Si dius la veritat, pots estar segur que, tard o d'hora et descobriran.

Oscar Wilde

AGRAÏMENTS

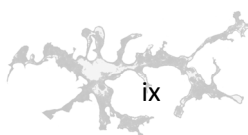
Abans d'entrar en matèria, m'agradaria trencar per uns instants la solemnitat i serietat que requereix l'escriptura d'una tesis doctoral, per a fer arribar el meu agraïment a totes aquelles persones que d'una manera o altra han estat amb mi al llarg d'aquests 5 anys.

En primer lloc i com no podria ser d'una altra manera, **Jou, Carme** gràcies per donar-me l'oportunitat de ser la vostra becària. **Jou**, gràcies per haver-me ensenyat a ser més política i reflexiva, espero no haver esgotat la teva paciència. **Carme**, amb tu he après a qüestionar-me cada pas, cada experiment i cada resultat, fet que m'ha permès millorar com a científica, tot i que sé que mai assoliré el teu nivell de rigor. Dels dos admiro la vostra capacitat i dedicació a la ciència, però per sobre de tot admiro el vostre tarannà humil i proper que fa tant fàcil compartir amb vosaltres des del problema més seriós a l'anècdota més irrellevant.

Joan, per moltes vegades que refaci aquest paràgraf no trobaré mai les paraules per a expressar adequadament el meu agraïment. No obstant, ho intentaré. Gràcies per ensenyar-me, per orientar-me quan més perduda he estat. Sóc conscient que et dec gran part d'aquesta tesi, ja que la teva ajuda m'ha permès obtenir resultats que d'altra forma no sé si els hagués aconseguit. Has estat un gran suport per a mi, tant en l'àmbit científic com en el personal. Perdona'm si creus que no t'he fet justícia, m'ofereixo a intentar arreglar-ho en persona, davant d'un cafè i un cacaolat.

Pep, segueixo una mica enfadada per la teva jubilació. Per una banda, me n'alegro molt que per fi tinguis un descans més que merescut, però per l'altra, això ha suposat perdre al membre més divertit del lab. Disseccionar mai havia estat més entretingut, ahora que didàctic. Mai et vas negar a donar-me un cop demà, encara que t'avisés amb molt poc temps de l'arribada de la cigonya. Així doncs, gràcies!

Als meus companys de grup. **Aroa**, no compartimos poyata, però fue un lujo estar en el congreso de Berlín contigo. Las comidas de grupo no son lo mismo sin ti. ¡Mucha suerte por tierras mañas, te la mereces! **Núria**, tot i només coincidir durant



un període de temps (massa) curt al 613, gràcies per rebre'm amb un somriure i resoldre'm tots els dubtes de principiant. **Eva**, quina llàstima no haver compartit més temps amb tu! Ets la dolçor personificada, sempre aportant alegria als qui t'envolten. Que tot et vagi molt bé bonica! **Marco**, gracias por tus sabios consejos. Aun cuando al principio me costó entenderlos, ahora con gusto me quito el sombrero y te digo: ¡J***r, qué razón tenías! **Guido**, amb tu he après una filosofia nova de la vida. Només lamento no haver vist la teva tesi finalitzada. Estic segura que l'haguessis defensat amb la mateixa força i sentiment que defenses totes les causes en les que t'impliques. **Maria José**, mi compi de Máster, mi psicóloga gallega favorita. Gracias por tus charlas, consejos y tus "yo no lo veo así". **Tony**, gràcies per ensenyar-me a superar-me com a científica i com a persona. Espero que aconseguis tot allò que et mereixes després de tot l'esforç d'aquests anys. **Neus**, la meva petita Neusi, gràcies per ensenyar-me a avaluar tots els problemes que poden sorgir seguint un protocol. No desesperis, la paciència és la mare de la ciència, ja veuràs com acabaràs triomfant!

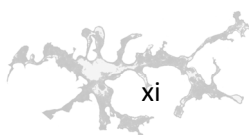
A les meves alumnes de màster i grau. Perquè les autèntiques professores éreu vosaltres! **Milana**, dura fue la microglía humana, pero allí estuviste tú con tu entusiasmo y perseverancia. Gracias por estar a mi lado en uno de los momentos más duros de esta tesis. **Daniela**, va ser un plaer ser primer la teva professora de pràctiques i després introduir-te al món de la micròglia. El teu somriure sempre m'ha acompanyat durant aquests anys pels passadissos de la facultat. **Emese**, I hope you enjoyed your Barcelona experience as much as I enjoyed your friendship. Best white wine ever! Thank you! **Irene**, perquè tot i el poc temps de què disposàvem, ho vàrem aconseguir! Serà per la denominació d'origen "Jesuïtes de Casp"? **Anna**, breu també va ser la teva estada, però més divertida impossible! **Anaïs**, la millor alumna sense cap mena de dubte. Treballadora, constant i encantadora com a persona. Un plaer haver-te tingut al meu costat durant els últims mesos d'aquesta tesi. Espero de tot cor que aconseguis realitzar la teva pròpia tesi doctoral, estic segura que seràs una gran científica!



Durant aquests anys però, també hi ha hagut gent fora del grup sense la qual tot hagués estat molt més difícil.

Unitat de Bioquímica: GRÀCIES!

Erola, tu vas ser la primera amiga que vaig trobar entre aquestes parets. No saps quant et trobo a faltar, però no em queixo, sé que havies de marxar per a continuar. Al teu costat vaig passar grans moments i mai em vas fallar quan més et vaig necessitar. Tot i la diferència horària que ens separa, sé que puc recórrer al *Whatsapp* o l'*Skype*, quan necessito un bon consell. Ja saps que sempre em tindràs per a tot allò que necessitis. **Eva**, Evuchi, com puc expressar tot allò que et mereixes sense ocupar l'espai d'una altra tesi? Has estat la columna que m'ha aguantat durant aquests últims dos anys. Ara però, tens la prova entre les teves mans, ho hem aconseguit! Gràcies per no perdre la fe en mi. Gràcies per donar-me "canya" quan m'he arraulit en un racó llepant-me les ferides. Gràcies per ajudar-me sempre dins i fora del lab. Com ho farà sense tu? Mai trobaré una millor companya de bogeries. Ets una persona increïble! Miau! **Arnau**, l'home tranquil, el meu "germà" by Laura del Tonto. Gràcies per les bromes, les converses a cultius, davant d'una carmanyola o baixant pel carrer Urgell. Tenir-te al costat m'ha permès contagiar-me del teu "bon rollisme" i acabar fent coreografies estranyes o trenets pel lab. Molta sort amb la beca de l'Opus, ho aconseguiràs! **Nachete**, el meu valencianet esbojarrat, "más rápido que la velocidad". Personeta inquieta i plena d'una energia inesgotable. Gràcies per aportar la nota divertida a la Unitat i arrencar-nos sempre un somriure amb les teves històries i anècdotes. We miss you! **Elisabeth** de los Ángeles y las Mercedes, flor de primavera. Gracias por ampliar nuestro vocabulario. Deliciosa despedida "Focaccia Party Time" ¡Nos vemos en Montañita! **Oriol**, l'home tranquil segona part. Les teves "baralles" amb l'**Elisabeth** ens van deixar frases mítiques, plenes d'ironia i humor. Espero que puguis realitzar un treball de Màster tant impressionant com el de fi de Grau. **Chiwi**, es pensar en ti y asomar una sonrisa. Hay demasiado silencio en esta Unidad desde que te fuiste. **Ivan**, el científic amb ànima de surfista. Impressionant

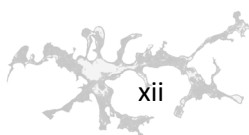


el tàndem el que formeu. Mai havia vist tant potencial junt. Espero amb delit la vostra òpera prima cinematogràfica. **Alan**, parlar amb tu és aprendre coses noves. Molta sort en els teus nous projectes! **Mercè**, **Núria**, ha estat un plaer acollir-vos a la nostra petita família de becaris. Gràcies per fer-me companyia durant l'escriptura de la tesi i donar-me conversa quan necessitava desconnectar 5 minuts de la ciència.

Mis chicas hermosas. **Rosario**, mi querida Rosi Ru. Nuestros comienzos fueron duros, pero fui afortunada y me dejaste descubrir a esa dulce y encantadora personita que se esconde detrás de la “señu”. Gracias por cuidarme y mimarme tanto. Te echaré de menos. **Carmen**, mi Carmencita bonita. Gracias por tu cariño y apoyo. Siempre dispuesta a escuchar cuando lo he necesitado. Siempre dispuesta a echar una mano. Tranquila, ¡ya no te robaré más placas! **Mario**, el MacGyver de la Unidad. ¿Cuántas veces me han salvado la vida tus inventos? Gracias por ser un gran compañero.

Als “jefes”, no per ser els últims a esmentar són menys importants. **Marga**, gràcies per tractar-me com una més del teu grup. Mai m’has negat un consell quan l’he necessitat, sempre m’has obert la porta del teu despatx. Ets una gran persona, divertida, sincera i lluitadora que val la pena conèixer. **Manolo**, qui m’havia de dir que sota l’aparença de doctor seriós trobaria un sentit de l’humor fi i irònic amb el que m’ho passaria tant bé? Gràcies pel teu suport durant aquests últims mesos. Ja em puc aixecar de la cadira! **Jose**, gràcies per aportar-me llum en un camí tant difícil com el del *RNA-Seq*. He apreciat totes i cadascuna de les nostres xerrades sobre els més diversos temes. **Roser**, gràcies per ensenyar-me a ser millor professora. **Cristina**, gràcies per l’aire fresc que has aportat a la Unitat. Gràcies per començar i acabar sempre el dia amb un somriure. Des del primer moment em vas contagiar el teu bon humor i alegria.

Tot i passar gran part del temps a la facultat, no puc deixar d’anomenar en aquesta secció de la tesi les grans persones que he conegut a l’IIBB. **Mateu**, gràcies per ser com ets. Gràcies per escoltar-me i comprendre’m tant bé. Ets un encant! **Elis**,



Mireia i **Esther** gràcies per tota la vostra ajuda i simpatia. Als “compis” de la setena planta. **Joana**, gracias por ser tan dulce y alabar todos mis estilismos. **Petar**, ¡Ánimos! ¡Tú puedes con todo! **Núria**, no deixis que mai ningú et digui de què ets i de què no ets capaç, ets una gran persona i vals molt! **Nacho**, haces que realizar un simple *cytospin* sea una experiencia de lo más divertida. Gracias por animarme con tus piropos y entretenerme con tus historias y cotilleos. **Gemma**, **Laia**, gràcies per la vostra alegria.

Als “sèniors” que d’una manera o altra m’han ajudat durant aquests anys. **Lupe**, aún recuerdo la primera vez que hablamos, fue sólo dos semanas después de empezar a trabajar en el IIBB, en el simposio de neurobiología. Debo confesar que yo andaba muy perdida, pero tú ya sabías mi nombre y me hablaste como si ya nos conociéramos. Gracias por tu calidez, por interesarte por mí siempre que nos encontrábamos y por compartir unas risas por el pasillo. **Roser**, gràcies a tu les experiències al criòstat han estat menys dures. Els teus consells m’han ajudat a salvar més d’un cervell. **Anna**, sempre amunt i avall, incansable i plena d’energia. Gràcies per compartir Bilbao amb mi, va ser una gran experiència. **Valérie**, trabajadora donde las haya. Gracias por tu sonrisa, tu palabras amables y tu dulzura. **Coral**, no puc acabar aquest paràgraf sense donar-te les gràcies per la teva amabilitat. Ens queda pendent l’intercanvi de fotos d’*Aurores borealis*.

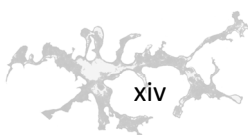
Als “no científics” de l’institut. **Montse**, desde el primer día me consideraste tu amiga. Por fin, tanto preguntar por ella, aquí tienes la tesis. Espero que todo te vaya muy bien. Gracias por todo. **Edu**, una pesada que es posa en embolics informàtics menys! Gràcies per la teva sinceritat i el teu sentit de l’humor àcid i corrosiu. **Ángel** y **Antonio**, porque solo por salir del ascensor y encontrar vuestra sonrisa merecía la pena cruzar la calle e ir al IIBB.

Hi ha un lloc però, on he passat quasi tant de temps com a la poiata, i fins i tot algú ha arribat a suggerir que dormia en una llitera a la sala 3. Allà he conegut grans persones que m’han ajudat a entendre millor el món dels petits peluts als que dec aquesta tesi. **Gari**, GRACIAS. ¡Qué pena no haber tenido nuestra charla antes!



Contigo SPF ha dado un giro de 180 grados, puede que no todos agradezcan los cambios que has introducido, pero yo te doy las gracias de corazón. Espero que no pierdas nunca esa chispa que tanto me hace reír. **Pep**, “Lyzbeta” et deu que hagi convertit a una química en la teva fidel “padawan-aprenent de veterinària”, sempre disposada a aprendre com tenir cura dels ratolins. Gràcies per contestar-me totes i cadascuna de les meves preguntes per elementals i absurdes que fossin amb un somriure als llavis. **Ivan**, mi paño de lágrimas, cuantas charlas compartidas entre las paredes de SPF. Siempre eficiente y resolutivo. Contigo no existen los problemas sólo las soluciones. Gracias por todo. **Raúl**, gràcies de part dels ratolins i sobretot de part meva. Gràcies per atendre totes i cadascuna de les meves peticions sense qüestionar-me. Treballar amb tu és d'allò més fàcil i agradable, tant debò t'hagués tingut abans. **Robert**, amb tu vaig donar les meves primeres passes a SPF i de tu vaig aprendre les tècniques bàsiques per a treballar amb animals. La nostra relació no sempre ha estat fàcil, però de tu n'he après molt aquests anys. Només espero de tot cor que tot et vagi bé i aconseguieixis trobar aquell ambient que et permeti realitzar-te. Gràcies. **Glòria**, gràcies per tot el teu carinyo. Gràcies per compartir amb mi estones tant agradables a la sala de rentat i a la terrassa. El meu pas per SPF no hagués estat el mateix sense tu!

Quan em pregunten com és l'experiència de fer un doctorat, la meva resposta sempre té en compte les grans experiències que et permet viure, però també la duresa d'alguns moments. Per sort, sempre hi ha persones fora del laboratori disposades a ajudar-te i escoltar-te. Gracias **Sergio**, mi niño. Contigo empecé esta aventura y aunque te fuiste pronto a Francia, siempre te he sentido cerca y sé que siempre tendré tu amistad. Ojalá nuestros caminos científicos se vuelvan a cruzar. **Ludo**, mi francés favorito. Gracias por tu amistad. **Sergi** i **Abi**, gràcies per aquell diumenge a Londres, per tots els cafès i podria seguir amb un llarg etcètera. Seguir les vostres aventures és una manera de veure món. **Facund**, gràcies pels teus consells “zen” que tant m'han ajudat en aquest últim tram de la tesi, espero que t'agradi.

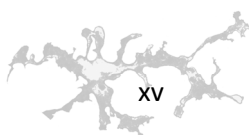


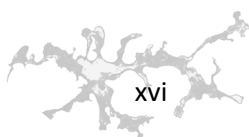
Tieta, gràcies per fer-me la neboda més feliç d'aquest món. Gràcies per ser al meu costat en els bons moments i els no tan bons. Gràcies pels teus savis consells. Mai m'has fallat i sé que sempre podré comptar amb tu ja sigui per parlar, per anar a donar un tomb o treure el nas per centres comercials una tarda qualsevol. T'espero a l'altra punta de món.

Als meus altres petits peluts, **Chin, Duc i Kitkat**. Per donar-me tant amor amb una mirada o una carícia. Els vostres jocs han fet molt més divertida l'escriptura d'aquesta tesi.

Mama, papa, no hi ha prou paraules en aquest món per agrair-vos tot el que heu fet per mi. Heu sigut, sou i sereu el meu model a seguir. Tot el que sóc us ho dec a vosaltres. Gràcies per recolzar-me, per permetre'm seguir el meu propi camí, tot i saber que la direcció era l'equivocada. Gràcies per recollir-me sempre que he caigut i ajudar-me a espolsar-me per a seguir endavant. Sé que per lluny de casa que vagi sempre us tindrè amb mi. GRÀCIES, per tot i perquè sense vosaltres no seria aquí, aquesta tesi també és vostra!

MOLTES GRÀCIES A TOTS, ARA SÍ:





ÍNDEX

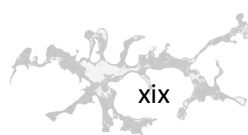
AGRAÏMENTS	ix
ÍNDEX	xvii
ABREVIATURES	xxi
1. INTRODUCCIÓ	29
1.1 Les cèl·lules de la micròglia	31
1.1.1 Origen i diferenciació:.....	31
1.1.3 Paper de la micròglia al SNC:.....	37
1.1.4 Factors de transcripció implicats en la regulació de les funcions microglials.....	65
1.1.5 Modificació de l'expressió gènica microglial.....	85
2. OBJECTIUS	93
3. MATERIAL I MÈTODES	97
3.1 Animals	97
3.1.1 Protocol de genotipatge.....	97
3.2 Cultius cel·lulars.....	99
3.2.1 Cultiu de glia mixta	101
3.2.2 Cultiu de glia mixta a partir d'un únic embrió.....	102
3.2.3 Subcultiu de glia mixta de ratolí.....	103
3.2.4 Cultiu de micròglia	104
3.2.5 Tractaments:.....	105
3.3 Aïllament de la micròglia del cervell adult	106
3.4 Immunocitoquímica.....	109
3.4.1 Immunocitoquímica de cultius primaris	109
3.4.2 Immunocitoquímica de cèl·lules microglials aïllades del cervell adult....	110
3.5 Extracció d'ARN	112
3.5.1 Extracció d'ARN de micròglia primària.....	112
3.5.2 Extracció d'ARN de micròglia aïllada del cervell adult.....	114



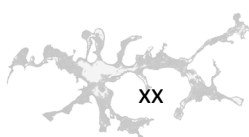
3.5.3 Extracció d'ARN de teixit.....	115
3.6 PCR en temps real.....	116
3.6.1 Reacció de transcripció inversa.....	116
3.6.2 PCR en temps real.	117
3.7 Extracció de proteïnes.....	118
3.7.1 Extracció de proteïnes de micròglia primària.	118
3.7.2 Extracció de proteïnes de micròglia aïllada de cervell adult.	119
3.7.3 Extracció de proteïnes de teixit.	119
3.7.4. Quantificació de proteïnes. Mètode de Bradford.	119
3.8 Western blot.....	120
3.9 Avaluació de la mort cel·lular induïda per l'activació.....	123
3.10 Determinació de la producció de NO.....	123
3.11 Assaig de fagocitosi.....	124
3.12 inducció del model animal de l'esclerosi múltiple EAE.	126
3.13 Model prionic murí ME7.....	128
3.13.1 Inducció del model.....	128
3.13.2 Test de comportament I: <i>Open-field</i>	131
3.13.3 Test de comportament II: <i>Inverted screen</i>	132
3.13.4 Test de comportament III: <i>Burrowing</i>	132
3.14 Seqüenciació de l'ARN i anàlisi.....	134
3.15 Anàlisi estadístic.	135
3.16 Solucions generals.	136
4. RESULTATS	143
4.1 Obtenció i caracterització de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Estudi dels efectes funcionals de la deleció de C/EBP β a les cèl·lules de la micròglia <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	143
4.1.1 Obtenció de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$	144
4.1.2 Caracterització fenotípica de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$	147



4.1.3 Confirmació de l'absència selectiva de C/EBP β a les cèl·lules microgials <i>in vitro</i>	149
4.1.4 Anàlisi de l'efecte de la deleció de C/EBP β a les cèl·lules microgials <i>in vitro</i>	151
4.1.5 Caracterització de la micròglia aïllada del cervell de ratolí adult.	156
4.1.6 Confirmació de l'absència selectiva de C/EBP β a les cèl·lules microgials <i>in vivo</i> :.....	157
4.1.7. Reducció de l'expressió de gens proinflamatoris en absència de C/EBP β microglial	159
4.1.8 Estudi dels efectes de la deleció de C/EBP β microglial al model animal de l'esclerosi múltiple EAE.....	161
4.1.9. Inducció del model priònic murí, ME7, als animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$	163
4.2 Anàlisi del perfil transcriptòmic de la micròglia primària activada.	166
4.2.1 Espècies d'ARN detectades a la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractada a 6h amb LPS i LPS+IFN γ	167
4.2.2 Anàlisi WGCNA (<i>Weighted Correlation Gene Network Analysis</i>) de la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractada amb LPS i LPS+IFN γ durant 6h.....	168
4.2.3 Anàlisi dels gens expressats diferencialment a la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractada amb LPS i LPS+IFN γ durant 6h.....	178
4.2.4 Canvis a l'expressió gènica de la micròglia primària en absència de C/EBP β :.....	187
5.DISCUSSIÓ	203
5.1 Obtenció i caracterització de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Estudi dels efectes funcionals de la deleció de C/EBP β a les cèl·lules de la micròglia <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	204
5.1.1 Obtenció i caracterització de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$	204
5.1.2 Confirmació de l'absència selectiva de C/EBP β a les cèl·lules microgials <i>in vitro</i> :	207
5.1.3 Anàlisi de l'efecte de la deleció de C/EBP β a les cèl·lules microgials <i>in vitro</i> :	208
5.1.4 Caracterització de la micròglia aïllada del cervell de ratolí adult.	210



5.1.5 Confirmació de l'absència selectiva de C/EBP β a les cèl·lules microgials <i>in vivo</i>	212
5.1.6 Reducció de l'expressió de gens proinflamatoris en absència de C/EBP β microglial	212
5.1.7 Estudi dels efectes de la deleció de C/EBP β microglial al model animal de l'esclerosi múltiple EAE.....	213
5.1.8. Inducció del model priònic murí, ME7, als animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$	215
5.2 Anàlisi del perfil transcriptòmic de la micròglia primària activada.	218
5.2.1 Anàlisi WGCNA (<i>Weighted Correlation Gene Network Analysis</i>) de la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractada amb LPS i LPS+IFN γ durant 6h.	218
5.2.2 Anàlisi dels gens expressats diferencialment a la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractada amb LPS i LPS+IFN γ durant 6h.....	227
5.2.3 Canvis a l'expressió gènica de la micròglia primària en absència de C/EBP β	231
6. CONCLUSIONS	239
7. BIBLIOGRAFIA	243
8. ANNEX	273



ABREVIATURES

6-OHDA: 6-hidroxidopamina.

A β : pèptid β -amiloide.

Adam: de l'anglès, *a disintegrin and metalloproteinase*.

ADN: àcid desoxiribunocleic.

AP-1: de l'anglès, *activator Protein-1*.

ApoE: de l'anglès, *apolipoprotein E*.

APP: de l'anglès, *amiloid beta precursor protein*.

ARE: de l'anglès, *antioxidant response element*.

Arg1: de l'anglès, *arginase 1*.

ARNm: àcid ribonucleic missatger.

ATF-1: de l'anglès, *activating transcription factor 1*.

BACE: de l'anglès, *beta-secretase*.

BAI-1: de l'anglès, *brain-specific angiogenesis inhibitor 1*.

Bax: de l'anglès, *Bcl-2-associated X*.

Bcl-2: de l'anglès, *B-Cell lymphoma 2*.

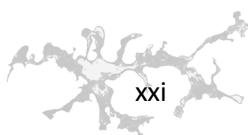
BDNF: de l'anglès, *brain-derived neurotrophic factor*.

C/EBP: de l'anglès, *CCAAT enhancer binding protein*.

Casp2: de l'anglès, *caspase 2*.

CNPase: de l'anglès, *2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*.

COX2: de l'anglès, *cyclooxygenase 2*.



CREB: de l'anglès, *cAMP Response Element Binding Protein*.

CSF-1: de l'anglès, *colony stimulating factor 1*.

CSF-1R: de l'anglès, *colony stimulating factor receptor 1*.

CX3CL1: de l'anglès, *chemokine (C-X3-C motif) ligand 1* o *fractalkine*.

CX3CR1: de l'anglès, *CX3C chemokine receptor 1* o *fractalkine receptor*.

Cybb: de l'anglès, *cytochrome b subunit beta*.

DAMP: de l'anglès, *damage-associated molecular pattern molecules*.

Ddit3: de l'anglès, *DNA-damage inducible transcript 3*.

EAE: de l'anglès, *experimental autoimmune encephalomyelitis*.

ELA: de l'anglès, *esclerosi lateral amiotròfica*.

FIZZ1: de l'anglès, *found in inflammatory zone protein 1*.

FSH: de l'anglès, *follicle-stimulating hormone*.

Gbp: de l'anglès, *guanylate-binding protein*.

GFAP: de l'anglès, *glial fibrillary acidic protein*.

GFP: de l'anglès, *green fluorescent protein*.

GO: de l'anglès, *Gene Ontology*.

Hdac: de l'anglès, *histone deacetylase*.

HO-1: de l'anglès, *heme oxygenase-1*.

Htt: de l'anglès, *huntingtin*.

IFN γ : interferó gamma.



IGF-1: de l'anglès, *insulin growth factor 1*.

IL: interleucina.

IL-12Rb1: de l'anglès, *interleukin 12 receptor beta*.

Irf8: de l'anglès, *interferon regulatory factor 8*.

JAK: de l'anglès, *janus kinase*.

Jmjd6: de l'anglès, *jumonji domain containing 6*.

LH: de l'anglès, *luteinizing hormone*.

LPS: lipopolisacàrid.

MAP2: de l'anglès, *microtubule associated protein 2*.

MHC II: de l'anglès, *major histocompatibility II*.

MMP: de l'anglès, *matrix metalloproteinases*.

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NADPH: de l'anglès, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*.

NBH: de l'anglès, *normal brain homogenate*.

Ncx-1: de l'anglès, *sodium-calcium exchanger*.

NeuN: de l'anglès, *neuronal nuclei*.

NF- κ B: de l'anglès, *nuclear factor κ B*.

NGF: de l'anglès, *nerve growth factor*.

NK: de l'anglès, *natural killer*.

NMDA: àcid-N-metil-D-aspàrtic



NO: de l'anglès, *nitric oxide*.

NOS2: de l'anglès, *nitric oxide synthase 2*.

NOX2: de l'anglès, *NADPH oxidase 2*.

Nrf2: de l'anglès, *nuclear erythroid 2-related receptor*.

PAMP: de l'anglès, *pathogen-associated molecular pathways*.

Park: de l'anglès, *parkin*.

PINK1: de l'anglès, *PTEN- induced kinase 1*.

PCR: de l'anglès, *polymerase chain reaction*.

PPAR: de l'anglès, *peroxisome proliferator-activated receptor*.

Psen2: de l'anglès, *presenillin*.

Ptges: de l'anglès, *prostaglandin E synthase*.

PU.1: de l'anglès, *purine-rich nucleic acid binding 1*.

PVDF: de l'anglès, *polyvinylidene fluoride*.

RAGE: de l'anglès, *receptor for advanced glycation endproducts*.

RNS: de l'anglès, *reactive nitrogen species*.

ROS: de l'anglès, *reactive oxygen species*.

Runx1: de l'anglès, *Runt-related transcription factor 1*.

SIRP α : de l'anglès, *signal-regulatory protein alpha*.

Sirt1: de l'anglès, *sirtuin 1*.

SNC: sistema nerviós central



SOD1: de l'anglès, *superoxide dismutase 1*.

Sp1: de l'anglès, *specificity protein 1*.

SRA: de l'anglès, *macrophage scavenger receptor class A*.

STAT: de l'anglès, *signal transducer and activator of transcription*.

TGF β : de l'anglès, *transforming growth factor β* .

TIM: de l'anglès, *T-cell membrane protein*.

TLR: de l'anglès, *Toll-like receptor*.

TNF: de l'anglès, *tumor necrosis factor*.

TREM2: de l'anglès, *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*.

VCAM1: de l'anglès, *vascular cell adhesion molecule 1*.

WAP: de l'anglès, *whey acidic protein*.

YFP: de l'anglès, *yellow fluorescent protein*.





1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

Descrites per primera vegada l'any 1856 per Virchow, les cèl·lules de la neuròglia representen el 50% del cervell humà (Azevedo et al, 2009) i el 35% del de ratolí (Herculano-Houzel et al, 2006). El descobriment de la *Nervenkitz* (que es pot traduir literalment com a “cola del sistema nerviós”) va representar el començament d'una nova era en l'estudi del sistema nerviós central (SNC). No obstant, van haver de transcórrer més de 50 anys fins a la descripció dels tres principals tipus cel·lulars que engloba el terme neuròglia: els astròcits, els oligodendròcits i la micròglia.

Otto Deiters va ser el primer en descriure unes cèl·lules de morfologia estrellada, no obstant però, fou Michael von Lenhossék, l'any 1893, qui va emprar per primera vegada el terme “astròcit” (del grec estel, *astron* i cèl·lula, *kytos*). Santiago Ramón y Cajal, tot i ser més conegut per proposar la “doctrina neuronal” que li va reportar guanyar el Premi Nobel l'any 1906, a finals del segle XIX va començar a mostrar interès per l'estudi de les cèl·lules neuroglials. Amb aquest objectiu, va desenvolupar diferents mètodes de tinció d'entre els quals cal destacar la solució de nitrat d'urani i formol i la sublimació de l'or, ja que li varen permetre descriure l'any 1913 el controvertit “tercer element”. Clarament diferenciat del primer element, les neurones, i del segon element, els astròcits, el tercer element agrupava aquelles cèl·lules petites, adentríques i apolars amb localització perineuronal i perivascular a la substància blanca, que Cajal va considerar com a l'últim tipus de cèl·lula glial present al SNC. No obstant, entre els anys 1919 i 1921, Pío del Río-Hortega (Figura 1), mitjançant la tinció amb carbonat de plata, va subdividir el tercer element de Cajal en dos tipus cel·lulars. El primer el va anomenar glia interfascicular, tot i emprar posteriorment el nom d'oligodendròcits, i al segon micròglia. Aquesta última però, dues dècades abans havia estat anomenada mesòglia per William Ford Robertson (Garcia-Marin et al, 2007) (Tremblay et al, 2015). Sobre les cèl·lules microglials, malgrat les limitacions tècniques de l'època, del Río-Hortega va ser capaç d'inferir els següents postulats que a dia d'avui es mantenen plenament vàlids (Kettenmann et al, 2011):



1. La micròglia entra al cervell durant el desenvolupament.
2. Aquestes cèl·lules invasores presenten una morfologia ameboide i el seu origen és mesodèrmic.
3. Utilitzen els vasos sanguinis i els conductes de la substància blanca com a guia per a migrar i entrar a totes les regions cerebrals.
4. Al cervell adult presenten un fenotip ramificat.
5. Es troben arreu, disperses per tot el SNC amb poca variació entre zones.
6. Cada cèl·lula ocupa un territori definit.
7. Sota condicions patològiques, pateixen una transformació, atès que adquireixen una morfologia ameboide, semblant a l'observada durant el desenvolupament del SNC.
8. La micròglia té la capacitat de migrar, proliferar i fagocitar.

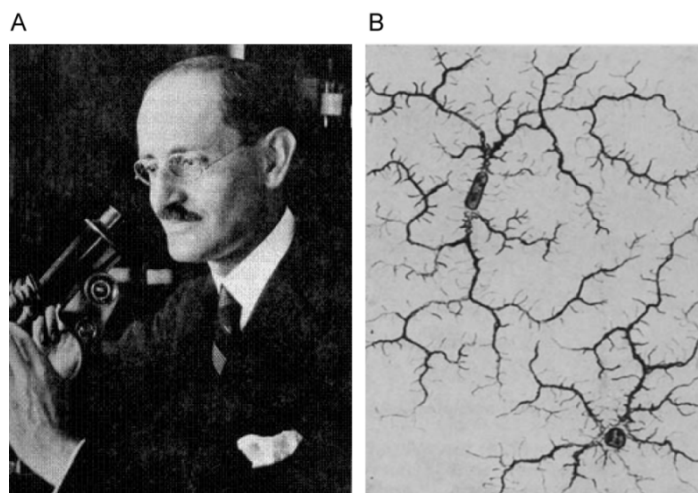


Figura 1. A. Pío del Río-Hortega (1882-1945). B. Imatge de cèl·lules microglijals ramificades dibuixades per del Río-Hortega. Adaptada de (Kettenmann et al, 2011)

Tot i que fins a principis dels anys 90 se'n va qüestionar la seva existència (Graeber & Streit, 2010), les cèl·lules microglijals han esdevingut un important focus d'investigació en el camp de la neurociència durant els últims anys, pel seu paper al SNC tant en condicions fisiològiques com patològiques. L'objectiu d'aquesta tesi

és doncs seguir aprofundint en el coneixement de la micròglia, així com dels factors que contribueixen i controlen la seva activació.

1.1 Les cèl·lules de la micròglia.

Tradicionalment, les cèl·lules microglijals han estat considerades simples macròfags del SNC (Kettenmann et al, 2011) (Ginhoux et al, 2010), principals efectores d'una resposta inflamatòria, vista majoritàriament com a perjudicial o patològica en condicions cròniques. Aquesta creença ha provocat que durant molt de temps s'estudiés i s'entengués la micròglia extrapolant el comportament dels macròfags. No obstant, tot i compartir trets amb els monòcits circulants i macròfags d'altres teixits com ara marcadors de superfície, receptors de reconeixement de patògens i molècules associades a perill, vies de senyalització intracel·lular involucrades en immunitat innata i, per sobre de tot, la capacitat de fagocitar detritus (*debris*) així com l'alliberació de mediadors proinflamatoris, les cèl·lules microglijals presenten un origen diferent i constitueixen una població cel·lular de vida llarga que s'autorenova al parènquima del SNC.

1.1.1 Origen i diferenciació:

L'origen de la micròglia, així com el seu llinatge, han estat motiu de controvèrsia des de que estudis inicials varen descriure la presència de cèl·lules microglijals durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari. Aquest fet, suggeria l'existència de progenitors embrionaris, que del Río-Hortega va descriure en un primer moment com a macròfags localitzats a les meninges que s'infiltraaven al SNC durant el creixement de l'embrió. No obstant, gran part de la comunitat científica de l'època, incloent-hi el mateix del Río-Hortega, també creia que la micròglia podia derivar dels monòcits sanguinis circulants (Ginhoux & Prinz, 2015). Malgrat tot, estudis recents han pogut monitoritzar aquests progenitors i establir-ne l'origen. Així, actualment se sap que "l'hematopoesi primitiva" es produeix al voltant del dia E7.5 (de l'anglès, *embryonic day 7.5*) al sac vitel·lí dels ratolins, en contraposició a



la generació de les cèl·lules mare hematopoètiques definitives que té lloc a la regió de l'aorta-gònades-mesonefres (AGM) de l'embrió al voltant del dia E10.5. Això, juntament amb el coneixement que aquestes últimes migren al fetge fetal i a la medul·la òssia on es diferencien a monòcits, macròfags i limfòcits, entre d'altres, en el procés anomenat "hematopoesi definitiva" (Bertrand et al, 2005), ha fet possible traçar el procés de la colonització microglial del SNC (Figura 2).

Una de les eines emprades amb aquest objectiu són els ratolins que resulten del creuament de la soca Runx1-MER-Cre-MER, que expressa la recombinasa induïble amb Tamoxifen sota el control del promotor de Runx1, amb ratolins Rosa26^{R26R-eYFP/R26R-eYFP}. En aquests animals, les cèl·lules Runx1 positives de l'embrió expressen de manera irreversible la proteïna fluorescent YFP (de l'anglès *yellow fluorescent protein*), 12h després d'injectar Tamoxifen a femelles embarassades. Tot i que les cèl·lules progenitores Runx1⁺ es troben tant al fetge fetal com al sac vitel·lí, a dia E7.5 només aquest últim les presenta. Per tant, una injecció de Tamoxifen realitzada a la mare en aquest punt del desenvolupament embrionari provocarà el marcatge fluorescent, irreversible i selectiu dels progenitors del sac vitel·lí, així com de les cèl·lules que d'ells en derivin. Atès que s'observa una gran proporció de micròglia fluorescent que es correlaciona amb la de macròfags del sac vitel·lí marcats en aquells embrions o ratolins adults que varen ser activats entre els dies E7.25 i E7.5, alhora que el percentatge de monòcits circulants i de macròfags YFP⁺ d'altres teixits és pràcticament nul, es pot establir doncs, el sac vitel·lí com el lloc d'origen dels progenitors microglials. En canvi, l'administració de Tamoxifen a dies E8.5, E9.5 i E10.5 resulta en una proporció elevada de leucòcits fluorescents i en un descens molt acusat de la micròglia YFP⁺, fet que demostra una quasi nul·la contribució de l'hematopoesi definitiva a la població microglial.

La colonització del neuroepiteli per part de la micròglia però, no es produeix fins a la formació de vasos sanguinis funcionals a dia E9, com així han demostrat experiments realitzats amb animals als quals l'expressió del gen Ncx-1 ha estat eliminada. A aquests animals genoanul·lats els manca un batec del cor i un



sistema circulatori funcional com a conseqüència de la deleció de l'intercanviador 1 de calci i sodi (Ncx-1). Per tant, tot i que no s'observen diferències pel que fa al nombre de macròfags del sac vitel·lí, entre els dies E9.5 i E10.5 no es detecta micròglia al cervell del ratolins Ncx-1^{-/-} encara que la població microglial és ja substancial al SNC dels animals Ncx-1^{+/+}. Aquests resultats suggereixen doncs, que els progenitors Runx1⁺ migren des del sac vitel·lí fins al cervell a través dels vasos sanguinis entre els dies E8.5 i E9.5 (Ginhoux et al, 2010).

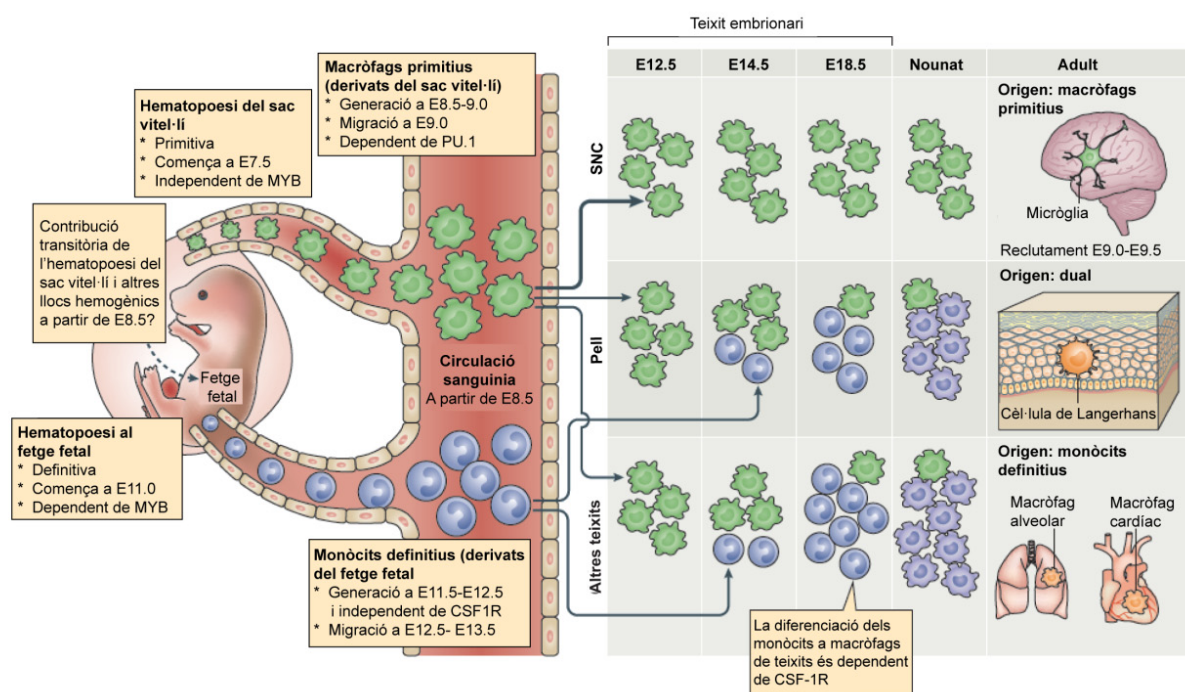


Figura 2. Desenvolupament dels macròfags durant l'etapa embrionària. A partir dels dies E8.5-9.0, l'onada de progenitors primitius hematopoètics generats a les illes del sac vitel·lí dona lloc als macròfags primitius del sac vitel·lí. La propagació i colonització de tot l'embrió per part d'aquests macròfags es produeix una vegada establerta la circulació sanguínia. L'hematopoesi del fetge fetal dona lloc als monòcits que al llarg dels dies E11.5-E12.5 migren al sistema circulatori i al voltant dels dies E13.5-14.5, uns dies més tard que els macròfags del sac vitel·lí, envaeixen els teixits de l'embrió. Un cop dins dels teixits, els monòcits del fetge fetal proliferen i es diferencien a macròfags diluint marcadament la població dels macròfags del sac vitel·lí. Excepcions d'aquest procés són la micròglia, que deriva majoritàriament del sac vitel·lí o les cèl·lules de Langerhans que tot i derivar majoritàriament del fetge fetal mantenen un component important del sac vitel·lí. Adaptada de (Ginhoux & Jung, 2014).

Aquests precursors són cèl·lules eritromieloides CD45⁻ i ckit⁺ que experimenten un procés de desenvolupament i diferenciació complex abans d'esdevenir la població microglial definitiva. Un procés regulat a nivell transcripcional pel factor de transcripció PU.1, l'ARNm del qual s'expressa durant tot el desenvolupament microglial, com així demostren experiments realitzats amb animals genoanul·lats on s'observa una manca total de cèl·lules microgials al parènquima embrionari. Altres ratolins modificats han revelat també un paper important d'Irf8. Aquest factor de transcripció resulta essencial per a la supervivència de la microglia durant les primeres etapes de la microgliogènesi, ja que l'eliminació de la seva expressió es tradueix en un augment de les cèl·lules microgials apoptòtiques annexina V positives i per tant la població microglial embrionària disminueix molt significativament (Kierdorf et al, 2013).

Una altra diferència que cal destacar entre la microglia i els monòcits és el paper del receptor CSF-1R i els seus lligands durant el desenvolupament d'aquests tipus cel·lulars. Així, mentre que al ratolí adult CSF-1 i CSF-1R controlen el procés de diferenciació de la majoria de macròfags, durant l'embriogènesi la seva expressió només és necessària per al desenvolupament de les cèl·lules microgials i dels macròfags del sac vitel·lí, però no per al dels monòcits. L'expressió de CSF-1R es manté elevada durant el desenvolupament embrionari i la seva deleció redueix marcadament el desenvolupament microglial. El resultat és que no hi ha cèl·lules microgials durant la vida adulta del ratolí. En canvi, la microglia sí que es desenvolupa i el seu nombre no es veu alterat en absència de CSF-1 (Ginhoux et al, 2010). Això, suggereix la presència d'un segon lligand de CSF-1R, la interleucina 34 (IL-34).

Al cervell, les neurones expressen específicament IL-34, predominantment a l'escorça, l'hipocamp i el bulb olfatori anterior i en ratolins adults genoanul·lats s'observa una marcada disminució de les cèl·lules microgials, sobretot en aquestes regions. No obstant, durant el desenvolupament embrionari el nombre d'aquestes cèl·lules no resulta alterat. Així doncs, aquestes dades atribueixen a la IL-34 un paper en l'homeòstasi microglial en certes àrees del cervell adult, però no



en el desenvolupament i la diferenciació dels progenitors microgials (Greter et al, 2012) (Wang et al, 2012b). Finalment, un altre factor implicat en la microgliogènesi és TGF- β , ja que la seva absència tampoc afecta als progenitors microgials, però a partir del dia E14.5 el nombre de cèl·lules microgials comença a disminuir fins al punt de desaparèixer totalment al cervell adult.

L'heterogeneïtat ontogènica dels macròfags porta inevitablement a la formulació de la pregunta: per què els monòcits derivats del fetge fetal no contribueixen a la població microglial? Una primera explicació podria ser una manca de potencial per part dels monòcits fetals per a diferenciar-se a progenitors microgials. No obstant, una segona hipòtesi com ara la impossibilitat d'accedir al teixit cerebral sembla més plausible. Atès l'origen dual de les cèl·lules de Langerhans (Figura 2), sembla que el potencial de diferenciació no és intrínsec a l'origen hepàtic o vitel·lí, si no que depèn de factors extrínsecs dels teixits on es diferenciaran els progenitors. En el cas del cervell, el factor determinant sembla ésser la formació de la barrera hematoencefàlica a dia E13.5 coincidint amb la migració a través de la sang dels monòcits del fetge fetal, però posterior a l'entrada dels precursors del sac vitel·lí al neuroepitel·li (Figura 3) (Ginhoux & Jung, 2014) (Ginhoux et al, 2013).

Aquest aïllament roman en condicions fisiològiques, ja que la microglia és una població cel·lular que s'autorenova sense la contribució de progenitors externs al SNC, tal i com demostren estudis realitzats amb ratolins parabionts. La parabiosi permet obtenir animals quimèrics a nivell de sang perifèrica sense utilitzar radiació, intercanviant completament tot el volum sanguini 10 dies després d'haver unit quirúrgicament els sistemes circulatoris de dos ratolins (Ajami et al, 2007). D'aquesta manera, la unió d'un animal mutant que expressa la proteïna fluorescent verda, GFP, a les cèl·lules del llinatge mieloide amb un ratolí no mutat resulta una bona eina per a estudiar la infiltració al SNC en aquest últim. En condicions fisiològiques, el ratolí receptor no presenta cèl·lules microgials GFP positives, els macròfags hepàtics però, sí que expressen aquesta proteïna. El mateix resultat s'obté en condicions de microgliosi, tant aguda (axotomia de motoneurons facials)



com crònica (esclerosi lateral amiotròfica) on no s'observa una ruptura de la barrera hematoencefàlica.

Aquests resultats són oposats als reportats amb anterioritat a altres estudis, on animals irradiats i posteriorment trasplantats amb medul·la òssia d'un donant transgènic presenten cèl·lules microgials permanents derivades de progenitors infiltrats. No obstant, en aquest disseny experimental hi ha dos factors que poden portar a la reposició de les cèl·lules microgials per part dels precursors infiltrats. En primer lloc, la ruptura de la barrera hematoencefàlica, com a conseqüència de la radiació aplicada, pot facilitar l'entrada de les cèl·lules circulants que d'altra manera no podrien entrar. En segon lloc, les cèl·lules amb potencial per a diferenciar-se i formar part de la població microgial resident, localitzades a la medul·la òssia però

que en condicions fisiològiques no es mobilitzarien al torrent sanguini, són aïllades mecànicament i injectades al sistema circulatori durant el trasplantament (Ginhoux et al, 2010) (Ajami et al, 2007).

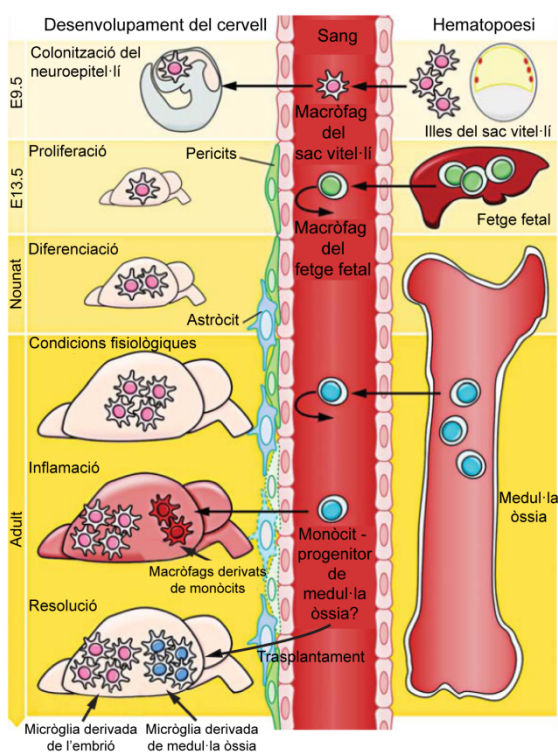


Figura 3: Desenvolupament del cervell i ontogènia de la microglia. Els macròfags primitius generats al sac vitel·lí al voltant del dia E8.0 colonitzen l'embrió una vegada establerta la circulació sanguínia al voltant d'E8.5 i envaeixen el neuroepitel·li a E9.0-E9.5 donant lloc a la microglia embrionària. En paral·lel, l'hematopoesi definitiva es produeix a la zona AGM i dona lloc als progenitors que colonitzen el fetge fetal a dia E10.5. La barrera hematoencefàlica comença a establir-se a partir del dia E13.5 i aïlla el cervell, primerament de la contribució hematopoètica del fetge fetal i posteriorment de la medul·la òssia. La microglia embrionària s'expandeix colonitzant tot el SNC, i la població es manté

per proliferació *in situ* durant el desenvolupament post-natal i l'edat adulta tant en condicions fisiològiques com d'inflamació. No obstant, sota certes condicions inflamatòries els monòcits poden infiltrar-se i transitòriament contribuir a la població microgial, ja que només un trasplantament de progenitors de la medul·la òssia hi contribueix a llarg termini. Adaptada de (Ginhoux & Prinz, 2015).

Així, els monòcits sanguinis són capaços d'infiltrar-se al SNC durant la patologia de la EAE (de l'anglès, *experimental autoimmune encephalomyelitis*), un model animal d'esclerosi múltiple on la integritat de la barrera hematoencefàlica es veu compromesa, i diferenciar-se a macròfags amb un fenotip que no és distingible del de les cèl·lules microgials residents. No obstant, s'observa que aquesta colonització és transitòria, ja que aquestes cèl·lules no s'autorenoven i no contribueixen a la població microglial permanent (Figura 3) (Ajami et al, 2011) (Goldmann et al, 2013).

1.1.3 Paper de la micròglia al SNC:

1.1.3.1 Funcions durant l'homeòstasi:

Tot i haver esdevingut objecte de nombrosos estudis i haver despertat un gran interès dins de la investigació en el camp de la neurociència durant els últims 20 anys, la micròglia continua sent una gran desconeguda, sobretot a l'hora de descriure el seu paper al SNC de individus sans. No obstant això, resultats obtinguts durant els últims anys han revelat funcions microgials indispensables tant pel desenvolupament del cervell com pel seu funcionament normal.

Mort neuronal. La mort cel·lular programada (en anglès, *Programmed Cell Death*) o mort apoptòtica és un procés mitjançant el qual les cèl·lules moren de manera natural i programada amb l'objectiu de construir l'arquitectura característica del teixit o circuit madur. Als vertebrats, durant el desenvolupament del SNC, aproximadament el 50% de les neurones experimenten aquesta mort programada, creant la necessitat d'eliminar els seus cossos cel·lulars per a mantenir l'homeòstasi del cervell (Schafer & Stevens, 2015). La micròglia és l'encarregada de dur a terme aquesta tasca fagocitant les neurones mortes. No obstant, estudis recents suggereixen que aquesta no és l'única funció microglial i atribueixen un paper més actiu a les cèl·lules de la micròglia, el de iniciar o fins i tot el de propagar la mort neuronal programada. El primer indicatiu, descrit durant el desenvolupament



embrionari de la retina de pollastre, postula al factor neurotròfic NGF (de l'anglès, *Nerve growth factor*), secretat per la micròglia, com a inductor de la mort neuronal en unir-se i activar el receptor p75, localitzat a les neurones de la retina en desenvolupament (Frade & Barde, 1998). A dia post-natal 3, l'eliminació de la micròglia al cerebel de ratolí resulta en una disminució de la mort de les cèl·lules de Purkinje. Aquest efecte citotòxic micròglial està mediat per les espècies reactives d'oxigen produïdes (en anglès, *reactive oxygen species* o ROS) per la cadena respiratòria de les cèl·lules de la micròglia (Marin-Teva et al, 2004). La producció microglial de l'anió superòxid possiblement és controlada pel receptor d'integrines CD11b i la proteïna transmembrana adaptadora de transducció de senyal DAP12 que actuen, mitjançant la mateixa via, promovent la mort apoptòtica durant el desenvolupament de l'hipocamp (Figura 4A, a) (Wakselman et al, 2008). A més, tincions histològiques mostren que el 60% de les cèl·lules de Purkinje i el 51% de les neurones de l'hipocamp que contacten amb les ramificacions microglials expressen la molècula associada al dany cel·lular caspasa-3, suggerint la inducció de la mort cel·lular per part de la micròglia en neurones prèviament vulnerables (Marin-Teva et al, 2004) (Wakselman et al, 2008). A més, tot i que el fenotip ameboide és tradicionalment associat a la fagocitosis microglial, a la zona subgranular de l'hipocamp, la micròglia ramificada és l'encarregada d'eliminar les neurones que moren durant la neurogènesi adulta, mantenint així la cascada neurogènica. No obstant, el contacte microglial no sembla indispensable per a la inducció de l'apoptosi neuronal a l'hipocamp adult. Així doncs, tot i que no es pot descartar la seva implicació, la micròglia no és l'única efectora del procés apoptòtic neuronal. Altres factors desconeguts també poden induir la mort de les neurones, abans d'ésser fagocitades per les cèl·lules microglials (Figura 4A, B) (Sierra et al, 2010).

Supervivència neuronal. Durant la neurogènesi, les neurones necessiten suport tròfic del seu entorn per a establir els circuits neurals i les que no n'obtenen prou no poden integrar-se a les xarxes neuronals i acaben morint. Al llarg de la primera setmana post-natal, la micròglia afavoreix la supervivència de determinats tipus de



neurones, com ara les corticals localitzades a la capa V del neocòrtex, mitjançant la via de senyalització CX3CL1-CX3CR1 i l'alliberament de IGF-1, doncs tant l'ablació de CX3CR1 com la inhibició de IGF-1 resulten en la mort d'aquestes neurones (Figura 4B) (Ueno et al, 2013).

Sinaptogènesi. Les ramificacions microgials presenten una alta motilitat, fins i tot al cervell sa, i mantenen contactes freqüents, encara que transitoris, amb les sinapsis neuronals (Wake et al, 2009). En ratolí, durant el desenvolupament d'aquestes, la micròglia fagocita material sinàptic, eliminant així les sinapsis redundants, en un procés anomenat *synaptic pruning*. Aquest procés resulta essencial per al desenvolupament normal del cervell, ja que és crític per a establir una xarxa neuronal funcional i madura i està controlat en part per la via de la senyalització de la fractalquina (CX3CL1), que promou la migració i la proliferació microgial. Així, ratolins deficients en CX3CR1, el receptor de la fractalquina, presenten un excés d'espines dendrítiques i sinapsis immadures com a conseqüència d'una davallada transitòria en el nombre de cèl·lules microgials i d'un retard en l'eliminació sinàptica (Paolicelli et al, 2011). Un altre mecanisme que participa en el refinament sinàptic per part de la micròglia és la via del complement. Durant el desenvolupament de la retina, la citocina TGF- β secretada pels astròcits regula l'expressió neuronal de C1q, la proteïna que inicia la cascada de senyalització de la via clàssica del complement. C1q augmenta l'expressió de C3, la proteïna clau de la via i lligand del receptor CR3 localitzat a la membrana microgial, promovent així l'activació de la funció fagocítica. Experiments realitzats amb ratolins on l'expressió de TGF β RII, C1q i C3 ha estat eliminada, confirmen la implicació de la via, ja que tots tres models de ratolins genoanul·lats presenten un excés de connexions sinàptiques com a conseqüència d'una disrupció de la funció fagocítica microgial (Bialas & Stevens, 2013) (Stevens et al, 2007).

Però, com saben les cèl·lules microgials quines sinapsis cal eliminar? Tot i que encara no es disposa de prou dades per a establir la sincronització exacta dels esdeveniments, sembla que la micròglia és reclutada per les sinapsis menys



actives per a fagocitar-les, afavorint així la maduració d'aquelles connexions sinàptiques més fortes (Figura 4C) (Schafer et al, 2012).

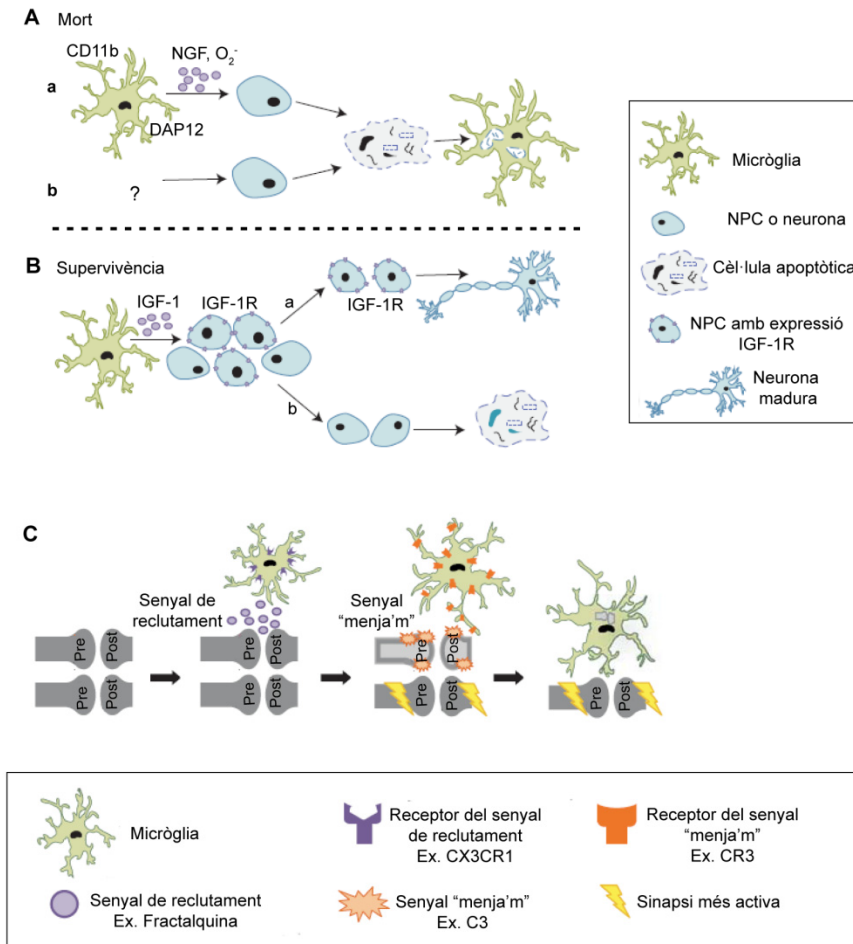


Figura 4. A. Paper de la micròglia en la mort apoptòtica. a. La micròglia pot induir la mort cel·lular mitjançant varis factors solubles (Ex. NGF i O₂⁻) o expressats a membrana (Ex. CD11b i DAP12) per fagocitar a continuació les cèl·lules mortes. b. Alternativament, la mort neuronal pot ésser induïda per factors desconeguts seguida de la fagocitosis microglial. B. La micròglia també pot promoure la supervivència neuronal secretant el factor soluble IGF-1 que s'uneix al receptor neuronal IGF-1R. Es creu que les cèl·lules que expressen aquest receptor (a) sobreviuen, mentre que les que no ho fan moren (b). C. Paper de la micròglia en la remodelació de les sinapsis durant el desenvolupament. El model suggereix que una senyal, com ara la fractalquina, recluta la micròglia al voltant de les sinapsis en desenvolupament. Les sinapsis menys actives (gris clar) són marcades a nivell molecular amb una senyal "menja'm" (*eat-me*), C3 i són eliminades per les cèl·lules microgials que expressen receptors per a la senyal "menja'm", CR3. Adaptada de (Schafer & Stevens, 2015).



No obstant, durant l'edat adulta la micròglia no només participa en l'eliminació d'espines dendrítiques, si no que també juga un paper en la seva formació mitjançant el factor neurotròfic BDNF. La seva eliminació selectiva a la micròglia redueix la formació d'espines dendrítiques induïda per l'aprenentatge i afecta a la plasticitat sinàptica a través de la via de senyalització del receptor sinàptic TrkB (Parkhurst et al, 2013). Un resultat semblant, s'observa quan es deleciona el polipèptid integral de membrana KARAP/DAP12, expressat només a la micròglia al SNC. En absència de KARAP/DAP12 es produeix una important reducció de l'expressió de TrkB que resulta en un deteriorament de la transmissió glutamatèrgica i la plasticitat sinàptica (Roumier et al, 2004). Així doncs, KARAP/DAP12 podria influir en la secreció microglial de BDNF, lligand del receptor sinàptic TrkB, establint així un control per part de la micròglia sobre aquesta via de senyalització.

1.1.3.2. Funcions durant l'alteració de l'homeòstasi:

La micròglia, i en menor mesura els astròcits, respon a qualsevol alteració de l'homeòstasi del SNC. Aquesta resposta, rep el nom d'activació glial. No obstant, el terme "activació" és ambigu i enganyós, ja que sorgeix de l'observació del canvi morfològic que pateixen les cèl·lules microgials en condicions patològiques i indirectament assigna a la micròglia un rol passiu i quiescent en condicions d'homeòstasi, que només desperta en presència d'una pertorbació. Així doncs, els conceptes "micròglia quiescent" i "micròglia activada", heretats dels estudis realitzats en macròfags, resulten obsolets, ja que en condicions fisiològiques els processos microgials presenten una gran motilitat i rastregen constantment el parènquima cerebral (Davalos et al, 2005).

El fenotip de les cèl·lules microgials enfront d'una alteració al SNC també ha estat anomenat seguint allò prèviament descrit en el cas dels macròfags. Així, durant anys s'ha parlat de la polarització microglial induïda per citocines pro- i antiinflamatòries cap als fenotips proinflamatori M1 o antiinflamatori M2, també



anomenats activació clàssica i activació alternativa, respectivament (Cherry et al, 2014a). La nomenclatura M1/M2 és paral·lela a l'emprada per a les cèl·lules Th1 i Th2, ja que l'IFN γ produït per les cèl·lules Th1 és un estímul important per a la polarització dels macròfags cap al fenotip M1, així com la interleucina IL-4 de les Th2 és clau per la inducció del fenotip M2 (Martinez & Gordon, 2014).

Així doncs, estímuls amb receptors, origen i vies de senyalització diferents com l'IFN γ , el LPS i el TNF α , promouen l'activació M1. En aquesta activació clàssica, els receptors MHC II, CD86 i Fc γ presenten un augment de la seva expressió, perquè els efectes funcionals d'aquesta resposta pro-inflamatòria s'orienten cap a la presentació d'antígens i l'eliminació intracel·lular de patògens. A més, la producció d'interleucines i citocines juntament amb la d'espècies reactives d'oxigen i nitrogen també constitueix un marcador per a identificar les cèl·lules inflamatòries. Així, una concentració elevada de IL-12, un augment de la producció de IL-1 β , IL-6, IL-23 entre d'altres, un increment de l'expressió dels enzims NOS2 i COX2, la producció de les citocines IFN γ i TNF α , així com una disminució de la concentració de IL-10, són marcadors d'una resposta pro-inflamatòria.

Pel que fa al fenotip M2, no hi ha una única classificació de marcadors i aquest estat actualment es subdivideix en tres fenotips. No obstant, tot i les diferències entre ells, tots comparteixen l'expressió de molècules o receptors amb la capacitat de disminuir la resposta pro-inflamatòria, així com la de reparar el dany produït per aquesta al teixit.

El primer dels tres sub-fenotips, anomenat M2a o alternatiu, és induït com a resposta a l'estimulació amb IL-4 o IL-13. Un dels marcadors d'aquest fenotip més ben caracteritzats és l'arginasa 1 que converteix l'arginina en poliamines que contribueixen a la curació de ferides provocades per la inflamació. Curiosament, l'arginina també és substrat de l'enzim NOS2. Així doncs, l'arginasa 1 pot competir amb aquest enzim i disminuir la producció d'òxid nítric (NO) conduint així a la transició de l'estat M1 al M2. Altres marcadors d'aquest genotip són les proteïnes



Ym1, FIZZ1 i IGF-1, el factor de transcripció PPAR γ i el receptor de manosa CD206.

Un altre estat d'activació M2 és l'anomenat M2c induït per IL-10, glucocorticoides o TGF β . Aquest fenotip inicialment anomenat "desactivat" regula la remodelació i la reparació del teixit després d'una resposta inflamatòria, secretant proteïnes de la matriu cel·lular com ara la pentraxina i el proteoglicà versican. Aquestes cèl·lules també presenten una marcada producció de TGF β , així com l'expressió de molècules antiinflamatòries com CXCL13 i SOCS3 i comparteixen amb l'estat M2a els marcadors Arg1 i CD206.

Finalment, el tercer i menys comprès fenotip, M2b, és el més semblant a l'estat proinflamatori M1, ja que no expressa cap marcador típic M2 com Arg1 o CD206, tot i mantenir la característica producció de IL-10 (elevada) i IL-12 (reduïda), alhora que presenta una elevada producció de citocines pro-inflamatòries com IL-1 β , IL-6 i TNF α . L'alta expressió de MHC II i CD86, també contribueix a la identificació d'aquest genotip (Figura 5).

No obstant, cal remarcar que gran part de les dades obtingudes per a classificar els estats de polarització microglial provenen d'estudis realitzats *in vitro*, on els estímuls inductors dels diferents fenotips s'administren per separat, i d'extrapolacions d'allò observat a macròfags perifèrics. Per tant, és probable que en condicions *in vivo* els fenotips M1 i M2 coexisteixin, fins i tot en una mateixa cèl·lula, generant una població de cèl·lules microgials heterogènia amb diferents graus d'activació la suma dels quals definirà la resposta microglial. Així doncs, tot i la òbvia utilitat d'un sistema de classificació, la dicotomia M1/M2 és cada vegada més qüestionada, doncs davant d'una diversitat d'estímuls és d'esperar un ampli ventall de respostes funcionals (Martinez & Gordon, 2014) (Cherry et al, 2014b) (Franco & Fernandez-Suarez, 2015).



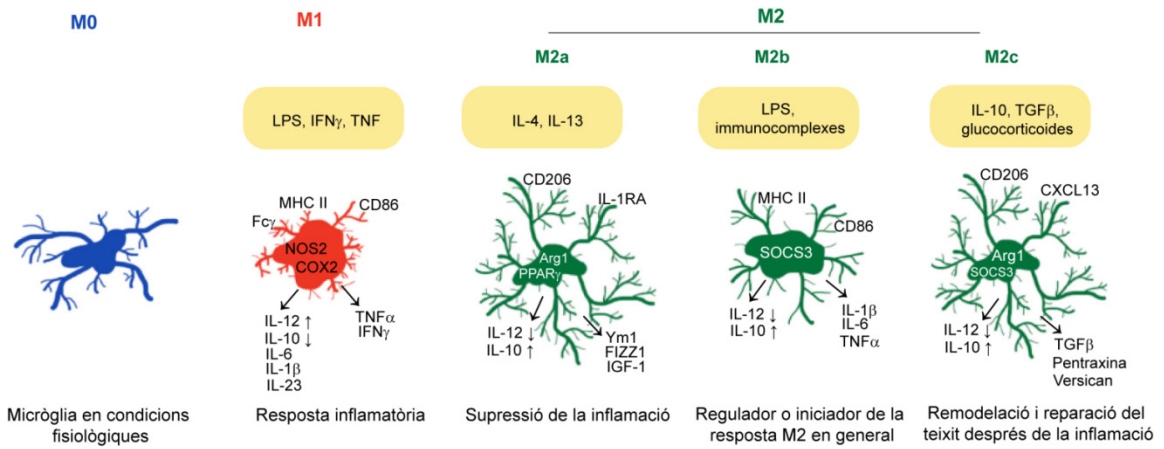


Figura 5. Representació esquemàtica dels estat de polarització microglial, així com d'alguns marcadors que els caracteritzen. Es detalla també la morfologia i la funció principal de cada estat.

Fagocitosi. (Del grec *phagein* menjar i *kytos* cèl·lula) descriu el reconeixement, la internalització i la degradació de partícules, organismes o estructures. Juntament amb la inflamació, la fagocitosi compon la primera línia de defensa de la resposta immune innata, que al SNC duu a terme la micròglia. El procés de fagocitosi s'inicia quan la cèl·lula microglial troba una diana de manera aleatòria o per acció de senyals "troba'm" ("*find-me*") provinents de la diana que atrauen els fagòcits. La micròglia disposa de diferents receptors de membrana que reconeixen mitjançant les senyals "menja'm" ("*eat-me*") allò que cal fagocitar. En funció dels tipus de dianes que detecten, aquests receptors es poden agrupar en dos grans grups: els que reconeixen patògens (*PAPMs*, *pathogen-associated molecular pathways*) o els que identifiquen senyals de dany cel·lular (*DAMPs*, *damage-associated molecular pattern molecules*) (Sierra et al, 2013). Dins la primera categoria es troba la família de receptors TLR (de l'anglès, *Toll-like receptor*) que reconeixen molècules estructurals de patògens, com el LPS bacterià o els nucleòtids dels virus, alhora que estimulen la resposta pro-inflamatòria de la micròglia. No obstant, aquests receptors també distingeixen molècules associades a perill com α -sinucleïna (Fellner et al, 2013) i les fibres de β -amiloide (Song et al, 2011)) i per tant també es poden incloure a la segona categoria, on es troben receptors com ara BAI-1, TIM-1

i TIM-4, que reconeixen la fosfatidilserina expressada a la membrana de cèl·lules apoptòtiques.

Però no només per reconeixement directe de les dianes es pot iniciar la fagocitosi, si no que, anticossos com IgG o proteïnes del complement com C3 mitjançant l'opsonització de partícules o organismes promouen la seva internalització a través dels receptors Fc i CR3 respectivament (Sierra et al, 2013).

Finalment, d'entre els receptors microgials implicats en el procés de la fagocitosi, cal destacar-ne TREM2 que com en el cas dels receptors TLRs respon tant a senyals PAMP com DAMP (Painter et al, 2015). TREM2 és membre de la família de receptors de les immunoglobulines i interacciona amb la proteïna de transmembrana DAP12. L'eix TREM2-DAP12 inhibeix la resposta pro-inflamatòria induïda per TLR4 en presència de LPS, ja que el seu silenciament resulta en l'augment de citocines pro-inflamatòries, com IL-1 β o IL-6, mentre que la seva sobreexpressió en disminueix la producció (Zhong et al, 2015). Estudis *in vitro* emprant una línia cel·lular d'ovari de hámster han demostrat que l'expressió de l'eix TREM2-DAP12 és suficient per a induir la fagocitosi de bacteris en un tipus cel·lular considerat tradicionalment com a no fagocític (N'Diaye et al, 2009). Així, en presència o sobreexpressió de TREM2-DAP12, hi ha una major eliminació de neurones apoptòtiques i A β , mentre que la seva ablació es correlaciona amb un procés fagocític defectuós (Takahashi et al, 2005), (Jiang et al, 2014).

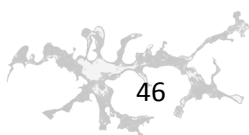
Durant l'envelliment s'observa una disminució de la capacitat fagocítica microgial (von Bernhardi et al, 2015). De fet, a la malaltia d'Alzheimer receptors implicats en el reconeixement d'A β , com CD36, SRA i RAGE veuen disminuïda la seva expressió a mesura que la malaltia progressa i la micròglia envelleix. A més, la degradació d'A β també es veu compromesa, ja que la producció dels enzims implicats en la seva eliminació, insulisin, neprilisina i MMP9, es veu reduïda. Així doncs, tot i que en estadis inicials de la patologia, les cèl·lules microgials s'agrupen al voltant de les plaques d'A β amb l'objectiu d'eliminar aquests dipòsits neurotòxics, amb l'edat la funció fagocítica es malmet i la incapacitat de fagocitar i



degradar els agregats promou la mort neuronal i per tant la progressió de la malaltia (Hickman et al, 2008).

Contràriament, en el cas de les malalties priòniques, experiments realitzats en el model priònic murí ME7 mostren un augment de l'expressió dels gens implicats en la maquinària fagocítica i proteolítica com ara SRA, CD68, CD36 i RAGE i MMP3, MMP9 i MMP12, respectivament. De fet, la micròglia priònica és capaç d'internalitzar un nombre major de partícules de làtex de 6 μm de diàmetre en comparació amb la micròglia control. Aquests resultats semblen indicar que la capacitat fagocítica microglial en aquesta patologia no està alterada encara que la micròglia no és capaç d'eliminar els agregats de PrP^{Sc} presents al teixit (Hughes et al, 2010). Estudis anteriors, proposen un paper inhibidor de la fagocitosi per part de la pròpia proteïna priònica, ja que la micròglia, tot i envoltar amb les seves ramificacions partícules de làtex recobertes amb agregats de PrP^{Sc} , no és capaç d'internalitzar-les. Aquest fet suggereix una interferència de la proteïna priònica en el procés de fusió de la membrana que no permet la internalització final de la partícula (Ciesielski-Treska et al, 2004).

L' α -sinucleïna és un pèptid neuronal localitzat majoritàriament als terminals pre-sinàptics i el component principal dels dipòsits intracel·lulars de proteïnes fibril·lars anomenats cossos de Lewy. Aquests estan implicats en varies patologies neurodegeneratives com la malaltia de Parkinson i la demència de cossos de Lewy, també anomenades sinucleinopaties. L'acumulació d' α -sinucleïna és especialment tòxica per a les neurones dopaminèrgiques de la substància negra i resulta en la seva mort, així com en la pèrdua de fibres a l'estriat, fet que provoca dèficits motors. Com a fagòcits del SNC, les cèl·lules de la micròglia són les encarregades d'eliminar els dipòsits extracel·lulars. El receptor TRL4 sembla implicat en aquest procés, ja que la seva expressió augmenta a les sinucleinopaties i l'eliminació de l' α -sinucleïna disminueix en ésser silenciada contribuint a l'avenç de la patologia. Aquests resultats indiquen novament que cal una funció fagocítica microglial no compromesa per a dur a terme una eliminació eficient (Stefanova et al, 2011). Així doncs l'acumulació d' α -sinucleïna observada



en progressar les sinucleinopaties pot ésser resultat d'un mal funcionament microglial derivat de l'envelliment o d'una predisposició genètica entre d'altres. De fet, la pròpia α -sinucleïna, com en el cas de la proteïna priònica, podria ser responsable del deteriorament de la funció fagocítica, atès que existeixen dues formes d'aquesta proteïna amb propietats diferents: la forma monomèrica soluble i la forma agregada insoluble. Així, l' α -sinucleïna monomèrica present a l'espai extracel·lular afavoreix la fagocitosi microglial i ajuda al seu manteniment, mentre que la forma agregada inhibeix tant la funció fagocítica basal com la induïda per la forma monomèrica (Park et al, 2008a). Un estudi recent descriu com a mecanisme d'aquesta inhibició la unió de la forma agregada d' α -sinucleïna al receptor inhibidor Fc γ RIIB que al seu torn recluta a la fosfatasa SHP-1, la funció de la qual és inhibir la via de senyalització dels receptors Fc γ R i per tant la funció fagocítica microglial (Choi et al, 2015).

La migració de les cèl·lules fagocítiques al lloc de lesió juntament amb l'eliminació de les restes de mielina i les cèl·lules apoptòtiques estimula la regeneració axonal. Al model animal de l'esclerosi múltiple, EAE, la inducció de l'expressió del receptor TREM2, un cop observats els primers indicis de la malaltia, facilita la fagocitosi de les cèl·lules apoptòtiques induint una resposta antiinflamatòria. Aquesta es caracteritza per una disminució de l'expressió de citocines proinflamatòries i per un augment de la producció d'IL-10, fet que resulta en una reducció de la simptomatologia patològica (Takahashi et al, 2007).

Finalment, la via CD47-SIRP α també està implicada en la regulació fagocítica al model animal EAE. CD47 és una integrina transductora de senyal que en unir-se al seu receptor SIRP α evita la fagocitosi de les cèl·lules. Així, el bloqueig de CD47 resulta en un augment de la funció fagocítica. A més, l'expressió de CD47 es veu clarament reduïda a les lesions desmielinitzants de pacients amb esclerosi múltiple, mentre que els animals amb ablació total de CD47 són resistents a la inducció de la patologia (Han et al, 2012). Aquests resultats suggereixen de nou la necessitat d'una activitat fagocítica efectiva per a la recuperació de l'esclerosi múltiple. No



obstant, l'avenç de la patologia als pacients afectats suggereix que aquesta no es produeix, tal i com sembla indicar la disminució del nombre de fagòcits al voltant de les lesions a mesura que avança la malaltia (Fu et al, 2014) (Schonrock et al, 1998).

Així doncs, tot i que encara son necessaris més estudis per tal d'aclarir els mecanismes pels quals és controlada la fagocitosi microglial a cada patologia, el que sí sembla ésser un factor comú és el fet que la funció fagocítica està compromesa en moltes malalties neurodegeneratives.

Presentació d'antígens. Els principals tipus cel·lulars presentadors d'antígens són els macròfags, les cèl·lules dendrítiques i els limfòcits B. Aquestes cèl·lules fagociten les seves dianes per a posteriorment desplaçar-se als nodes limfàtics. Allà, mitjançant el receptor de membrana MHC-II exposen les proteïnes exògenes prèviament digerides, o antígens, que són reconegudes pels limfòcits T iniciant així el procés cel·lular de la resposta immune adaptativa (Sierra et al, 2013).

L'esclerosi múltiple i el seu model animal EAE es caracteritzen per la infiltració al SNC de cèl·lules T i el reclutament de cèl·lules mieloides, incloent cèl·lules dendrítiques i macròfags, iniciant d'aquesta manera la resposta inflamatòria, la dismielinització i el dany axonal. No obstant, el mecanisme mitjançant el qual les cèl·lules T reconeixen els epítops de la mielina i inicien la seva resposta dins de la inflamació del SNC no està encara ben establert. L'activació de les cèl·lules T CD4⁺ és un procés complex que requereix, després de la unió a l'antigen mitjançant MHC-II, d'una estimulació posterior duta a terme per molècules co-estimuladores com CD80 o CD86. És difícil saber quin tipus cel·lular duu a terme la reactivació de les cèl·lules T al SNC, ja que tant les cèl·lules presentadores d'antigen citades anteriorment com la micròglia poden expressar MHC-II, CD80 i CD86 i iniciar la patologia del model EAE (Goverman, 2009).

En condicions patològiques severes, la micròglia CD11c⁺ i les cèl·lules dendrítiques presenten nivells d'expressió de MHC-II, CD80 i CD86 equivalents, contràriament a l'expressió quasi negligible al cervell sa, així com una habilitat semblant per a induir

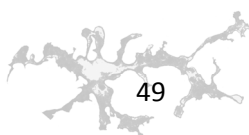


la proliferació de les cèl·lules T. Tot i això, la micròglia CD11c⁺ no produeix les citocines IL-6, IL-12 i IL-23 necessàries per a la inducció de les cèl·lules T Th1 i Th17, alhora que provoca una secreció menor de les citocines d'IL-17a i IFN γ , per part de les cèl·lules T activades en comparació amb les cèl·lules dendrítiques. Aquests resultats posen de manifest la complexitat de la reacció immune al SNC, així com la presència de diferents tipus cel·lulars presentadors d'antígens. Finalment, també demostren la capacitat de la micròglia d'actuar com a tal en condicions patològiques, tot i la seva menor efectivitat en comparació amb macròfags i cèl·lules dendrítiques (Wlodarczyk et al, 2014).

Resposta a tumors. L'anomenat glioblastoma multiforme és un dels tumors humans amb pitjor prognosi, amb una esperança de vida mitjana d'entre 12-15 mesos, ja que és molt agressiu i es caracteritza per una proliferació no controlada, àrees de necrosi, així com una infiltració difosa pel parènquima cerebral sa. Els gliomes són tumors heterogenis d'origen glial, astròcits o oligodendròcits, on la micròglia i els macròfags sanguinis constitueixen la major població de cèl·lules infiltrades al tumor, arribant a representar fins a una tercera part de la massa tumoral total (Coniglio & Segall, 2013).

L'entorn del tumor juga un paper crític en la seva iniciació, invasió i proliferació. Les cèl·lules microgials, antigament considerades com les efectores de la resposta anti-tumoral, contribueixen al creixement i l'expansió del tumor (Yang et al, 2010). A conseqüència del perfil quasi idèntic d'expressió de receptors de membrana de la micròglia i els macròfags, la bibliografia rarament fa distincions entre els dos tipus cel·lulars a l'hora d'estudiar els seus papers diferencials en la progressió tumoral.

La propentofilina (PPF) és un modulador glial que actua directament sobre la micròglia disminuint la seva proliferació i l'expressió de citocines pro-inflamatòries, com IL-1 β i TNF α , en presència de LPS (Si et al, 1998). Un estudi realitzat amb el model de glioblastoma en rata, CNS-1, demostra que l'administració intraperitoneal de PPF provoca una disminució del creixement tumoral, actua sobre la micròglia però no sobre les cèl·lules tumorals, redueix la infiltració i la migració microglial cap



al tumor i disminueix l'expressió de MMP9 per part de les cèl·lules de la micròglia (Jacobs et al, 2012).

MMP9 i MMP2 són les principals molècules promotores de l'expansió tumoral, essent l'expressió de MMP-9 un indicador de mal pronòstic, ja que promou la motilitat del tumor, mentre que la degradació de la matriu extracel·lular per part de MMP2 potencia la invasió tumoral. Tant les cèl·lules microgials com les del glioma poden secretar MMP2. No obstant, aquestes últimes només poden expressar-ne una forma immadura (pro-MMP2) que és processada per la metaloproteïnasa de membrana MT1-MMP localitzada a les cèl·lules de la micròglia. Aquest cas, constitueix un clar exemple de "l'abús" exercit sobre la micròglia per part del glioma, ja que mitjançant un senyal encara no identificat, aquest estimula la via de senyalització del receptor microglial TLR2. Aquest receptor promou l'activitat de la cinasa p38 i el transductor de senyal Myd88 induint així l'expressió de MT1-MMP, fet que resulta en l'expansió i supervivència tumoral facilitada per la micròglia (Markovic et al, 2009) (Vinnakota et al, 2013).

A més, en presència del tumor, les cèl·lules microgials adopten un fenotip antiinflamatori caracteritzat per la producció de TGF β i IL-10. S'ha descrit TGF β com un dels factors que interaccionen amb les cèl·lules mares tumorals afavorint així la seva proliferació i invasió (Ye et al, 2012). Aquesta última citocina també és potenciada per IL-10 que a més promou un entorn immunodeprimit (Coniglio & Segall, 2013). Així doncs, revertir aquesta resposta microglial promoguda per les cèl·lules cancerígenes podria ésser una potencial diana terapèutica, ja que permetria a la micròglia induir una resposta inflamatòria que permetés actuar contra les cèl·lules del glioma (Yang et al, 2010).

Neuroinflamació. La neuroinflamació representa la resposta cel·lular coordinada al dany tissular i es caracteritza per la secreció microglial d'espècies reactives de nitrogen i oxigen, quimiocines i citocines. L'objectiu principal de la resposta



neuroinflamatòria és eliminar l'origen del dany i restaurar l'estat fisiològic del SNC. No obstant, una resposta crònica, no controlada pot derivar en la mort neuronal.

Producció d'espècies reactives de nitrogen (RNS). Als mamífers, l'òxid nítric és sintetitzat principalment per les sintases d'òxid nítric (de anglès, *nítric oxide synthase*, NOS) a partir d' L-arginina (Figura 6). Es poden distingir dues formes de NOS, la constitutiva present a les neurones (nNOS) i a les cèl·lules endotelials (eNOS), l'activitat de la qual depèn de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular, i la induïble (iNOS o NOS2) expressada als astròcits i a la micròglia com a resposta a varis estímuls, controlada a nivell transcripcional i independent de Ca^{2+} (Yuste et al, 2015).

D'entre els diferents estímuls que poden induir l'expressió de NOS2 a les cèl·lules glials destaquen els productes bacterians (LPS) o vírics, varies citocines (IL-1 β , IFN γ i TNF α) o toxines (A β i MPTP) (Saha & Pahan, 2006). En condicions fisiològiques, el NO desenvolupa varies funcions importants al SNC. El NO produït per les neurones adrenèrgiques i les cèl·lules endotelials regula la contracció de la musculatura llisa dels vasos sanguinis, controlant així el flux sanguini cerebral. A més el NO també és necessari per a l'aprenentatge i la consolidació de records, així com en la promoció de la son, on dues de les seves isoformes desenvolupen funcions oposades, ja que nNOS promou una fase REM llarga mentre que iNOS l'escurça (Virarkar et al, 2013). No obstant, nivells elevats de NO al SNC són presents en un gran nombre de trastorns neurodegeneratius. Així, el NO secretat per la micròglia activada actua a l'espai presinàptic bloquejant la recaptació de glutamat, fet que indueix l'activació dels receptors NMDA i provoca la mort neuronal per excitotoxicitat (Rao et al, 2012). La mort neuronal és una característica present a moltes patologies neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer, de Parkinson o l'esclerosi múltiple. El NO juga un paper important en aquestes patologies, ja que pot reaccionar amb els grups tiol de les cisteïnes presents a proteïnes com α -sinucleïna i sinfilina-1 o A β i tau. Aquestes proteïnes S-nitrosilades presenten un plegament anormal formant agregats que afecten al



funcionament de les cèl·lules i inicien vies de senyalització de mort cel·lular a les malalties de Parkinson i Alzheimer, respectivament (Yuste et al, 2015). El paper perjudicial d'iNOS s'ha demostrat al model animal parkinsonià amb MPTP, on l'ablació de la seva expressió permet desenvolupar una resistència a la toxina, fet que resulta en l'absència de simptomatologia patològica (Liberatore et al, 1999). Contràriament, l'eliminació d'iNOS al model animal EAE provoca un agreujament de la simptomatologia mentre que les expressions d'eNOS i nNOS, no presenten un augment que pugui compensar la funció d'iNOS (Sahrbacher et al, 1998).

Producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS). Les espècies reactives d'oxigen són un grup de petites molècules que inclou els radicals d'oxigen: superòxid ($O_2^{\bullet -}$), hidroxil ($^{\bullet}OH$), peroxil (RO_2^{\bullet}) i alcoxil (RO^{\bullet}) i d'altres espècies no radicalàries com l'àcid hipoclorós (HClO), l'ozó (O_3) i el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) (Bedard & Krause, 2007).

Les cèl·lules fagocítiques com la micròglia expressen l'enzim NADPH oxidasa (NOX), sovint anomenat oxidasa fagocítica (PHOX), formada per 5 subunitats, gp91^{PHOX} (també anomenada NOX2 o Cybb), p22^{PHOX}, p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, p40^{PHOX} i Rac. En condicions fisiològiques, PHOX presenta una expressió microglial elevada, tot i que només s'activa enfront un estímul agut com ara TNF α , IL-1 β , quimiocines, LPS, A β , ATP o un procés fagocític (Brown & Neher, 2010). Així doncs, un cop activat, l'enzim catalitza la producció del radical superòxid que o bé dismuta ràpidament a peròxid d'hidrogen per acció de la superòxid dismutasa 1 (SOD1) o reacciona amb l'òxid nítric per a generar el peroxinitrit. A més, el peròxid d'hidrogen pot transformar-se a àcid hipoclorós a través de l'acció de la mieloperoxidasa (MPO) o pot originar el radical hidroxil mitjançant la reacció de Fenton (Figura 6). Aquestes espècies són altament oxidants i contribueixen a l'eliminació dels patògens fagocitats. No obstant, també poden provocar un important dany neuronal (Bedard & Krause, 2007) i per aquesta raó s'han estudiat els elements que actuen en aquesta via en el context neurodegeneratiu.



Així, en el model animal de la malaltia de Parkinson mitjançant 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), s'observa un augment de l'expressió de la subunitat gp91^{PHOX} (NOX2, Cybb) tant a l'estriat com a la substància negra i la seva deleció resulta en una millora de la patologia (Hernandes et al, 2013).

En el cas de l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA), una malaltia neurodegenerativa que afecta a les motoneurons provocant una paràlisi progressiva i finalment la mort del pacient, la mutació familiar més estudiada és la del enzim antioxidant superòxid dismutasa 1, SOD1^{G93A}. No obstant, l'origen de la neurotoxicitat no és un mal funcionament de l'enzim, si no l'acumulació de la seva proteïna mutada que promou l'activació de NOX2. Així, el bloqueig de l'expressió de NOX2 a ratolins que presenten la mutació SOD1^{G93A} resulta en un augment de l'esperança de vida, així com en la disminució de la producció de ROS per part de la micròglia i una menor mort neuronal (Sorce et al, 2012).

NOX2 també desenvolupa un paper important a la malaltia d'Alzheimer, ja que els animals on la seva expressió ha estat eliminada en un model de la patologia no presenten estrès oxidatiu, dèficits cerebrovasculars o alteracions de comportament. No obstant, els agregats d'A β no disminueixen, fet que suggereix un paper dels radicals generats per NOX2 al llarg de la patologia independent del de la via amiloide (Park et al, 2008b).

Finalment, la inhibició de NOX2 emprant Dextrometorfan resulta en una disminució de la desmielinització i del dany axonal i per tant en una millora de la patologia al model animal d'esclerosi múltiple EAE (Chechneva et al, 2011).



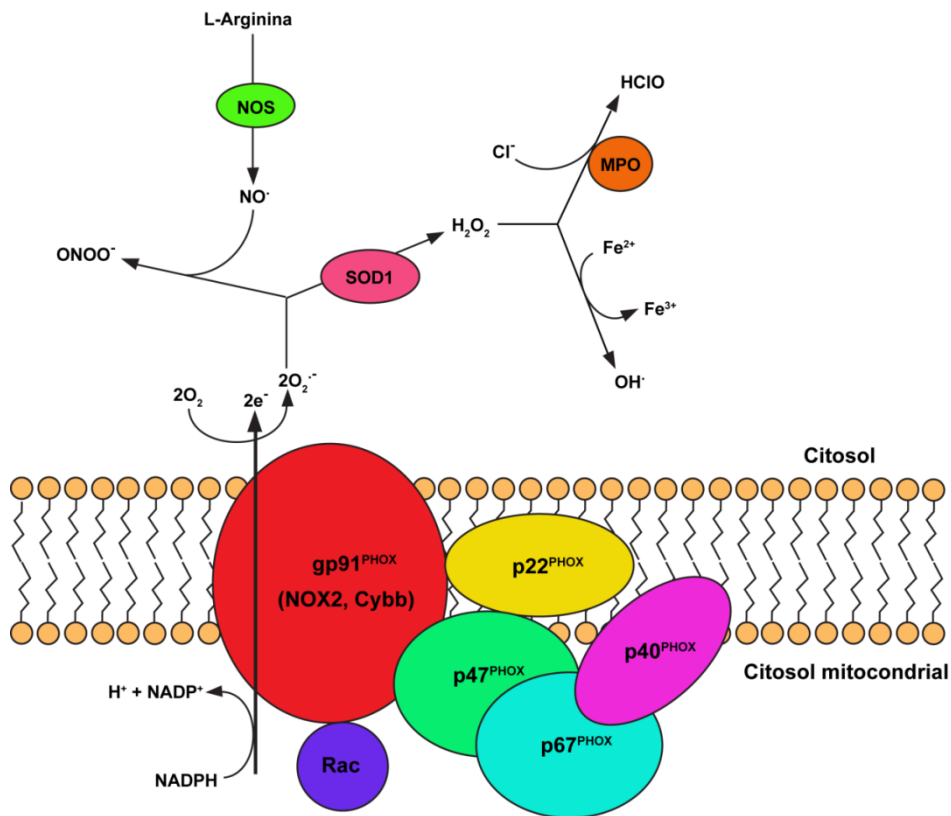


Figura 6. Representació esquemàtica de la formació del NO i les espècies reactives d'oxigen.

Producció de la prostaglandina E_2 (PGE_2). El missatger lipídic PGE_2 és un producte del metabolisme de l'àcid araquidònic. Aquest és un àcid gras poliinsaturat essencial, present als fosfolípids de la membrana cel·lular, a partir dels quals es pot hidrolitzar per l'acció de les fosfolipases A_2 (cPLA $_2$ i sPLA $_2$). Els enzims ciclooxigenasa 1 i 2 (COX1 i COX2) metabolitzen l'àcid araquidònic a prostaglandina H_2 (PGH $_2$). A més, la citocrom p450 epoxigenasa (CYP450) i les lipoxigenases (LOX) 5, 12 i 15 transformen l'àcid araquidònic en els àcids epoxieicosatrienoics i en els leucotriens, respectivament. PHG $_2$ és convertida en prostaglandina E_2 per la prostaglandina sintasa 1 que presenta una forma de membrana (mPGES-1) i una citosòlica (cPGES). Finalment, per acció de la tromboxà sintasa (TXS), PHG $_2$ pot ésser convertida a tromboxà A_2 (TXA $_2$).

De les dues isoformes de COX, COX1 és expressada de forma constitutiva, mentre que COX2 és una forma induïble. Cal destacar a més, que cPGES metabolitza la PGH₂ produïda per COX1, mentre que mPGES-1 emprava la que deriva de COX2 (Kim et al, 2011) (Figura 7).

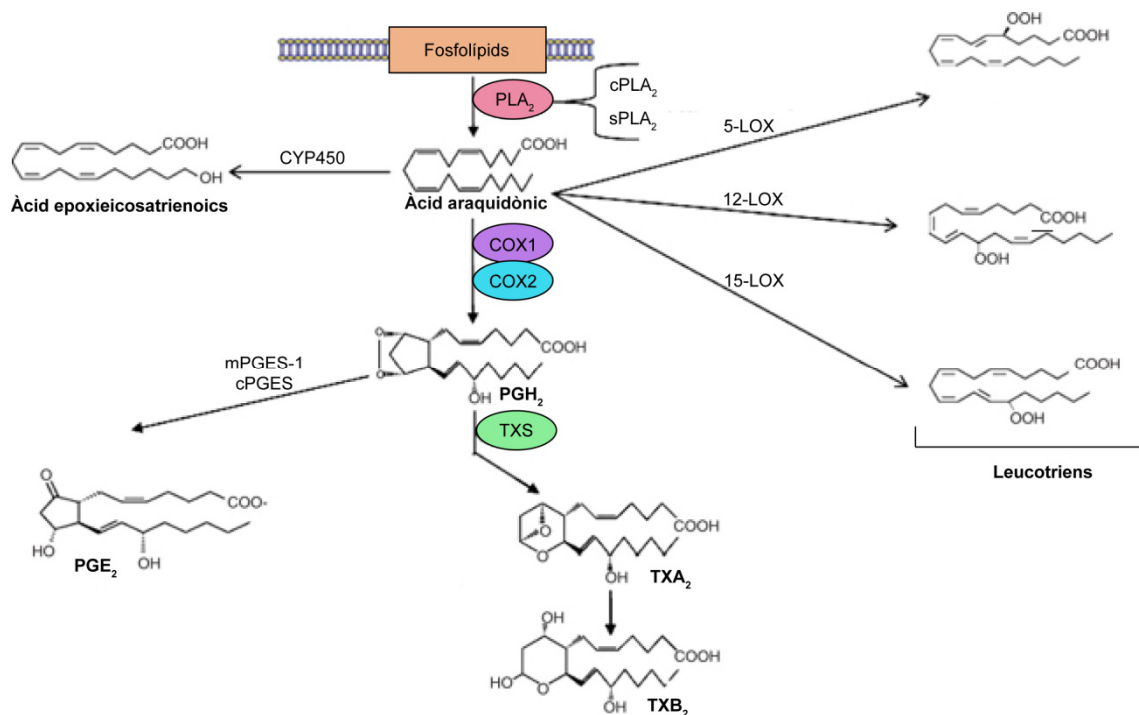


Figura 7. Representació esquemàtica de la via de l'àcid araquidònic. Adaptada de (Kim et al, 2011).

La PGE₂ pot desenvolupar tant funcions neurotòxiques com neuroprotectores. Per exemple, en aquest últim cas, PGE₂ indueix la disminució de l'activació microglial i la reducció del dany neuronal en baixar la producció de citocines pro-inflamatòries i l'activitat de NOS2 microglial (Minghetti et al, 1997). De fet, les vies de producció del NO i les prostaglandines estan estretament relacionades, com a conseqüència de la regulació mútua que exerceixen NOS2 i COX2 (Mollace et al, 2005).

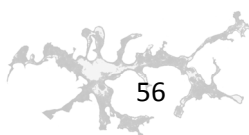
Els receptors acoblats a proteïnes G, EP₁, EP₂, EP₃ i EP₄ intervenen en les funcions cel·lulars de PGE₂. Aquests receptors es diferencien entre ells per l'afinitat a diferents lligands i pel seu paper a diferents vies de senyalització intracel·lular.

Diferents estudis han demostrat la presència d'alts nivells de PGE₂ en diferents patologies del SNC (Hutchinson et al, 2009). El receptor EP₂, que promou la producció intracel·lular d'AMP cíclic, està implicat en la producció d'espècies reactives d'oxigen, així com en l'increment de la producció de NO com a resposta a l'activació de la immunitat innata. Així, a animals on el gen d'EP₂ ha estat deletionat, no s'observa reacció pro-inflamatòria ni neurotoxicitat en resposta al tractament amb LPS. A més, models animals de malalties neurodegeneratives estudiats emprant aquests ratolins genoanul·lats presenten un augment de la fagocitosi d'agregats d'Aβ i d'α-sinucleïna, alhora que es redueix el dany neuronal produït per estrès oxidatiu. No obstant, en models de excitotoxicitat i d'isquèmia, EP₂ exerceix una funció neuroprotectora a través de la via de senyalització de l'AMP cíclic. Aquestes funcions oposades del receptor EP₂ són un reflex dels efectes contradictoris de PGE₂.

El receptor EP₁, implicat en la senyalització intracel·lular a través dels nivells de Ca²⁺, desenvolupa un paper important en la neurotoxicitat induïda per NMDA, ja que aquesta augmenta els nivells de Ca²⁺ alterant així la homeòstasi cel·lular.

La funció de EP₃ és més difícil d'establir a conseqüència de les seves tres isoformes que actuen sobre vies de senyalització diferents, fet que resulta en un efecte neuroprotector en un model de toxicitat per glutamat, mentre que en isquèmia, la seva acció augmenta la mida de la lesió cerebral.

Finalment, el receptor EP₄ controla la producció d'AMP cíclic de la mateixa manera que EP₂, però a diferència d'aquest, en presència de LPS EP₄ promou una resposta clarament antiinflamatòria.



Així doncs, aquests resultats posen de manifest les diferents i oposades funcions, ja esmentades, que desenvolupa PGE₂, segons la via de senyalització i el model de dany neuronal estudiat (Milatovic et al, 2011).

Secreció de quimiocines i expressió dels seus receptors. Les quimiocines són molècules petites secretades per les cèl·lules amb l'objectiu d'atraure i activar-ne d'altres. Segons el nombre i l'espai existent entre els residus de cisteïnes conservats al seu extrem N-terminal es divideixen en quatre famílies: CXC, CC, CX3C i C. Per a desenvolupar el seu paper biològic, les quimiocines s'uneixen als seus receptors, la nomenclatura dels quals segueix l'emprada pels seus lligands: CXCRn, CCRn, CXCRn i XCRn. Tradicionalment, les quimiocines han estat associades amb funcions dels sistema immunitari com ara l'activació i la migració dels leucòcits cap al focus de la inflamació. Recentment però, s'ha demostrat que tant les neurones com les cèl·lules gials poden expressar les quimiocines i els seus receptors, fet que suggereix la seva participació en processos del SNC (Reaux-Le Goazigo et al, 2013).

Una de les parelles més ben estudiades és la de la fractalquina (CX3CL1), expressada per les neurones i els astròcits, i el seu receptor (CX3CR1), expressat per la micròglia. CX3CL1 i CX3CR1 modulen la neurotoxicitat mitjançant la reducció de la reactivitat microglial i la seva producció d'espècies pro-inflamatòries (Limatola & Ransohoff, 2014). La disrupció de la senyalització CX3CL1/CX3CR1 resulta en una major mort neuronal, alteracions de comportament i una resposta microglial tòxica en models de neurodegeneració diferents com són la resposta del SNC a la inflamació sistèmica per injecció amb LPS, el model d'Alzheimer hAPP-J20, el model de la malaltia de Parkinson amb MPTP, el model d'ELA SOD1^{G93A} i el model EAE de l'esclerosi múltiple (Cho et al, 2011) (Cardona et al, 2006b) (Garcia et al, 2013).

En els primers estadis de desenvolupament dels gliomes, les cèl·lules del tumor atrauen a la micròglia i als macròfags mitjançant la secreció de la quimiocina CCL2. No obstant, a mesura que la massa tumoral creix i la micròglia i els macròfags s'hi



infiltra, CCL2 és secretada per aquests últims amb l'objectiu d'atraure més fagòcits cap al glioma, fet que correlaciona amb una pitjor prognosi de la malaltia (Fang et al, 2011). Finalment, l'ablació de CCL2 a la micròglia en el model EAE atenua la simptomatologia de la patologia, alhora que resulta en una menor acumulació de cèl·lules dendrítiques i macròfags al SNC (Dogan et al, 2008).

Finalment, el receptor CCR5, els lligands del qual són les quimiocines CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL14a i CCL16 secretades majorment per la micròglia i els astròcits al SNC (Biber et al, 2006), és expressat tant per la micròglia com pels astròcits i algunes subpoblacions neuronals i la seva deleció resulta neuroprotectora en models animals d'Alzheimer i esclerosi múltiple (Sorace et al, 2011).

Secreció de citocines. Les citocines són un conjunt molt ampli i heterogeni de proteïnes de mida petita secretades per les cèl·lules i implicades en les vies de senyalització cel·lular. Al SNC, les citocines desenvolupen varies funcions fisiològiques com ara el creixement de les neurites, la neurogènesi, la supervivència neuronal, l'eliminació de sinapsis durant el desenvolupament i la transmissió i plasticitat sinàptica. No obstant, una sobreproducció de citocines s'associa amb una disfunció neuronal, que pot resultar en mort, tal i com s'ha descrit en diferents malalties neurodegeneratives i en varis trastorns psiquiàtrics (Vezzani & Viviani, 2015).

★ **TNF α .** Al SNC, TNF α està involucrat en funcions fisiològiques bàsiques com ara la plasticitat sinàptica, l'aprenentatge i la memòria, la regulació de la son i la ingesta de menjar i aigua. En condicions patològiques però, TNF α es considera una citocina proinflamatòria associada a un gran nombre de patologies neurodegeneratives. Tot i que els astròcits també poden secretar-ne, la major part és secretada per la micròglia (Olmos & Llado, 2014). Al llarg de la neuroinflamació diferents estímuls, com ara la citocina IFN γ , poden induir la producció de TNF α microglial (Renno et al, 1995). A més, aquestes dues



citocines actuen de forma sinèrgica en la producció del NO promovent una resposta oxidativa i la conseqüent mort neuronal (Mir et al, 2008).

TNF α també desenvolupa un paper important en l'excitotoxicitat, un procés implicat en la mort neuronal a conseqüència d'una estimulació incontrolada dels receptors de l'aminoàcid glutamat. Així, TNF α relaciona la neuroinflamació i l'excitotoxicitat, ja que un cop induïda la producció de TNF α a conseqüència

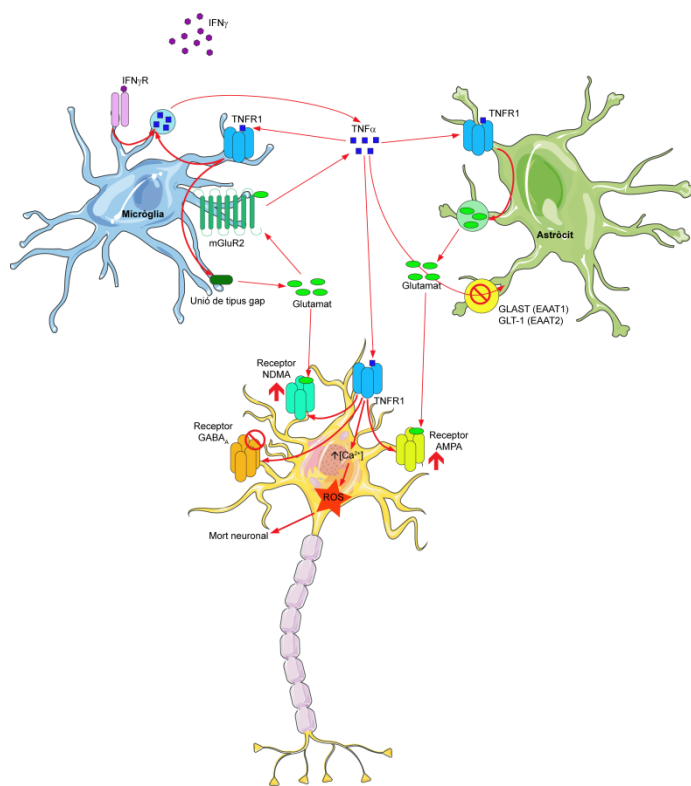
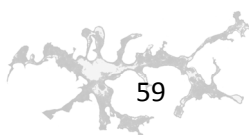


Figura 8. Possible mecanisme pel qual TNF α relaciona la resposta neuroinflamatòria i excitotòxica.

d'un estímul proinflamatori, aquest estimula la seva pròpia producció. A més, a través del seu receptor TNFR1 promou l'alliberament de glutamat per unions de tipus gap, que alhora també estimula la producció de TNF α mitjançant els seus receptors microglics. A continuació, TNF α estimula l'alliberament de glutamat per part dels astròcits, els transportadors de glutamat, GLAST i GLT-1, dels quals no poden recollir-lo de forma eficient, fet que encara augmenta més la seva

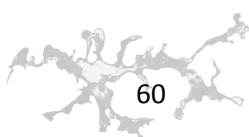
concentració a l'espai extracel·lular. Finalment, a les neurones TNF α promou l'activació dels receptors excitadors, NMDA i AMPA, alhora que disminueix l'activitat del receptor inhibitor, GABA $_A$, trencant així l'equilibri, fet que resulta en un increment de la concentració de Ca $^{2+}$ intracel·lular que estimula la formació d'espècies reactives d'oxigen i condueix a la mort neuronal (Figura 8)



(Olmos & Llado, 2014). Així doncs, ja que tant la neuroinflamació com l'excitotoxicitat juguen un paper important en la neurodegeneració i a les malalties d'Alzheimer i Parkinson, esclerosi múltiple, esclerosi lateral amiotròfica i isquèmia entre d'altres, s'han descrit nivells elevats de $TNF\alpha$, aquest es postula com una possible diana terapèutica.

- ★ **IL-1 β** . IL-1 β forma part de la família de les interleucines IL-1 i juntament amb $TNF\alpha$ és considerada una de les citocines proinflamatòries principals al SNC, on a més juga un important paper en el desenvolupament de varies malalties neurodegeneratives. La forma immadura d'IL-1 β és secretada pels astròcits i la micròglia en resposta a estímuls proinflamatoris, però per tal d'esdevenir una forma madura i bioactiva cal que la proteasa caspasa-1 actuï sobre ella (Lamkanfi & Dixit, 2012) (Wang et al, 2015). IL-1 β actua unint-se al seu receptor IL-1RI, fet que provoca un canvi conformacional al receptor iniciant així la transcripció del gens implicats en la resposta d'IL-1 β (Smith et al, 2012). D'entre els efectes d'IL-1 β destaca la seva acció potencialment neurotòxica, ja que actua sobre els receptors NMDA augmentant la seva resposta excitotòxica (Zhang et al, 2007).

A la malaltia d'Alzheimer, l'expressió d'IL-1 β augmenta de manera crònica i es creu que contribueix al desenvolupament d'aquesta patologia. Sorprenentment, en un model animal de la patologia, l'expressió sostinguda d'IL-1 β resulta en una disminució dels oligòmers d'A β , fet que suggereix un increment de la fagocitosi microglial. No obstant, en el cas de la proteïna tau, l'efecte d'IL-1 β sembla ésser oposat, ja que promou la seva fosforilació provocant el mal funcionament de la proteïna. Així doncs, sembla que l'activació microglial induïda per IL-1 β , alhora que indueix una major eliminació de les plaques d'A β , també activa múltiples vies de cinases que mitjançant la fosforilació de tau exacerben la patologia del model. Aquest paper dual posa de manifest la



necessitat de més estudis, per tal d'aclarir els possibles efectes, sobre A β i tau, de la inhibició de IL-1 β com a estratègia terapèutica (Ghosh et al, 2013).

- ★ **IL-6.** IL-6 és una glicoproteïna de 26 kDa que s'uneix i activa el receptor format per la subunitat associada a la membrana IL-6R i les dues subunitats transductores de senyal gp130 (Smith et al, 2012). La transcripció d'IL-6 és regulada pels factors de transcripció NF- κ B, AP-1, CREB i C/EBP β , tant al SNC com a la perifèria. Al cervell, la producció d'IL-6 es produeix a la micròglia els astròcits i les neurones. Sovint, IL-6 és considerada exclusivament com una interleucina proinflamatòria. No obstant, també pot ésser classificada com a un factor neurotròfic, ja que indueix la proliferació, la supervivència, la diferenciació i la regeneració neuronal, alhora que també influeix la neurotransmissió i l'activitat neuronal (Spooren et al, 2011). Tot i això, un increment de l'expressió d'IL-6 ha estat descrit en varies malalties neurodegeneratives, on molts autors n'han suggerit un paper proinflamatori.

Així per exemple, tot i les diferències reportades per varis estudis, probablement com a conseqüència de la utilització de models diferents, en emprar anticossos que bloquegen l'expressió d'IL-6, la patologia associada al model d'esclerosi múltiple EAE es veu clarament atenuada (Willenborg et al, 1995) (Gijbels et al, 1995). Aquests resultats, es confirmen en emprar ratolins genoanul·lats on a més s'observa un bloqueig de l'entrada de cèl·lules T al SNC com a conseqüència de la baixa expressió VCAM-1 provocada per l'absència d'IL-6 (Eugster et al, 1998). Aquestes dades suggereixen un paper important dels nivells de la interleucina secretats per les cèl·lules perifèriques infiltrades.

Pel que fa a la malaltia d'Alzheimer, la sobreexpressió d'IL-6 modifica el fenotip de la micròglia activada conduint-la cap a un estat fagocític que afavoreix l'eliminació de les plaques d'A β (Chakrabarty et al, 2010). No obstant, el pH



dels lisosomes microgials no és prou àcid per a degradar els dipòsits fagocitats, fet que n'impedeix una correcta eliminació. La sobreexpressió d'IL-6 a les cèl·lules primàries microgials acidifica els lisosomes i promou una correcta eliminació d'A β (Majumdar et al, 2007).

Finalment, a la malaltia de Parkinson, s'observa una correlació inversa entre l'expressió d'IL-6 i l'agreujament de la simptomatologia patològica, de manera que l'ablació de l'interleucina provoca una major toxicitat al model de la malaltia, amb MPTP (Bolin et al, 2002).

- ★ **IFN γ .** L'IFN γ és l'únic membre de la subfamília dels interferons de classe II. Inicialment, la producció d'IFN γ es relacionava amb les cèl·lules T Th1, però estudis posteriors han demostrat que altres cèl·lules com les cèl·lules B, NK, macròfags i cèl·lules dendrítiques, també contribueixen a la seva secreció. A més, la seva secreció és promoguda per les interleucines IL-12 i IL-18, mentre que IL-4 i IL-10 la redueixen (Schroder et al, 2004).

El control de la resposta immunològica enfront virus i tumors va ser una de les primeres funcions de l'IFN γ que varen ésser descrites (Mount et al, 2007). Al SNC, la micròglia activada és capaç de secretar IFN γ i aquest actua com a citocina proinflamàtoria, participant en varis processos inflamatoris, incloent-hi la desmielinització.

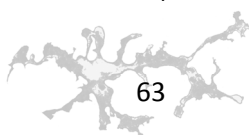
A l'esclerosi múltiple, l'IFN γ secretat per les cèl·lules T infiltrades activa la micròglia i augmenta els nivells d'expressió de MHC-II transformant-la en una cèl·lula presentadora d'antígens. A més, aquesta micròglia activada secreta nivells alts de citocines proinflamatòries, NO, superòxid i glutamat que provoquen la mort neuronal (Sanders & De Keyser, 2007). No obstant, tot i el cercle neurodegeneratiu, on les cèl·lules T activen la micròglia i aquesta promou la maduració de cèl·lules T que al seu torn tornen a estimular la micròglia, potenciat per l'IFN γ , aquest també indueix la mort microgial



augmentant l'expressió de proteïnes proapoptòtiques, en especial Bax. Aquest procés anomenat mort cel·lular induïda per l'activació (en anglès, *activation-induced cell death, AICD*) podria estar implicat en el mecanisme de recaiguda-remissió (en anglès *relapsing-remission*) de l'esclerosi múltiple, ja que diferents estudis han demostrat que l'eliminació de la micròglia resulta en una atenuació de la malaltia (Takeuchi et al, 2006).

L'IFN γ també indueix la mort de les neurones dopaminèrgiques observada a la malaltia de Parkinson, com així demostren dos models animals, MPTP i paraquat, on la seva ablació resulta neuroprotectora, alhora que disminueix la microgliosi (Litteljohn et al, 2009) (Mount et al, 2007).

- ★ **IL-4.** Estudis realitzats en macròfags, descriuen IL-4 com una interleucina antiinflamatòria, capaç de reduir l'expressió de citocines proinflamatòries com TNF α i IL-1 β i la producció de PGE $_2$, produïda com a resposta al tractament amb LPS+IFN γ (Hart et al, 1989). No obstant, el pretractament dels macròfags amb IL-4 potencia l'expressió de citocines i quimiocines proinflamatòries en presència de LPS (Major et al, 2002). Al SNC, IL-4 és secretada pels astròcits però no per la micròglia, tot i que aquesta sí expressa el seu receptor, IL-4R (Hulshof et al, 2002). Aquests resultats, suggereixen que IL-4 desenvolupa un paper modulador de l'activació microglial. De fet, com en el cas dels macròfags, a la micròglia IL-4 també juga un paper neuroprotector reduint els nivells de TNF α i promovent l'expressió d'IGF-1 (Butovsky et al, 2005). Aquesta acció antiinflamatòria, sembla ésser conseqüència de la capacitat d'IL-4 per a augmentar l'expressió de CD200, una glicoproteïna expressada per les neurones i altres tipus cel·lulars que en unir-se al seu receptor CD200R expressat a les cèl·lules del llinatge mieloide com la micròglia promou el manteniment del fenotip quiescent d'aquesta. Així, en eliminar el gen d'IL-4, els animals tractats amb LPS presenten una clara disminució dels nivells de CD200, alhora que la producció de citocines proinflamatòries, per part de la micròglia, augmenta (Lyons et al, 2009).



En situacions patològiques, una sobreexpressió d'IL-4 a l'hipocamp provoca una disminució dels dipòsits d'A β i de la reacció glial alhora que millora les funcions cognitives en un model de la malaltia d'Alzheimer (Kiyota et al, 2010). A més, l'ablació d'IL-4 en el model EAE provoca l'exacerbació de la patologia, fet que indica un paper regulador de la severitat de la malaltia desenvolupat per aquesta interleucina (Falcone et al, 1998).

- ★ **IL-10.** Juntament amb IL-4, IL-10 és considerada una de les citocines antiinflamatòries clàssiques. Al SNC, tant els astròcits com la micròglia secreten IL-10, alhora que també expressen el seu receptor (Hulshof et al, 2002). A banda del seu paper regulador de la inflamació, al SNC IL-10 actua com a factor de creixement a la zona subventricular del cervell adult, regulant la neurogènesi (Perez-Asensio et al, 2013).

Sorprenentment, en models animals de la malaltia d'Alzheimer, el bloqueig d'IL-10 provoca una millora de la patologia, alhora que la seva sobreexpressió l'exacerba. Aquests estudis mostren que en absència de la interleucina, hi ha una reducció de les plaques d'A β , una protecció de la integritat sinàptica, un increment de l'activitat fagocítica microglial i una millora dels dèficits cognitius (Chakrabarty et al, 2015) (Guillot-Sestier et al, 2015). Aquests resultats suggereixen la necessitat d'un major estudi de les funcions desenvolupades per les citocines antiinflamatòries, així com dels efectes de la seva alteració, ja que normalment aquests són obviats en favor de la investigació de les funcions de les citocines proinflamatòries.

- ★ **TGF β .** TGF β és un factor de creixement secretat per les neurones i les cèl·lules glials. En general, s'accepta que TGF β actua com a un inhibidor microglial en oposició al paper activador que desenvolupa TNF α . Així doncs, l'acció de TGF β és majoritàriament neuroprotectora i l'augment de la seva expressió en la malaltia d'Alzheimer, de Parkinson i d'esclerosi múltiple, entre d'altres patologies neurodegeneratives, actua disminuint la progressió de la

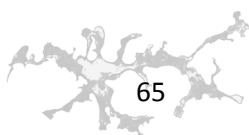


degeneració (Martinez-Canabal, 2015). No obstant, la seva sobreexpressió no sempre resulta protectora. Per exemple, els animals modificats genèticament per tal d'expressar majors nivells de TGF β presenten un excés d'expressió de les proteïnes de la matriu extracel·lular, fet que els provoca hidrocefàlia, atès que el flux del líquid cerebrospinal es veu alterat pel gruix de la làmina basal (Wyss-Coray et al, 1995). A més, aquests ratolins presenten dèficits de memòria, ja que TGF β inhibeix la neurogènesi alhora que redueix l'apoptosi cel·lular. Això, provoca una superpoblació neuronal, fet que altera el funcionament normal de l'hipocamp. Aquests resultats indiquen que TGF β presenta una funció dual, ja que promou la supervivència neuronal a llarg termini, però en reduir la proliferació dels progenitors neuronals dificulta la generació de noves neurones com a resposta a un dany del teixit o a l'envelliment (Buckwalter et al, 2006).

Així doncs, sembla que el paper protector de TGF β està relacionat amb la inhibició: la inhibició de la inflamació, de la resposta immune, de la proliferació cel·lular i de la apoptosi neuronal. Paradoxalment però, una excessiva neuroprotecció pot resultar ésser patològica.

1.1.4 Factors de transcripció implicats en la regulació de les funcions microglijals.

NF- κ B (Nuclear Factor κ B). La família de factors de transcripció NF- κ B/Rel està formada per cinc membres, p50, p52, p65 (Rel-A), c-Rel i Rel-B. Aquestes proteïnes formen homo- o heterodímers que resten inactius com a conseqüència de la seva interacció amb la família de proteïnes inhibidores kappa B (I κ B). Les proteïnes I κ B retenen NF- κ B al citoplasma, fins que són fosforilades per la cinasa I kappa B (IKK) i posteriorment degradades (Potucek et al, 2006). La translocació nuclear d'NF- κ B es produeix en resposta a varis estímuls com ara les citocines TNF α i IL-1 β , diferents quimiocines, LPS o l'estrès oxidatiu induït per les espècies reactives d'oxigen i nitrogen. No obstant, TGF β , IL-4 i IL-10 poden inhibir-ne

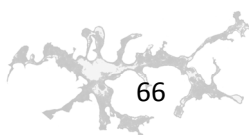


l'expressió. D'entre els gens regulats per NF- κ B destaquen TNF α , IL-1 β , IL-6, NOS2, COX2, BDNF, APP i BACE. NF- κ B s'expressa a tots els tipus cel·lulars del SNC i en el cas dels astròcits i la micròglia participa activament en la seva activació (Memet, 2006). De fet, quan se sobreexpressa la subunitat IKK β a les cèl·lules microgials, aquestes presenten un fenotip activat, que en la medul·la espinal condueix a la mort neuronal, mentre que l'ablació d'IKK β resulta en la inhibició de la resposta inflamatòria microglial i per tant del seu potencial neurotòxic (Fernandes et al, 2014) (Frakes et al, 2014).

CREB (cAMP Response Element Binding Protein). El factor de transcripció CREB és membre de la família de factors de transcripció ATF-1 i tal i com indica el seu nom s'activa per fosforilació en resposta a varis senyals com ara l'AMP cíclic. D'entre les seves funcions destaquen la regulació de la transcripció de varies citocines proinflamatòries com per exemple IL-2 i IL-6 i d'enzims com COX2. A més, regula la supervivència cel·lular promovent la transcripció del gen antiapoptòtic Bcl-2 quan és estimulat pels factors de creixement NGF i BDNF. Finalment, CREB també està implicat en la plasticitat sinàptica associada a la memòria de llarg termini (Mayr & Montminy, 2001) (Potucek et al, 2006).

AP-1 (Activator Protein-1). L'activació d'AP-1 està relacionada amb la regulació de gens proinflamatoris com IL-3, IFN γ i TNF α . Molts dels membres de les famílies c-Fos i c-Jun dimeritzen per tal de formar el factor de transcripció AP-1, l'activitat transcripcional del qual és controlada mitjançant la regulació de les subunitats que el formen (Potucek et al, 2006). A la micròglia, en resposta al LPS i a través de TLR4, AP-1 activa la transcripció dels gens proinflamatoris IL-1 β , IL-6, TNF α i NOS2, juntament amb NF- κ B, provocant la mort neuronal per apoptosi (He et al, 2014).

p53. p53 és un factor de transcripció implicat en l'apoptosi, la inhibició del creixement i la reparació de l'ADN. En resposta al dany induït per l'estrès oxidatiu, p53 és estabilitzat a través de modificacions post-traduccionals al citoplasma per a posteriorment translocar al nucli on participa en la transcripció. p53 està implicat en



l'activació microglial, atès que l'ablació de la seva expressió resulta en una disminució de l'expressió de gens proinflamatoris alhora que augmenta els nivells dels gens Ym1 i FIZZ propis de la resposta antiinflamatòria. Finalment, l'eliminació de p53 també modifica l'activitat microglial, ja que afavoreix la seva activitat fagocítica en front de cèl·lules apoptòtiques (Jayadev et al, 2011).

Nrf2 (*Nuclear Erythroid 2-related Receptor*). Generalment, Nrf2 es troba al citoplasma segregat per la proteïna reguladora Keap1. En situacions d'estrès oxidatiu, Keap1 allibera Nrf2 que transloca al nucli a on activa la transcripció dels gens que presenten la seqüència ARE al seu promotor, com ara l'enzim antioxidant HO-1. En la seva absència, la microglia en ésser estimulada amb LPS s'activa i presenta nivells d'expressió elevats de NOS2, IL-6 i TNF α . En contrapartida, quan l'expressió de Nrf2 és induïda pel tractament amb el producte natural SFN (de l'anglès, *isothiocyanate sulforaphane*), l'activació microglial és atenuada i l'homeòstasi es restaura (Innamorato et al, 2008) (Fernandes et al, 2014).

STATs (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). L'acció de factors de creixement i citocines provoca la fosforilació dels membres de la família de factors de transcripció STAT per part de les cinases JAK. És llavors quan els set membres de la família formen homo- o heterodímers i transloquen al nucli. A les neurones i les cèl·lules glials, la via de senyalització JAK/STAT regula la proliferació, la diferenciació i la supervivència cel·lular. Durant la neuroinflamació, citocines antiinflamatòries com IL-10 promouen l'activació d'STAT3, mentre que les proinflamatòries com ara IFN γ activen STAT1. Estímuls com l'estrès oxidatiu o IL-6 poden activar-los tots dos per tal de promoure la transcripció de gens inflamatoris, però també per activar l'expressió de gens que regulin la supervivència cel·lular. Així, es considera que el paper d'STAT1 durant la neuroinflamació és bàsicament proinflamatori, mentre que en el cas d'STAT3 la classificació no és tant clara, ja que tant pot contribuir al dany neuronal, com promoure'n la supervivència. Finalment, l'alteració de la via JAK/STAT pot ésser un dels mecanismes implicats en la neurodegeneració, ja que l'activació d'STAT3 resulta neuroprotectora en

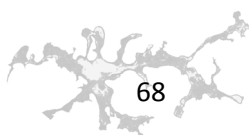


models de la malaltia d'Alzheimer, alhora que l'activació d'STAT1, STAT3 i STAT5 promou la supervivència dels oligodendròcits (Nicolas et al, 2013).

PPARs (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*). Els PPAR són una família de factors de transcripció que regulen diferents processos de les respostes immune i inflamatòria. Aquesta família està formada per tres membres, PPAR α , PPAR β/δ i PPAR γ . El primer està involucrat en la neurotransmissió i la defensa contra l'estrès oxidatiu. PPAR β/δ promou la diferenciació dels oligodendròcits i la mielinització al SNC. Finalment, PPAR γ s'expressa als astròcits i a la micròglia i regula la inflamació al cervell. En diferents models animals de diferents malalties neurodegeneratives, l'administració d'agonistes de PPAR γ resulta en una disminució de la simptomatologia patològica. A més, PPAR γ també regula negativament les vies de senyalització d'NF- κ B i JAK/STAT reduint així la producció de citocines proinflamatòries (Bright et al, 2008).

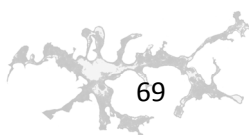
C/EBPs (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*). Totes les proteïnes C/EBP presenten a l'extrem C-terminal un domini de tipus *b-zip* o cremallera bàsica de leucina compostat per una regió d'unió a l'ADN i una regió de dimerització altament conservada a tots els membres de la família, que a més els identifica. El domini *b-zip* és el responsable d'un gran nombre d'interaccions proteïna-proteïna que involucren als membres de la família C/EBP. Aquest fet explica l'alta conservació i homologia, prop del 90%, observada en aquest domini. Per contra, els dominis que es troben a l'extrem N-terminal presenten només unes poques zones conservades entre els membres de la família, les quals estan involucrades en el reclutament de la maquinària basal de transcripció (TBP/TFIIB) o els coactivadors transcripcionals (CBP/p300) (Nerlov, 2008). Set factors de transcripció integren la família C/EBP:

- ★ C/EBP α . El primer membre descrit de la família, té dues isoformes, p30 de 30 kDa i p42 de 42 kDa, generades a partir d'una sola molècula de ARNm per iniciació alternativa de la traducció. C/EBP α és present a varis teixits com el fetge, el teixit adipós i les cèl·lules mieloides on desenvolupa un paper important en el metabolisme de la glucosa i els lípids hepàtics, així com en la



diferenciació dels adipòcits, els granulòcits i els monòcits (Nerlov, 2010). La seva desregulació s'observa en el 50% dels malalts de leucèmia mieloide aguda, mentre que el 5-15% dels pacients presenten mutacions al seu gen (Paz-Priel & Friedman, 2011). A les cèl·lules del SNC, *in vitro* la microglia tractada amb LPS mostra una disminució dels nivells de C/EBP α , mentre que la major part dels astròcits no presenten expressió de C/EBP α ni per efecte del tractament ni en condicions basals i els nivells dels pocs que n'expressen són molt inferiors als observats a la microglia (Ejarque-Ortiz et al, 2007b). En canvi, al cervell adult, les cèl·lules microglials activades en resposta al dany provocat per hipòxia augmenten els seus nivells d'expressió de C/EBP α (Walton et al, 1998). Finalment, al model prionic murí ME7, un estudi recent descriu un paper important de C/EBP α en la proliferació microglial a través del control transcripcional de PU.1, un factor de transcripció implicat en la proliferació de les cèl·lules mieloides (Gomez-Nicola et al, 2013).

- ★ C/EBP β . A conseqüència de la seva importància a la recerca desenvolupada en aquesta tesi, aquest factor de transcripció es tractarà àmpliament un cop acabada la breu descripció dels altres membres de la família.
- ★ C/EBP γ . L'expressió de C/EBP γ és ubiqua. La funció biològica d'aquest factor de transcripció és poc coneguda, però es creu que pot actuar com a inhibidor dels altres membres de la família, ja que no presenta dominis d'activació de la transcripció, formant heterodímers. De fet, els dímers C/EBP β -C/EBP γ són presents a molts teixits, fet que suggereix un paper regulador de C/EBP γ sobre l'activitat de C/EBP β . Experiments realitzats amb fibroblastes embrionaris de ratolí indiquen que C/EBP γ regula negativament la senescència, alhora que promou la proliferació cel·lular (Huggins et al, 2013). A dia d'avui, no s'ha descrit cap funció de C/EBP γ al SNC.
- ★ C/EBP δ . És codificat per un gen d'un sol exó i actualment només es coneix una sola forma de la seva proteïna de 28 kDa. Aquest factor de transcripció està



implicat en la regulació de varis processos biològics com la diferenciació, la motilitat, la proliferació i la mort cel·lular (Balamurugan & Sterneck, 2013). Al SNC, C/EBP δ s'expressa tant a les cèl·lules glials com a varies poblacions neuronals com ara les neurones granulars del gir dentat o les neurones piramidals de l'hipocamp, entre d'altres. El paper neuronal de C/EBP δ sembla estar relacionat amb la memòria a llarg termini, ja que la seva eliminació resulta en un increment de la por condicionada contextual (Sterneck et al, 1998). Contràriament, a les cèl·lules glials C/EBP δ regula la resposta inflamatòria. Cultius primaris glials realitzats amb animals genoanul·lats mostren una reducció del nivells d'expressió d'IL-6, NOS2 i COX2 en absència del factor de transcripció. A més, quan es co-cultiven neurones amb cèl·lules micròglials activades on l'expressió de C/EBP δ ha estat delecionada, aquestes últimes presenten un menor potencial neurotòxic, ja que s'observa una menor mort neuronal que en presència del factor de transcripció. La reducció de la resposta inflamatòria en absència de C/EBP δ també s'observa *in vivo* en tractar els animals amb LPS (Valente et al, 2013). Finalment, C/EBP δ podria jugar un paper important a diferents malalties neurodegeneratives, ja que la seva expressió s'observa en models animals i pacients d'ELA (Valente et al, 2013) i la seva ablació és neuroprotectora al model animal EAE (Tsai et al, 2011). Així, la inhibició de C/EBP δ podria ésser una possible estratègia terapèutica.

- ★ C/EBP ϵ . La proteïna de C/EBP ϵ presenta quatre isoformes de 32, 30, 27 i 14 kDa, de les quals la forma de 30 kDa presenta un potencial d'activació menor que la de 32, mentre que la isoforma més petita no conté el domini d'activació transcripcional. L'expressió de C/EBP ϵ es localitza exclusivament a les cèl·lules hematopoètiques on regula la diferenciació i funció del neutròfils i dels macròfags. A més, els animals genoanul·lats presenten una major susceptibilitat a les infeccions bacterianes, fet que resulta en la seva mort (Ramji & Foka, 2002). El seu paper al SNC no s'ha descrit.
- ★ Ddit3. El dany de l'ADN, l'estrès del reticle endoplasmàtic, la hipòxia i la inanició promouen la transcripció de Ddit3, també anomenat CHOP. Aquest factor de



transcripció no pot formar homodímers i majoritàriament actua com a inhibidor dels altres membres de la família formant heterodímers (Jauhiainen et al, 2012). Ddit3 és un factor clau en la regulació de la resposta a l'estrès i de l'apoptosi, paper que també desenvolupa al SNC. De fet, al model animal de la malaltia de Parkinson amb 6OHDA, l'expressió de Ddit3 augmenta en resposta a l'estrès oxidatiu i indueix la mort per apoptosi de les neurones de la substància negra (Silva et al, 2005). Així doncs, donat que l'estrès oxidatiu i l'apoptosi són presents a moltes de les malalties neurodegeneratives, aquest factor de transcripció es postula com a candidat a estudiar en aquest context.

- ★ C/EBP ξ . Aquesta proteïna d'expressió ubiqua i altament conservada mereix especial atenció, ja que no presenta homologia amb els altres membres de la família, alhora que tampoc conté el domini de cremallera de leucina característic dels C/EBPs. Així, tot i que C/EBP ξ sí que s'uneix a la caixa CCAAT, característica que curiosament no compleixen els C/EBPs, tai i com s'explicarà més endavant, no pot considerar-se'n un membre de la família. Aquesta conclusió es pot extreure de l'estudi filogenètic representat a la figura 9. Aquest anàlisi realitzat comparant les seqüències de les set proteïnes de diferents organismes, mostra dos grups diferenciats. El primer agrupa C/EBP α , β , γ , δ , ϵ i Ddit3, on aquest últim és el que presenta menys homologia en comparació amb els altres cinc C/EBPs. La segona branca agrupa les seqüències de C/EBP ξ de tots els organismes estudiats, fet que suggereix un origen diferent per a aquesta proteïna.



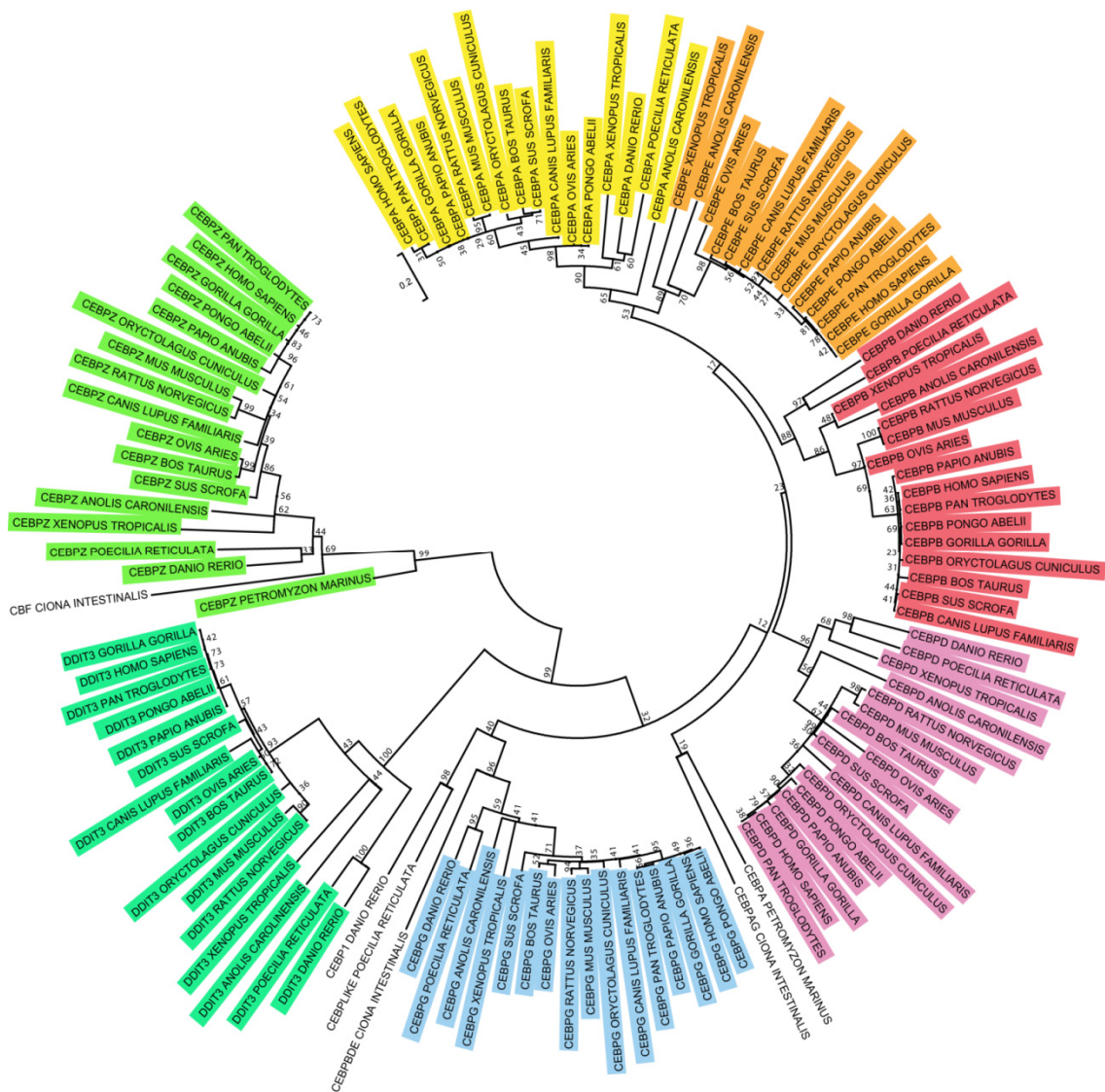


Figura 9. Anàlisi filogenètic de les proteïnes dels C/EBPs de diferents espècies. L'arbre està dibuixat a escala on la llargada de les branques indica el nombre de substitucions que hi ha hagut en una posició, és a dir, com més llarga és una branca més divergència existeix entre les dues seqüències que sorgeixen d'un nexu. Les espècies estudiades són: *Homo sapiens* (Humà), *Pan troglodytes* (Ximpanzé), *Gorilla gorilla* (Goril·la occidental), *Pongo abelii* (Orangutà de Sumatra), *Papio anubis* (Babuï), *Rattus norvegicus* (Rata), *Mus musculus* (Ratolí), *Oryctolagus cuniculus* (Conill), *Canis lupus familiaris* (Gos), *Sus scrofa* (Porc), *Bos taurus* (Vedella), *Ovis aries* (Cabra), *Xenopus tropicalis* (Granota amb unghes africana), *Anolis carolinensis* (Carolina anole), *Dario rerio* (Peix zebra), *Poecilia reticulata* (Peix Guppy), *Petromyzon marinus* (Lamprea marina) i *Ciona intestinalis* (Ciona). L'anàlisi agrupa C/EBPξ i els altres C/EBPs en dos grups ben diferenciats, fet que suggereix un origen diferent per a les dues branques.

La inclusió dels organismes *Ciona intestinalis*, un urocordat, i el vertebrat agnat *Petromyzon marinus* mostra que tots dos organismes presenten una forma primitiva de C/EBP classificada dins del primer grup i una forma homòloga a C/EBP ξ agrupada amb la resta d'aquestes seqüències. El fet que aquests dos organismes primitius presentin una forma C/EBP homòloga als sis primers C/EBPs i una altra a C/EBP ξ conclou que la divergència entre aquestes proteïnes es va produir en estadis primerencs de l'evolució i per tant reforça la idea d'un origen diferent de C/EBP ξ (Pulido-Salgado et al, 2015).

1.1.4.1 C/EBP β :

El gen codificant de C/EBP β no té introns i es transcriu en una sola molècula d'ARNm. Tres isoformes es poden generar a partir d'aquest ARN per iniciació alternativa de la traducció. Aquestes isoformes són *Full* de 38 kDa, LAP (de l'anglès *Liver Activation Protein*) de 35 kDa i LIP (de l'anglès *Liver Inhibitory Protein*) de 20 kDa. Les tres proteïnes presenten un extrem C-terminal que conté el domini de la cremallera bàsica de leucina, i per tant totes tres tenen la capacitat d'unir-se a l'ADN i de formar dímers. No obstant, l'extrem N-terminal de LIP, la isoforma més curta, no conté els dominis de transactivació de la transcripció (Figura 10A). La conseqüència d'aquest fet és que mentre que Full i LAP funcionen com a activadors de la transcripció, LIP és una forma dominant negativa que actua com a repressor transcripcional unint-se a les altres dues isoformes, inhibint així la seva funció (Ramji & Foka, 2002).

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, l'extrem C-terminal està altament conservat entre els membres de la família. La seqüència de 17 aminoàcids, Arg-Arg-Glu-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Val-Arg-Lys-Ser-Arg-Asp-Lys-Ala-Lys, present al domini bàsic d'unió a l'ADN és present a C/EBP α , β , δ i ε fet que suggereix que aquests quatre factors de transcripció presenten la mateixa afinitat d'unió a l'ADN. Així, la unió d'un o altre a un determinat promotor probablement dependrà de les interaccions amb



altres proteïnes a través del menys conservat extrem N-terminal (Figura 10B). A més, aquesta homologia també sembla indicar l'existència d'una única seqüència consens d'unió a l'ADN per a tots aquests C/EBPs. Tot i que inicialment es creia que els C/EBPs reconeixien els cinc nucleòtids CCAAT, estudis recents demostren que a part de C/EBP ξ , el factor de transcripció NFY (de l'anglès, *Nuclear transcription Factor Y*) és qui majoritàriament s'uneix a la caixa CCAAT (Dolfini et al, 2012) (Kfoury & Kapatos, 2009). Així, la seqüència consens dels C/EBPs acceptada actualment, TT(G/A)CGCAA, difereix clarament de la seqüència CCAAT (Figura 10C) (Wingender et al, 2015) (Pulido-Salgado et al, 2015).

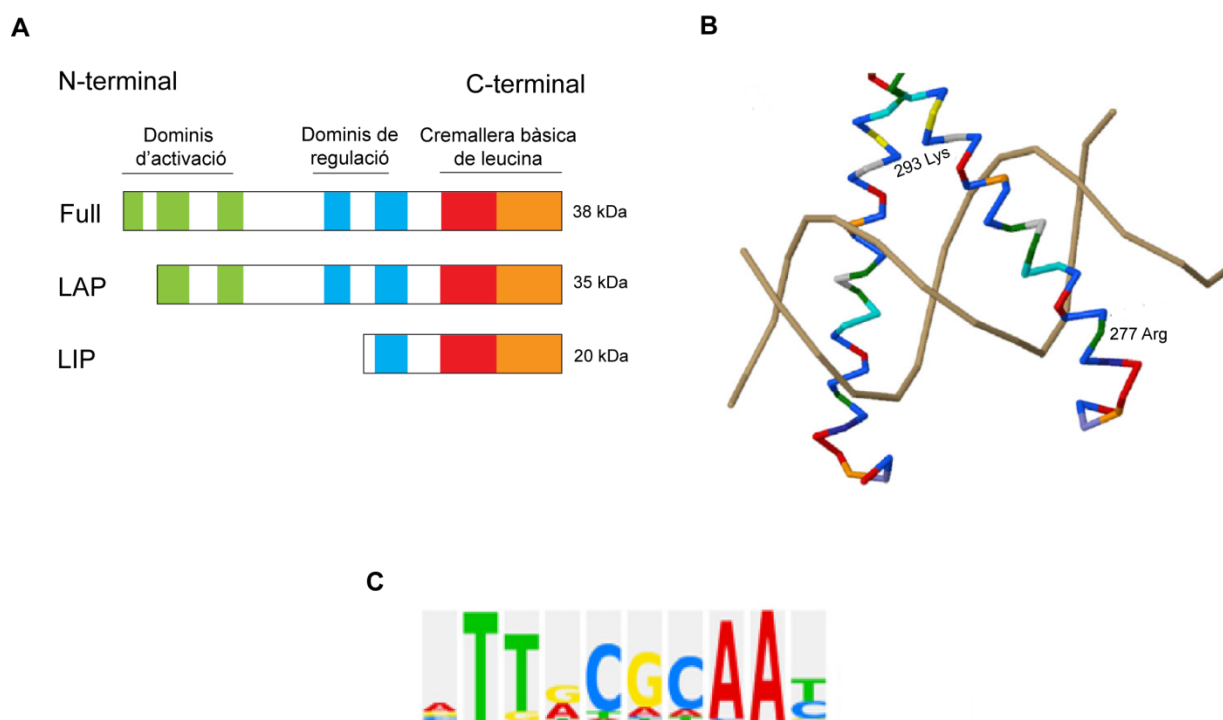


Figura 10. A. Representació esquemàtica de l'estructura de les 3 isoformes de C/EBP β . B. Estructura cristal·lina de la unió de C/EBP β humana a l'ADN. S'indiquen la primera arginina i l'última lisina de la seqüència de 17 aminoàcids que comparteixen C/EBP α , β , δ i ϵ . C. Seqüència d'unió a l'ADN dels C/EBPs. B i C s'han adaptat de (Pulido-Salgado et al, 2015).

1.1.4.1.1 Funcions de C/EBP β .

C/EBP β desenvolupa importants funcions a l'organisme, tal i com demostren els defectes observats als animals genoanul·lats. De fet, treballar amb aquests animals sovint resulta una tasca feixuga a conseqüència del reduït nombre d'animals homozigots que sobreviuen fins a l'edat adulta. Experiments realitzats creuant animals heterozigots mostren que la proporció Mendeliana 1:2:1 entre els genotips no mutat, mutat heterozigot i mutat homozigot es compleix durant l'etapa embrionària. En canvi, durant el desenvolupament post-natal els animals mutats homozigots mostren una taxa de mortalitat superior en comparació amb els altres dos genotips. Aquest resultat sembla doncs indicar la presència d'alteracions en aquests animals, a conseqüència de la manca d'expressió del factor de transcripció, que podrien donar lloc a la seva mort prematura (Bai et al, 2006). Amb l'objectiu de descriure el paper clau de C/EBP β a l'organisme, a continuació es resumeixen algunes de les funcions que aquest duu a terme a diferents òrgans i teixits.

Fetge. C/EBP β és necessari per a respondre als senyals que augmenten la gluconeogènesi hepàtica. En presència de l'hormona glucagó, C/EBP β activa l'expressió d'AMP cíclic, fet que provoca la mobilització del glicogen hepàtic i la producció de glucosa. No obstant, els animals genoanul·lats no responen a l'estímul del glucagó, presenten nivells baixos d'AMP cíclic i una mobilització del glicogen reduïda. Això, resulta en una baixa producció de glucosa, fet que concorda amb els baixos nivells en sang observats en aquests animals. De fet, la hipoglucèmia que s'observa en delecionar C/EBP β podria ésser la causa de l'alta mort post-natal d'aquests animals (Liu et al, 1999).

Teixit adipós. La diferenciació dels adipòcits és un procés complex que involucra l'expressió de varis factors de transcripció. D'entre aquests destaca la família dels C/EBPs, la qual regula l'expressió gènica dels adipòcits i la seva diferenciació. A l'organisme, es diferencien dos tipus de teixit adipós: el teixit adipós marró i el teixit adipós blanc. El primer està involucrat en el procés de termoregulació de



l'organisme, es localitza a zones concretes del cos i els adipòcits que el componen contenen varies gotes de lípids al citoplasma. Distribuït per varies zones de l'organisme, el segon presenta cèl·lules adiposes amb una sola gota de lípids al citoplasma on emmagatzema l'excés d'energia provinent de la dieta en forma de triglicèrids per a posteriorment alliberar-los al torrent sanguini en forma d'àcids grassos lliures, quan hi ha un requeriment energètic. Al teixit adipós marró, C/EBP β participa en la maduració dels adipòcits, com així demostra l'estudi d'aquest teixit en animals genoanul·lats, on els pre-adipòcits donen lloc a adipòcits immadurs, però aquests no són capaços de continuar el procés de diferenciació. La maduració dels adipòcits també es veu compromesa al teixit adipós blanc, el volum del qual es veu clarament reduït en delectonar C/EBP β (Tanaka et al, 1997) (Staiger et al, 2009). Estudis histològics expliquen aquest fet, ja que s'observa que la mida dels adipòcits es redueix un 50% en absència del factor de transcripció, fet que suggereix un defecte en l'acumulació dels triglicèrids (Schroeder-Gloeckler et al, 2007). Aquests resultats confirmen doncs el paper clau de C/EBP β durant l'adipogènesi.

Ovaris. En contraposició als mascles, les femelles en delectonar C/EBP β resulten estèrils. A l'ovari, el desenvolupament del fol·licle s'inicia en formar-se el fol·licle primari, que es compon de cèl·lules pre-granuloses que envolten l'òvul. En ésser estimulades per l'hormona FSH (de l'anglès, *follicle-stimulating hormone*) les cèl·lules de la granulosa comencen a proliferar, fet que duu a la maduració del fol·licle fins a l'estadi pre-ovulatori. En aquest punt, les cèl·lules de la granulosa del fol·licle madur són estimulades per l'hormona LH (de l'anglès, *luteinizing hormone*) que n'indueix el trencament i n'allibera l'òvul. Aquesta hormona també estimula la diferenciació de les cèl·lules de la granulosa a cèl·lules luteals. Aquest procés dóna lloc a la formació del cos luti que actua com un òrgan endocrí transitori necessari per al desenvolupament de l'embaràs, ja que és una font essencial de progesterona (Figura 11A). Experiments realitzats amb femelles genoanul·lades demostren el paper crític de C/EBP β per a la formació del cos luti, ja que en la seva absència, les cèl·lules de la granulosa no són capaces de diferenciar-se i per



tant no s'observa la seva formació, fet que impedeix l'embaràs (Figura 11B i C) (Sterneck et al, 1997).

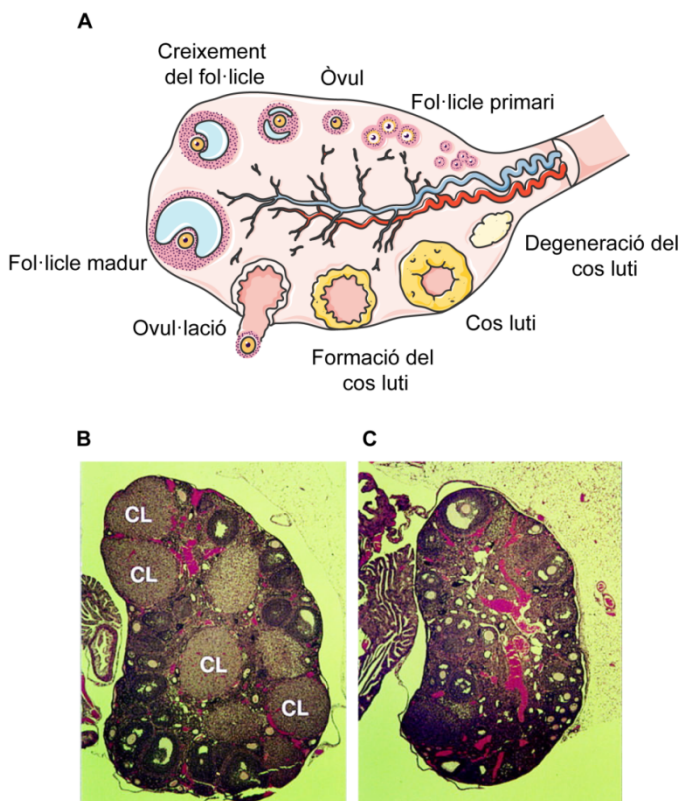


Figura 11. A. Representació del procés d'ovulació. B. Ovari d'una femella no genoanul·lada on s'observen els cossos lútics (CL). C. Ovari d'una femella genoanul·lada on no s'observa la formació dels cossos lútics per efecte de la deleció de C/EBP β . B i C adaptades de (Sterneck et al, 1997).

Glàndula mamària. Els defectes ovàrics no són els únics que s'observen a les femelles quan s'elimina l'expressió de C/EBP β , ja que les glàndules mamàries d'aquests animals també presenten un desenvolupament defectuós. No obstant, a la pubertat, la formació dels conductes ductals es quasi normalitza quan es trasplanten els ovaris provinents de femelles no modificades a femelles genoanul·lades. Aquest resultat demostra que l'alterament de la funció ovàrica afecta al desenvolupament de la glàndula mamària. Durant l'embaràs, té lloc el

desenvolupament dels conductes alveolars. Aquests també presenten una morfologia anòmala que en aquest cas el trasplantament d'ovaris a les femelles mutants no és capaç de normalitzar. Finalment, l'ablació de C/EBP β també resulta en una reducció de l'expressió de les proteïnes WAP (de l'anglès, *Whey acidic protein*) i β -caseïna presents al teixit mamari durant la lactància. Aquests resultats indiquen doncs que C/EBP β és un factor crític tant en el desenvolupament de la glàndula mamària durant la pubertat i l'embaràs, com en la producció de la llet necessària per a la lactància dels nadons (Robinson et al, 1998).

Cèl·lules hematopoètiques. C/EBP β també resulta ésser un factor important en el desenvolupament de les funcions de les cèl·lules hematopoètiques. Així, l'absència del factor de transcripció resulta en lesions a la pell, limfadenopatia, inflamació dels nodes limfàtics i esplenomegàlia, amb una morfologia i mida anormal de les polpes vermella i blanca, en animals envellits. L'atenta examinació dels teixits d'aquests animals mostra que la deleció de C/EBP β provoca una proliferació anòmala de les cèl·lules limfàtiques, sobretot de les cèl·lules B. A més, els animals genoanul·lats són més susceptibles a la infecció del bacteri *Candida albicans*, fet que suggereix una alteració de la resposta immune. Aquesta hipòtesi es confirma en analitzar la resposta de les cèl·lules T, ja que aquestes mostren un fenotip antiinflamatori Th2 que no és capaç d'eliminar el patògen. Igualment, els macròfags també mostren un perfil d'activació antiinflamatori amb una reducció de la producció de NO, fet que també pot contribuir a la supervivència del bacteri i per tant a la mort dels animals (Screpanti et al, 1995).

SNC. C/EBP β s'expressa tant en cèl·lules neuronals com glials, on participa en la regulació de l'expressió gènica als processos de plasticitat sinàptica, memòria, neuroinflamació, neurogènesi, diferenciació i proliferació neuronal i apoptosi.

★ Funcions de C/EBP β neuronal. Quan s'aprèn una nova informació, el SNC experimenta diferents canvis biològics. Si aquesta informació resulta prou important com per ésser recordada, varis processos s'activen per tal de formar un nou record. En un primer moment, aquesta informació recent adquirida pot



ésser alterada i fins i tot eliminada per diferents pertorbacions o estímuls, com ara un traumatisme o un tractament farmacològic. No obstant, a través de la consolidació el nou record esdevé estable. El procés de consolidació però requereix d'una cascada d'expressió gènica que s'indueix durant l'adquisició de la nova informació allargant-se durant algunes hores. CREB és un element regulador d'aquest procés altament conservat a l'hipocamp i l'amígdala. Al principi, just després de l'entrenament l'activació de CREB s'observa a les neurones del gir dentat i CA1, seguida de l'activació de C/EBP β a les mateixes cèl·lules neuronals (Taubenfeld et al, 2001b). La inducció de C/EBP β resulta essencial per al procés de consolidació que té lloc durant les primeres 24h, ja que el silenciament de la seva expressió a 5 i 24h després de l'adquisició de la nova informació en provoca l'oblit (Taubenfeld et al, 2001a).

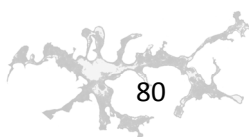
No obstant, aquesta no és l'única funció de C/EBP β neuronal, ja que la seva activació per fosforilació a través de la via PI3K promou la diferenciació neuronal al cervell post-natal de rata. A més, la sobreexpressió del factor de transcripció en una línia cel·lular de neuroblastoma indueix la formació de neurites i augmenta l'expressió de MAP2 i NeuN (Cortes-Canteli et al, 2002). C/EBP β també és present a la població de cèl·lules mares neurals a l'hipocamp, una de les dues zones del cervell adult on es produeix la neurogènesi durant l'edat adulta. Estudis realitzats amb animals genoanul·lats, mostren que en absència del factor de transcripció es produeix una disminució del nombre de cèl·lules progenitores que proliferen a la zona subgranular del gir dentat, alhora que es redueix la diferenciació i la supervivència de les noves neurones generades. Així doncs, C/EBP β és un dels factors de transcripció que regula la proliferació i la diferenciació neuronal (Cortes-Canteli et al, 2011).

Finalment, resultats oposats s'han descrit en estudiar el paper de C/EBP β en la inducció de l'apoptosi neuronal. Així, experiments realitzats en una línia cel·lular de neuroblastoma suggereixen que aquest factor de transcripció indueix l'apoptosi neuronal a través de l'activació de p53 (Cortes-Canteli et al, 2002).



D'altres resultats obtinguts en una situació d'hipòxia però, mostren un paper antiapoptòtic de C/EBP β per la inhibició de CHOP i p53, repressors del gen antiapoptòtic Bcl-2, a través dels dominis de trans-repressió presents a l'extrem C-terminal d'ambdues proteïnes (Halterman et al, 2008). Una possible explicació d'aquesta discrepància, és el fet que cap dels treballs anteriors estudia la presència i activitat de les tres isoformes d'aquest factor de transcripció, per separat. Aquest és un punt important ja que s'ha demostrat que l'activitat transcripcional de C/EBP β és regulada per la proporció LIP/LAP com a conseqüència de l'activitat repressora de la primera. Així, un estudi recent demostra que durant l'apoptosi neuronal, Full i LAP experimenten una reducció de la seva expressió, mentre que els nivells de LIP augmenten. A més, la disminució de Full i LAP sembla ésser el factor crític que indueix l'apoptosi, ja que la seva sobreexpressió l'inhibeix (Pena-Altamira et al, 2014). Aquest fet posa de manifest una complicació afegida a l'hora d'interpretar les dades obtingudes en estudiar les funcions d'aquest factor de transcripció, que s'uneix a les diferències experimentals dels estudis, possible origen també de les discrepàncies.

- ★ Funcions de C/EBP β glial. C/EBP β s'expressa als astròcits i a la micròglia en cultius primaris. No obstant, mentre que quasi totes les cèl·lules microgials l'expressen, el factor de transcripció només és present al 20% dels astròcits. A més, els nivells d'expressió són majors a la micròglia. En ésser tractats amb LPS, aquests cultius mostren un increment dels nivells d'ARNm de C/EBP β . Aquest augment és visible 2 i 8h després del tractament, mentre que l'expressió retorna quasi a nivells basals 4h després de l'estímul. L'expressió proteica també es veu incrementada fins a assolir el nivell màxim després de 16h. L'administració sistèmica del LPS en ratolins adults resulta en un augment dels nivells de C/EBP β a les cèl·lules microgials, mentre que els astròcits no presenten expressió ni per efecte del tractament ni en expressió basal i la tènue senyal neuronal observada no és afectada per l'estímul (Ejarque-Ortiz et al, 2007a).



A més del tractament amb LPS, TNF α , IL-1 β i IFN γ són altres estímuls que també indueixen l'expressió de C/EBP β . Cultius d'astròcits humans tractats amb IL-1 β , mostren una disminució dels nivells d'expressió de gens considerats proinflamatoris, com ara NOS2 i COX2 entre d'altres, en silenciar C/EBP β (Fields & Ghorpade, 2012). Aquest resultat confirma la regulació d'aquests gens per part de C/EBP β observada en experiments realitzats en cultius de glia mixta i micròglia primària de ratolins genoanul·lats, que a més mostren una disminució dels nivells d'expressió de la prostaglandina E sintasa (Ptges). Aquests estudis també reporten una disminució de la producció de NO i de PGE₂ en absència de C/EBP β , validant així el paper d'aquest factor de transcripció en la resposta proinflamatòria (Straccia et al, 2011) (Straccia et al, 2013).

Finalment, la glicoproteïna C3 (de l'anglès, *Complement protein 3*) de la via del complement, implicada en l'opsonització de patògens i en les respostes inflamatòria i immune, desenvolupa al SNC un paper important en la eliminació de sinapsis durant el desenvolupament alhora que regula la neurogènesi a l'hipocamp adult. A més, a astròcits humans, l'absència de C/EBP β indueix una reducció de la seva expressió, fet que suggereix una implicació directa de C3 en els efectes proinflamatoris de C/EBP β (Hernandez-Encinas et al, 2015).

- ★ Funcions de C/EBP β en condicions neuropatològiques. La mort cel·lular per excitotoxicitat ha estat descrita a varies malalties neurodegeneratives. El tractament amb àcid kaínic en ratolins activa els receptors KA localitzats a la zona CA3 de l'hipocamp, provocant així la despolarització de les cèl·lules seguida d'un augment de la concentració de Ca⁺² intracel·lular, fet que resulta en una mort neuronal excitotòxica. Les cèl·lules glials també desenvolupen un paper important en la neurodegeneració induïda per l'àcid kaínic, ja que aquest també provoca una resposta inflamatòria. A més, els nivells d'expressió de C/EBP β augmenten en injectar-lo a l'hipocamp, provocant així un increment de la producció de la interleucina IL-1 β i l'enzim COX2, fet que potencia la mort



neuronal. Experiments realitzats amb animals genoanul·lats mostren clarament una reducció de l'activació glial, així com una disminució de la producció de proteïnes proinflamatòries. Finalment, en estudiar la viabilitat neuronal, aquests animals presenten una degeneració menor. Així doncs, aquests resultats demostren que C/EBP β juga un paper clau en el desenvolupament del dany neuronal com a resposta a un estímul exitotòxic (Cortes-Canteli et al, 2008).

A banda de l'excitotoxicitat, la neuroinflamació també juga un paper important en la neurodegeneració. A la malaltia d'Alzheimer, l'acumulació d'agregats del pèptid A β i la formació de plaques activen les cèl·lules gials, provocant una resposta crònica inflamatòria. Tal i com ja s'ha descrit, C/EBP β juga un paper important en la regulació de l'activació glial. Els primers estudis realitzats en cultius de glia mixta de rata mostren que diferents pèptids d'A β bloquegen la unió de C/EBP β a l'ADN, alhora que disminueixen els nivells d'expressió de la seva proteïna, durant la resposta a estímuls proinflamatoris com IL-1 β o LPS (Samuelsson et al, 2008). No obstant, experiments realitzats amb mostres de malalts d'Alzheimer mostren un increment de l'expressió del factor de transcripció a les cèl·lules microgials localitzades al voltant dels dipòsits d'A β (Strohmeier et al, 2014). Aquestes dades resulten ser contradictòries, però a l'hora de comparar aquests estudis cal considerar les diferències entre els models proposats. Per una banda, es descriu l'efecte agut d'A β sobre cèl·lules primàries, mentre que per altra banda es descriuen els efectes observats al teixit humà *post-mortem* a conseqüència de l'exposició crònica a l'acumulació d'A β . Així, la reducció de l'activitat de C/EBP β podria ésser un efecte inicial de l'acumulació d'A β , que posteriorment podria ser compensat per mecanismes encara desconeguts. Per tant, aquests estudis demostren una desregulació de l'expressió i activitat de C/EBP β a la malaltia d'Alzheimer que caldrà ésser estudiada més detingudament.

L'esclerosi lateral amiotròfica és una altra de les malalties neurodegeneratives on l'activació glial juga un paper important. Novament, l'expressió de C/EBP β augmenta en analitzar mostres humanes *post-mortem* de medul·la espinal



afectades per la patologia. Aquesta expressió és bàsicament microglial, tot i que també s'observen nuclis marcats d'altres tipus cel·lulars no identificats. Considerant l'exacerbada resposta inflamatòria observada al model animal de la malaltia, on els gens NOS2 i COX2, conegudes dianes de C/EBP β presenten un clar augment de la seva expressió, una possible inhibició del factor de transcripció podria resultar neuroprotectora en disminuir la resposta neurotòxica present a la malaltia (Valente et al, 2012).

Aquesta estratègia ha estat provada en un model animal d'isquèmia. La hipòxia és un conegut inductor de l'expressió de C/EBP β que activa la transcripció d'IL-6. La inducció d'isquèmia focal en ratolins genoanul·lats resulta en una disminució de la mida de les lesions, així com amb un menor nombre de dèficits neurològics. A més, l'ablació de C/EBP β disminueix l'expressió exacerbada de gens proinflamatoris induïda per la condició patològica disminuint així la mort neuronal. Així doncs, aquests resultats, indiquen que la reducció de l'expressió de C/EBP β resulta neuroprotectora en condicions d'isquèmia cerebral (Kapadia et al, 2006).

Finalment, en estudiar mostres de gliomes humans, l'expressió de C/EBP β també es veu clarament augmentada, fet que juntament amb les observacions reportades de la implicació de C/EBP β en el desenvolupament de diferents tipus de tumors, genera la hipòtesi d'un possible paper del factor de transcripció durant el creixement del glioma. Amb aquest objectiu, (Aguilar-Morante et al, 2011) silencien l'expressió de C/EBP β a una línia cel·lular de glioblastoma murí, fet que resulta en una disminució de la proliferació i la viabilitat cel·lular. A més, l'habilitat de les cèl·lules del glioma per a envair el teixit que l'envolta també es veu clarament reduïda en absència de C/EBP β , ja que la seva motilitat decreix. L'anàlisi transcriptòmica realitzada mitjançant la tècnica de *microarrays*, revela que la deleció de C/EBP β augmenta l'expressió de gens implicats en el procés de dany a l'ADN com ATM, Brca1, Brca2, Chek1, Chek2 i p27 (de l'anglès, *Ataxia telangiectasia mutated, Breast cancer 1 and 2* i



Checkpoint kinase 1 and 2 respectivament). En canvi, l'expressió dels gens relacionats amb l'adhesió, invasió i metàstasi *Itga3*, *Mcam1*, *Plaur* i *S100A4* (de l'anglès, *Integrin $\alpha 3$* , *Melanoma cell adhesion molecule*, *Plasminogen activator urokinase receptor* i *S100 Calcium binding protein A4*, respectivament) es redueix clarament. Finalment, la injecció intracranial de les cèl·lules de glioblastoma murí mostra una reducció clara de la mida del tumor alhora que s'observa un retard en la seva aparició i progressió quan se silencia l'expressió de C/EBP β (Figura 12).

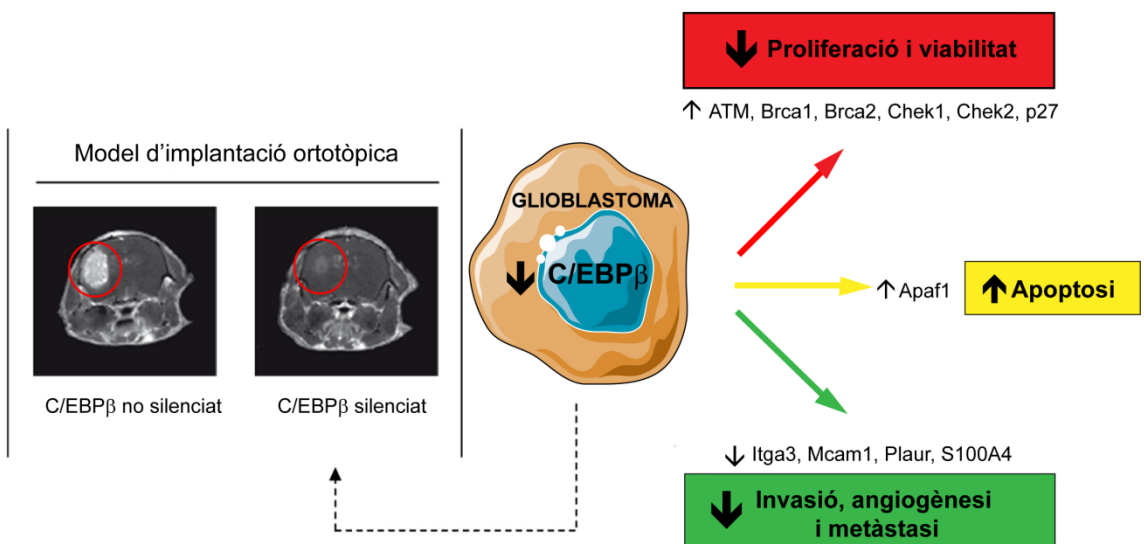


Figura 12. Possible mecanisme pel qual la inhibició de C/EBP β podria resultar una diana terapèutica en el tractament contra el glioblastoma. Adaptada de (Aguilar-Morante et al, 2011).

Així doncs, els resultats aquí descrits mostren la implicació de l'activitat de C/EBP β al context neuropatològic i el freqüent efecte neuroprotector de la seva ablació. No obstant, mentre a les neurones el paper de C/EBP β sembla estar relacionat amb la memòria, a les cèl·lules glials aquest factor de transcripció actua regulant la seva activació i la conseqüent resposta inflammatòria. Així, amb l'objectiu de confirmar aquestes observacions i d'esbrinar els mecanismes afectats per C/EBP β a les

diferents cèl·lules del cervell, fóra interessant estudiar la seva deleció de manera específica als diferents tipus cel·lulars del SNC. Per aquesta raó i atès l'interès que té per la recerca desenvolupada durant la realització d'aquesta tesi, a continuació es detallaran diferents estratègies per a modificar l'expressió gènica específicament a les cèl·lules microglials.

1.1.5 Modificació de l'expressió gènica microglial.

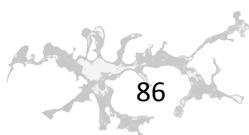
Les estratègies de modificació genètica representen actualment una eina imprescindible per a l'estudi de les cèl·lules de la micròglia. Aquestes estratègies es poden classificar en tres categories diferents: marcatge, alteració de l'expressió gènica i depleció de les cèl·lules microglials. No obstant, amb independència de l'estratègia escollida, el punt clau d'aquestes tècniques és triar l'element genètic que controlarà l'expressió del gen d'interès, és a dir, el promotor d'un gen ben caracteritzat i específic del tipus cel·lular que es vol estudiar.

Atès l'ampli ventall de possibilitats que ofereix per a eliminar o activar l'expressió d'un gen, l'establiment del sistema Cre-loxP va marcar un punt d'inflexió per a la manipulació genètica. La recombinasa Cre és una proteïna de 38 kDa del bacteriòfag P1, que catalitza la recombinació de l'ADN que es troba flanquejat per dues seqüències loxP. Aquestes seqüències consten de 34 pb que contenen dues repeticions invertides de 13 pb i un nucli no palindròmic de 8 pb (Figura 13A). Cadascuna de les seqüències de 13 bp s'uneix a un monòmer de la recombinasa Cre i atès que aquesta actua de forma estequiomètrica, són necessàries quatre molècules de Cre per a cada recombinació. Així, l'acció de Cre resulta en la deleció irreversible del fragment d'ADN flanquejat (florejat) per les seqüències loxP i ja que la recombinasa pot ésser inserida sota el control de promotors específics d'un determinat tipus cel·lular o bé induïbles, és possible controlar a on i quan es produeix l'ablació gènica (Figura 13B) (Sauer, 1998). Així, en el cas de les cèl·lules de la micròglia són varis els promotors de gens específics del llinatge mieloide els



que poden ésser emprats per a controlar l'activitat de la recombinasa Cre. A més, aquesta activitat pot ser induïble si juntament amb Cre s'expressa el domini d'unió del receptor d'estrògens humà MER. En aquesta situació el conjunt MER/Cre^{ER} s'expressa específicament a un tipus cel·lular, però es localitza al citoplasma. I només quan s'administra Tamoxifen (TAM), el seu metabòlit hepàtic 4-hidroxitamoxifen (4-OHT) s'uneix a Cre^{ER} provocant la seva translocació al nucli, a on es produeix la recombinació Cre-loxP (Figura 13C). Però aquesta estratègia no només permet l'ablació d'un gen, atès que també pot ser emprada per a marcar un llinatge cel·lular específic en un moment determinat, per tal de monitoritzar així totes les cèl·lules que d'ell en derivin. Amb aquest objectiu, un senyal "STOP" flanquejat per les dues seqüències loxP és inserit davant del gen d'interès, normalment codificant per a una proteïna fluorescent, que n'impedeix la seva expressió fins que Cre és induïda i l'elimina per recombinació (Figura 13D) (Wieghofer et al, 2015).

La funció microglial dins del SNC sa o en un context patològic també pot ésser estudiada mitjançant la depleció d'aquesta població cel·lular. Amb aquest fi, una de les estratègies més utilitzades recentment és la inserció del gen HSV-TK (de l'anglès, *Herpes simplex derived thymidine kinase*) sota el control d'un promotor específic de les cèl·lules de la microglia. Durant la mitosi, HSV-TK actua fosforilant l'agent antivíric Ganciclovir. A més, les cinases cel·lulars complementen el procés de fosforilació, fet que resulta en la formació del compost tòxic tri-fosfat. Aquest competeix amb la timina provocant així el trencament de les cadenes d'ADN recent sintetitzades i la mort cel·lular (Figura 13E i F) (Wieghofer et al, 2015).



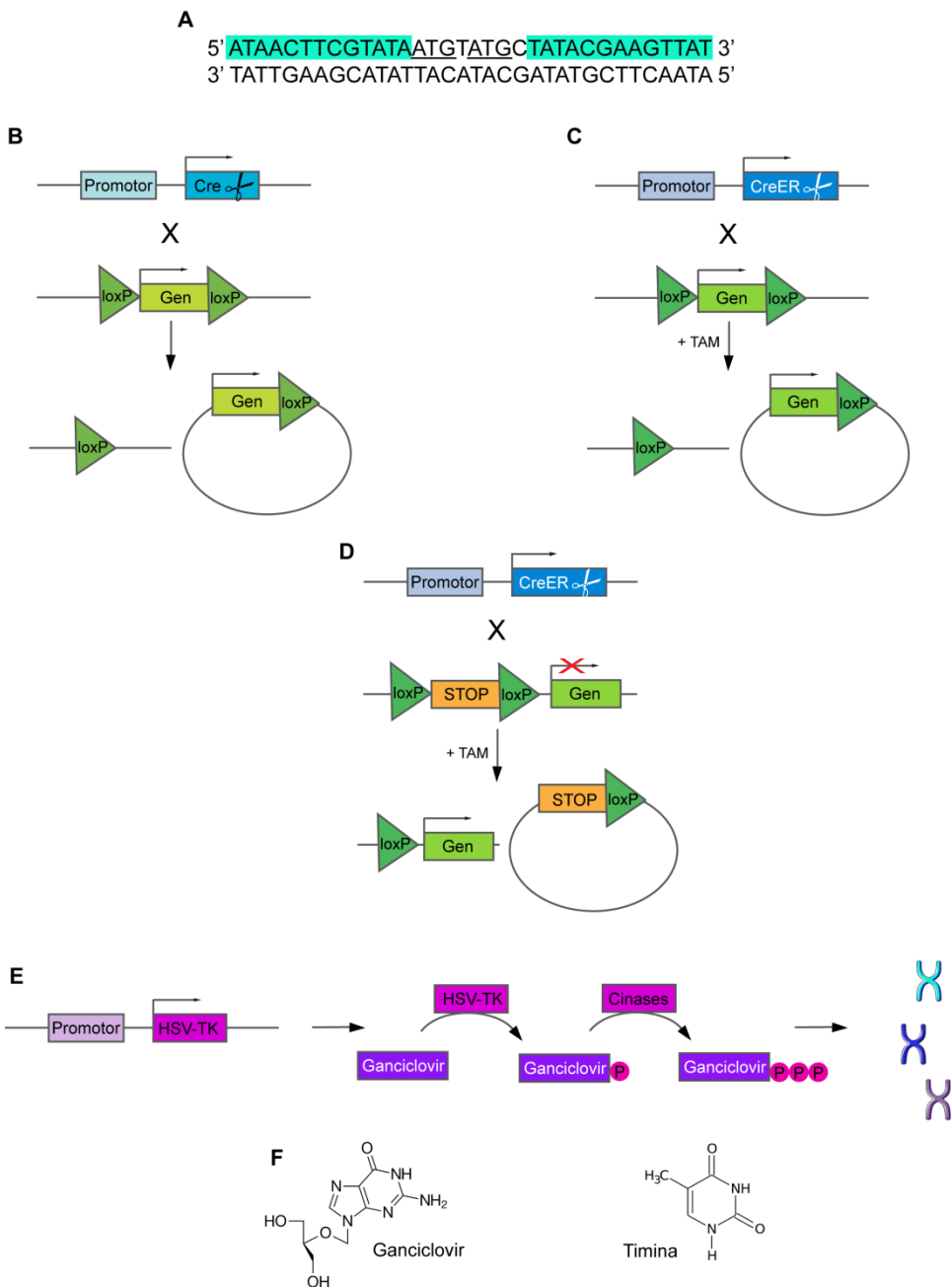


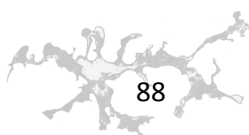
Figura 13. A. Seqüència loxP de 34 pb, en blau es destaquen les dues repeticions invertides de 13 pb i subratllats s'indiquen els dos codons ATG presents al nucli de 8 pb. B. Representació esquemàtica del sistema Cre-loxP on la recombinasa es troba sota el control d'un promotor específic. C. Representació on a més d'ésser controlada pel promotor del llinatge cel·lular l'activitat de Cre és induïda mitjançant l'administració de Tamoxifen (TAX). D. Representació on Cre localitzada i induïda recombinava un senyal "STOP" fet que resulta en l'expressió del gen prèviament silenciada. E. Esquema de la depleció cel·lular produïda per la fosforilació de l'agent anti-víric Ganciclovir per acció de gen HSV-TK, l'expressió del qual es troba controlada per un promotor específic. F. Fórmules del Ganciclovir i la timina.

1.1.5.1 Promotors microglials.

- ★ **CD11b.** El promotor d'aquest gen ha estat emprat per a marcar (EGFP), manipular genèticament (Cre-loxP) i eliminar (HSV-TK) les cèl·lules microglials. El ratolí CD11b-Cre va ser descrit per primera vegada l'any 2005. En aquests animals, per tal de caracteritzar l'especificitat de l'activitat de Cre, la recombinació d'un senyal "STOP" resulta en l'expressió de la proteïna fluorescent verda EGFP. En aquests animals, la recombinació té lloc als granulòcits de la melsa i la medul·la òssia, als osteoclasts, a les cèl·lules dendrítiques, a la micròglia, a les cèl·lules B i T i als macròfags peritoneals, sent aquests últims el tipus cel·lular que presenta l'eficiència de recombinació més alta, propera al 100% (Ferron & Vacher, 2005).

- ★ **CD11c.** El gen CD11c s'expressa a monòcits, limfòcits, granulòcits i majoritàriament a les cèl·lules dendrítiques. El primer ratolí descrit on la recombinasa Cre es troba sota el control del promotor CD11c data de l'any 2007. La recombinació en aquests animals té lloc majoritàriament i amb una alta eficiència a les cèl·lules dendrítiques presents a tots els teixits, al 10% dels limfòcits i a l'1% dels granulòcits. Una petita fracció de les cèl·lules microglials també presenten expressió de Cre, no obstant aquest no és el millor promotor per a estudiar aquest tipus cel·lular (Caton et al, 2007).

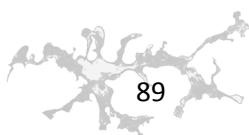
- ★ **CSF1R.** El receptor de CSF-1 juga un paper fonamental durant el desenvolupament i el manteniment de les diferents poblacions de macròfags. Aquest promotor també ha estat emprat per a controlar l'expressió de la recombinasa Cre (Deng et al, 2010). Sorprenentment però, l'ús d'aquests ratolins ha demostrat que una petita subpoblació neuronal localitzada a l'escorça i a l'hipocamp expressa CSF1R, expressió que tradicionalment al SNC s'havia considerat exclusivament microglial (Luo et al, 2013). Aquest fet, indica que aquest promotor pot no ésser el més indicat per a estudiar



l'expressió gènica microglial, ateses les interferències neuronals que hi podria haver.

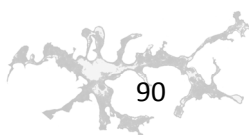
- ★ **CX3CR1.** Actualment, el promotor d'aquest gen és el més utilitzat per a estudiar la funció de les cèl·lules microgials, ja que la descripció del ratolí on l'expressió de la proteïna fluorescent verda resta sota el control d'aquest promotor, va suposar tota una revolució en el camp de la neurociència (Jung et al, 2000). A més, un estudi recent descriu un model animal a on l'expressió de la recombinasa Cre s'indueix per l'acció del Tamoxifen. Aquest plantejament aprofita la llarga vida de la microglia en comparació amb monòcits i macròfags perifèrics. Així, l'administració de Tamoxifen provocarà l'expressió de Cre a les cèl·lules mieloides, però passades dues setmanes els efectes de la recombinació només s'observen a les cèl·lules microgials. Així doncs, aquest model es postula com una eina eficaç per a estudiar la microglia sense la interferència de les cèl·lules mieloides perifèriques (Goldmann et al, 2013).

- ★ **LysM.** L'enzim lisozima M actua hidrolitzant enllaços glicosídics del peptidoglicà, el polímer majoritari de la membrana extracel·lular dels bacteris Gram positius, permetent així la degradació del bacteri i per tant constitueix una eina de la defensa contra les infeccions bacterianes. El ratolí LysM-Cre va ser descrit l'any 1999 per (Clausen et al, 1999). Aquests animals presenten una eficiència de recombinació propera al 100% a macròfags i granulòcits, mentre que en sub-poblacions de cèl·lules dendrítiques aquesta només arriba al 16%. Treballs publicats indiquen que aquest promotor presenta una baixa expressió a les cèl·lules microgials (Goldmann et al, 2013). Concretament, l'estudi de l'activitat del gen IKK β a la microglia revela una recombinació del gen propera al 40% en cultius primaris tractats amb LPS, mentre que l'administració d'àcid kaínic indueix una eficiència d'entre el 20 i el 70% segons la regió del SNC estudiada. Curiosament, tant *in vitro* com *in vivo* s'observa un increment de l'activitat de Cre a la microglia tractada respecte a l'observada a la microglia basal (Cho et al, 2008). Aquests resultats contrasten amb els obtinguts durant



el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral, on l'eficiència de recombinació del gen *C/EBP β* a les cèl·lules microgials és molt alta, tant en cultius primaris com en ratolins adults, i a més aquesta no depèn de l'estat d'activació microglial.

L'ús d'aquest promotor ha fet possible l'obtenció d'animals on l'expressió de *C/EBP β* s'ha deletionat a les cèl·lules de la micròglia, fet que ha permès estudiar el paper d'aquest factor de transcripció en aquest tipus cel·lular. En aquest treball es presenten les dades obtingudes emprant diferents tècniques com ara la immunocitoquímica, la PCR en temps real, l'anàlisi de proteïnes per Western blot, la seqüenciació de l'ARN o la inducció de models animals de neurodegeneració com la EAE o el model priònic murí, entre d'altres. Aquests resultats han permès definir un clar paper de *C/EBP β* com a regulador de l'activació microglial, així com un possible efecte neuroprotector de la seva absència en un context neurodegeneratiu.



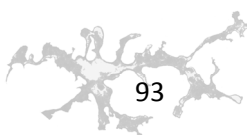
2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

1. El primer objectiu d'aquesta tesi doctoral és la generació de la colònia de ratolins $\text{LysMCre-C/EBP}\beta^{\text{fl/fl}}$ deficient en $\text{C/EBP}\beta$ selectivament a cèl·lules de la micròglia mitjançant el sistema Cre/Lox.

2. El segon objectiu és l'estimació de l'eficiència de recombinació del gen de $\text{C/EBP}\beta$ a les cèl·lules de la micròglia dels ratolins $\text{LysMCre-C/EBP}\beta^{\text{fl/fl}}$. L'estudi es realitzarà:
 - a. *In vitro*, emprant cultius primaris de micròglia i glia mixta d'animals $\text{C/EBP}\beta^{\text{fl/fl}}$ i $\text{LysMCre-C/EBP}\beta^{\text{fl/fl}}$.
 - b. *In vivo*, utilitzant cèl·lules microgials aïllades del cervell de ratolins adults $\text{C/EBP}\beta^{\text{fl/fl}}$ i $\text{LysMCre-C/EBP}\beta^{\text{fl/fl}}$.

3. El tercer objectiu és l'anàlisi dels efectes funcionals de la deleció de $\text{C/EBP}\beta$ microglial. Aquest objectiu inclou:
 - a. La determinació de la producció de NO, la quantificació de la mort cel·lular induïda per l'activació i l'estudi de la capacitat fagocítica de la micròglia primària.
 - b. L'anàlisi de l'expressió de gens proinflamatoris a les cèl·lules microgials, tant *in vitro* com *in vivo*.
 - c. L'avaluació d'un possible paper neuroprotector de l'absència de $\text{C/EBP}\beta$ als models animals de neurodegeneració:
 - i. EAE, model animal de l'esclerosi múltiple.
 - ii. ME7, model priònic murí.



4. El quart i últim objectiu és analitzar el perfil transcriptòmic de la micròglia primària, mitjançant la seqüenciació de l'ARN. Aquesta tècnica ens permetrà:
 - a. Estudiar la resposta de la micròglia primària $C/EBP\beta^{fl/fl}$ enfront els estímuls proinflamatoris LPS i LPS+IFN γ .
 - b. Determinar els canvis transcripcionals que es produeixen a la micròglia primària tractada amb LPS i LPS+IFN γ en eliminar l'expressió de $C/EBP\beta$.



3. MATERIAL I MÈTODES

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 Animals

La colònia de ratolins LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$, juntament amb els genotips control LysMCre, C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i *wild type*, emprada per a la realització d'aquesta tesi es va generar a partir del creuament de les soques LysMCre (Clausen et al, 1999) i C/EBP $\beta^{fl/fl}$ (Sterneck et al, 2006). La primera és comercialitzada per The Jackson Laboratory (B6.129P2-Lyz2tm1(cre)lfo/J ref. 004781), mentre que la segona va ésser cedida per la Dra. Esta Sterneck (National Cancer Institute, Frederick, MD). Tots els animals s'han mantingut estabulats amb accés a menjar i aigua *ad libitum* a les instal·lacions SPF (de l'anglès, *specific pathogen free*) de la Facultat de Medicina del Campus Clínic de la Universitat de Barcelona. Tots els procediments varen ésser aprovats pel Comitè ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona i per la Comissió per a l'Experimentació Animals de la Generalitat de Catalunya.

3.1.1 Protocol de genotipatge.

Per tal de seleccionar els genotips d'interès per a dur a terme el treball experimental, tot els animals nascuts s'han genotipat emprant el kit KAPA Mouse Genotyping (ref. KK7302, Kapa Biosystems) seguint el següent protocol:

Extracció de l'ADN.

1. Per a cada mostra de cua cal preparar 100 μ l que continguin:
 - a. 2 μ L d'enzim d'extracció.
 - b. 10 μ L de tampó d'extracció 10X.
 - c. 88 μ L d'aigua estèril, lliure de ADNases i ARNases.
2. A un bany d'aigua, s'incuben les mostres a 75°C durant 10 minuts.
3. S'inactiva l'activitat enzimàtica incubant les mostres a 95°C a un bany sec.



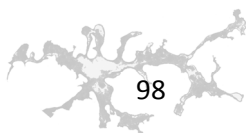
4. Se centrifuga a 16.000g durant un minut i es procedeix a preparar la reacció d'amplificació de l'ADN.

Amplificació de l'ADN.

1. Per a cada mostra cal preparar 2 tubs *ependorf* de 0.2 mL, un per a cadascuna de les mutacions:

LysMCre		C/EBPβ ^{fl/fl}	
KAPA2G mix (2X)	12.5 µL	KAPA2G mix (2X)	12.5 µL
Encebador oIMR3066 (10µM) 5'-CCCAGAAATGCCAGATTACG-3'	1.5 µL	Encebador <i>forward</i> (10µM) 5'-GAGCCACCGCGTCTCTCCAGC-3'	1.25 µL
Encebador oIMR3067 (10µM) 5'-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC-3'	2.5 µL	Encebador <i>reverse</i> (10µM) 5'-GGTCGGTGCGGTCATTGCC- 3'	1.25 µL
Encebador oIMR3068 (1µM) 5'-TTACAGTCGCCAGGCTGAC-3'	1.25 µL	DMSO (Dimetilsulfòxid) estèril	1.25 µL
DMSO (Dimetilsulfòxid) estèril	1.25 µL	H ₂ O estèril, lliure de ADNases i ARNases	7.75 µL
H ₂ O estèril, lliure de ADNases i ARNases	5 µL		

2. S'afegeix 1µL de mostra a cada tub i es procedeix a realitzar la reacció d'amplificació emprant el termociclador de Bio-Rad PTC-1148, seguint els programes:



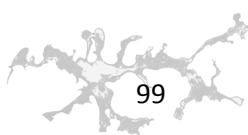
LysMCre		C/EBP β ^{fl/fl}	
I.	95°C, 3 minuts	I.	95°C, 3 minuts
II.	95°C, 15 segons	II.	95°C, 15 segons
III.	62°C, 15 segons	III.	62°C, 15 segons
IV.	72°C 10 segons	IV.	72°C 10 segons
V.	Repetir els passos II-IV 35 vegades	V.	Repetir els passos II-IV 35 vegades
VI.	72°C 2 minuts	VI.	72°C 2 minuts
VII.	4°C ∞	VII.	4°C ∞

- Es prepara un gel d'agarosa al 2% en 100 mL de tampó TAE (1X). Es dissol l'agarosa escalfant la barreja al microones i s'afegeixen 5 μ L de Midori Green Advance (ref. B4MG04, Nippon Genetics distribuïdor: Cultek).
- S'aboca la mescla a la cubeta i es col·loca la pinta corresponent. Es deixa refredar a temperatura ambient.
- Un cop finalitzada la reacció d'amplificació es carregen 15 μ L de l'estàndard (ref. SM0321, Thermo Scientific) al primer pou i 20 μ L de mostra a la resta i es procedeix a realitzar l'electroforesi aplicant un corrent de 100 V durant 30-45 minuts.
- Es visualitzen i fotografien els productes d'amplificació mitjançant un transil·luminador de llum UV.
- Es descarta al bidó de residus citotòxics el gel i es neteja adequadament la superfície de treball.

3.2 Cultius cel·lulars.

Material i reactius emprats

Tipus de placa o flascó	Proveïdor	Referència	Volum de sembrat
Placa 96 pous	NUNC	167008	0.1 mL/pou
Placa 48 pous	NUNC	150687	0.3 mL/pou
Placa 24 pous	NUNC	142475	0.5 mL/pou
Flascó T25	TPP	90026	5 mL
Flascó T75	NUNC	156499	15 mL



		Producte	Proveïdor	Referència	Concentració inicial	Concentració final
DFF ₁₀	DFF ₀	Medi DMEM/F-12	Life technologies	31330-038	1X	1X
		Penicil·lina - estreptomicina	Life technologies	15140-122	10.000 U/mL 10.000 µg/mL	10 U/mL 10 µg/mL
		<i>Fungizone</i> (AmfotericinaB)	Life technologies	15290-018	250 µg/mL	0.5 µg/mL
	Sèrum fetal boví (FBS)	Life technologies	10270-106	N/A	10%	
	Desoxiribonucleasa I (ADNasa)	Sigma-Aldrich	D5025-150KU	4 mg/mL	0.16 mg/mL	
	Tripsina – EDTA	Life technologies	25200-072	0.25%	Depèn del tipus de cultiu	

Preparació prèvia per a realitzar un cultiu primari de ratolí

1. S'encén l'estufa del laboratori i s'ajusta la temperatura a 37°C.
2. Preparació de la campana de dissecció:
 - a. Es neteja tota la superfície de la campana amb etanol 70% i es cobreix amb paper net.
 - b. Es col·loca la lupa dins de la campana.
 - c. Es col·loca un tros de paper al fons de les cubetes, s'omplen amb etanol 70% i es submergeixen les eines de dissecció.
 - d. Es preparen *eppendorfs* d'1.5 mL etiquetats amb el número del cultiu i el número del ratolí dins la llodrigada (exemple: 73.5, cultiu 73, ratolí número 5) per a recollir mostra de cua i realitzar el posterior genotipatge.
 - e. En una caixa amb gel es manté un tub Falcon de 50 mL amb PBS 1X estèril i fred.
 - f. S'agafen plaques de petri de 6 cm de diàmetre per a fer les disseccions.
 - g. S'agafa una bossa d'escombraries per als cadàvers.



- h. S'agafa un flascó rentador amb etanol 70% i paper per a netejar les eines entre ratolí i ratolí.
3. Preparació de la sala de cultius:
 - a. S'encén el bany d'aigua i es comprova que la temperatura sigui de 37°C.
 - b. S'escalfa el medi de cultiu al bany d'aigua.
 - c. Si l'ampolla de medi és nova, caldrà descongelar les alíquotes de sèrum fetal boví, penicil·lina-estreptomicina i *fungizone* necessàries per a complementar el medi.
 - d. Es descongelen les alíquotes de tripsina i desoxiribonucleasa I necessàries.

3.2.1 Cultiu de glia mixta

Els cultius primaris de glia mixta s'obtenen a partir de ratolins d'entre 0 i 3 dies d'edat. Els volums s'especifiquen per a 8 cervells.

1. Es dissecciona el cervell, descartant les meninges, el cervell mig i el cerebel per a obtenir les escorces. Aquestes es mantenen en una placa de petri de 6 cm de diàmetre amb 10 mL de PBS 1X en gel fins a disseccionar tots els cervells.
2. A la placa de petri es trossegem les escorces amb una fulla de bisturí (trossos el més petits possible).
3. Amb pipeta de 10 mL es passa el PBS + escorces a un tub Falcon de 15 mL.
4. Se centrifuga 2 minuts a 1000 rpm (200g).
5. S'aspira el PBS i es resuspèn el pellet en 12 ml de tripsina.
6. Es deixa a l'estufa a 37°C en agitació durant 30 minuts. Mentrestant en un tub Falcon de 50 mL es preparen 12 mL de DFF₁₀ i 500 µL de ADNasa i es deixa a la campana de cultius.



7. Amb pipeta de 10 mL s'aboquen les escorces + tripsina al Falcon de 50 mL amb DFF₁₀ i ADNasa.
8. S'homogeneïtza el teixit pipetejant 15 vegades amb pipeta sereològica de 10 mL.
9. Es deixa reposar 5 minuts aproximadament per a què sedimenti el teixit no disgregat. Mentrestant es prepara un tub Falcon de 50 mL amb un filtre de 100 µm.
10. S'agafa amb cura el sobrenedant i es filtra. Es deixa 1 mL aproximadament amb el medi i el teixit no disgregat.
11. Amb p1000 es pipeteja aquest teixit un màxim de 10 vegades i es passa pel filtre.
12. Se centrifuga 7 minuts a 1000 rpm (200g).
13. S'aspira el sobrenedant i es resuspèn el *pellet* en 30 mL de DFF₁₀ amb cura, utilitzant una pipeta de 25 mL.
14. Es compten les cèl·lules amb la càmera de Neubauer i se sembra a una densitat de 350.000 cèl·lules/mL.
15. Es mantenen les cèl·lules a 37°C amb un 5% de CO₂. Es realitza un canvi de medi un cop per setmana i s'utilitza el cultiu als 19-21 dies *in vitro* (DIV).

3.2.2 Cultiu de glia mixta a partir d'un únic embrió

Els cultius primaris de glia mixta a partir d'un únic embrió s'obtenen a partir de ratolins d'entre 0 i 3 dies d'edat.

1. Es prepara un *eppendorf* d'1.5 mL amb 1 mL de PBS 1X estèril i fred etiquetat amb el codi de cada embrió. Es conserven en gel.
2. Es dissectiona el cervell, descartant les meninges, el cervell mig i el cerebel per a obtenir les escorces que es guarden a l'*eppendorf* amb PBS 1X corresponent fins a finalitzar les disseccions.
3. Amb una pipeta de 1000 µL es pipeteja 3 vegades com a màxim per a fer una primera disgregació del teixit.



4. Se centrifuga a 1000rpm (200g) a 4°C durant 3 minuts.
 - ▶ A partir d'aquest pas el procediment se segueix a la sala de cultius.
5. S'aspira el sobrenedant i s'afegeix 1 mL de tripsina. Es resuspèn el *pellet* donant copets a l'*eppendorf*.
6. S'incuba a 37°C amb agitació durant 10 minuts.
7. Mentrestant, es prepara la quantitat necessària de medi *stop-tripsina* (per a 12 animals els volums serien: 12 mL de medi DFF₁₀ + 500 µL ADNasa).
8. Acabada la digestió amb tripsina, es passa el contingut de cada *eppendorf* a un tub Falcon de 15 mL degudament etiquetat amb el codi de cada animal i s'atura la digestió amb 1 mL de medi *stop-tripsina*. S'homogeneïtza per inversió 12 vegades fins a desfer el moc d'ADN.
9. Amb una p1000 es disgrega el teixit pipetejant unes 20-30 vegades fins a aconseguir una solució unicel·lular.
10. Se centrifuga a 1000 rpm (200g) durant 7 minuts.
11. Es resuspèn el *pellet* en 6 mL de medi DFF₁₀ i se sembra un flascó T25 per a cada ratolí.
12. Es mantenen les cèl·lules a 37°C amb un 5% de CO₂. Es realitza un canvi de medi un cop per setmana. El cultiu és confluent als 16 ±3 dies *in vitro* (DIV), i es realitza un cultiu secundari quan el cultiu arriba als 19-21 dies *in vitro* (DIV).

3.2.3 Subcultiu de glia mixta de ratolí

⇒ Prèviament cal escalfar al bany d'aigua de cultius a 37°C una ampolla amb medi DFF₀, una ampolla amb medi DFF₁₀ i una alíquota de tripsina.

1. El flascó es renta dues vegades amb medi DFF₀.
2. S'afegeix la tripsina. S'incuba 5 minuts a l'incubador a 37°C. Passat aquest temps, la majoria de cèl·lules s'han desenganxat. Es poden donar petits copets al flascó per a acabar de desenganxar-les.



3. S'atura l'acció de la tripsina afegint al flascó un volum de medi DFF₁₀ igual a l'afegit de tripsina.
4. Es recullen les cèl·lules a un tub Falcon de 50 mL i se centrifuga 5 minuts a 1000 rpm (200g).
5. S'aspira el sobrenedant i es resuspèn el *pellet* en 5 mL de medi DFF₁₀.
6. Es compten les cèl·lules amb la càmera de Neubauer i se sembra a una densitat de 166.000 cèl·lules/mL.
7. Es mantenen les cèl·lules a 37°C amb un 5% de CO₂. Es realitza un canvi de medi un cop per setmana i s'utilitza el cultiu als 19-21 dies *in vitro* (DIV).

3.2.4 Cultiu de micròglia

Aquest cultiu es prepara a partir del cultiu de glia mixta o del subcultiu de glia mixta. Un dia abans del cultiu de micròglia es fa un canvi de medi del cultiu que s'emprarà.

⇒ Com al subcultiu de glia mixta, prèviament cal escalfar al bany d'aigua de cultius a 37°C una ampolla amb medi DFF₀, una ampolla amb medi DFF₁₀ i una alíquota de tripsina.

1. S'etiqueten tubs Falcon de 15 mL per a cada placa o de 50 mL per a cada flascó amb el codi de les plaques o dels flascons.
2. Es guarda el medi condicionat de les cèl·lules al corresponent tub Falcon. Si una placa s'ha dividit i conté cèl·lules obtingudes a partir d'animals amb diferent genotip, es recull el medi de cada genotip per separat.
3. Es realitzen dos rentats amb medi DFF₀.
4. S'afegeix el corresponent volum de tripsina diluïda, preparada a partir d'un volum de tripsina-EDTA 0.25% més tres volums de medi DFF₀. Per exemple, per a un volum final de tripsina diluïda de 12 mL caldrà afegir a 3 ml de tripsina-EDTA 0.25% i 9 mL de medi DFF₀.
5. S'incuba a 37°C durant 30-40 minuts o fins que la monocapa d'astròcits es desenganxi.



6. S'atura la tripsina amb el corresponent volum de medi DFF₁₀.
7. S'aspira i es retorna el medi condicionat a cada placa o flascó.
8. Es mantenen les cèl·lules microgials a 37°C amb un 5% de CO₂ durant 24h abans d'emprar-lo.

3.2.5 Tractaments:

LPS (*Escherichia coli* serotip 026:B6 ref. L-2654, Sigma-Aldrich)

La solució mare es prepara a una concentració d'1 mg/mL en PBS estèril i es guarda en alíquotes de 100 µL a -20°C. El tractament de LPS es prepara sempre en medi de cultiu DFF₁₀.

LPS+IFN γ (IFN γ de ratolí, ref. I4777, Sigma-Aldrich)

L'IFN γ es prepara reconstituïnt-lo a una concentració de 1 mg/mL en Na₂HPO₄ (10 mM pH=8). Posteriorment es fa una dilució 1/100 en medi DFF₁₀ per a obtenir la solució mare de concentració 10.000 ng/mL que es guarda en alíquotes de 10 o 50 µL a -20°C. El tractament de LPS+IFN- γ es prepara sempre en medi de cultiu DFF₁₀.

Tipus de cultiu	Aplicació	Tractament	Concentració	Temps
Microglia	Western blot	LPS+IFN γ	100 ng/mL i 1 ng/mL	24h
	Immunocitoquímica	LPS+IFN γ	100 ng/mL i 1 ng/mL	24h
	ARN (RT-PCR i ARN-Seq)	LPS	100 ng/mL	6h
		LPS+IFN γ	100 ng/mL i 1 ng/mL	
	Producció NO	LPS	100 ng/mL	48h
		LPS+IFN γ	100 ng/mL i 0.1, 1, 10 o 30 ng/mL	
	Mort cel·lular	LPS	1 µg/mL	3, 5 o 7 dies
LPS+IFN γ		1 µg/mL i 1 o 30 ng/mL		
Fagocitosi	LPS	100 ng/mL	24h	
	LPS+IFN γ	100 ng/mL i 1 ng/mL		
Glia mixta	Immunocitoquímica	LPS	100 ng/mL	24h
		LPS+IFN γ	100 ng/mL i 1 ng/mL	



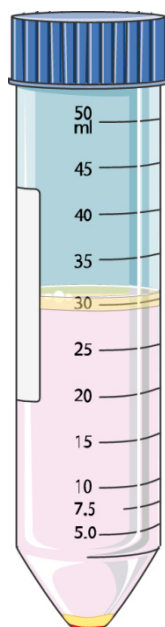
3.3 Aïllament de la micròglia del cervell adult

⇒ Sempre que aquestes cel·lules microgials un cop aïllades s'han emprat posteriorment per a analitzar els nivells d'ARN o proteïna, als ratolins se'ls ha injectat 16h abans del sacrifici 100 µL de LPS (4 mg/kg *Escherichia coli* serotip 055:B5 ref. L-6529, Sigma-Aldrich) o PBS 1X, per via intraperitoneal.

1. S'adorm el ratolí amb un anestèsic volàtil, 1-cloro-2,2,2-trifluoroetildifluorometil éter (IsoFlo, ref: 571329.8, Esteve), fins que no s'observa reflex plantar.
2. Es perfora el ratolí amb 50 mL de PBS 1X amb 10 U/mL d'heparina a temperatura ambient.
3. S'extreu el cervell i es guarda en un tub falcon de 50 mL que conté 10 mL de PBS 1X fred. Es guarda en gel.
4. En una placa de petri de 6 cm de diàmetre s'aboca el cervell i el PBS i es trosseja el cervell en trossets el més petits possibles amb l'ajuda d'unes tisores i una fulla de bisturí. Amb pipeta sereològica de 10 mL es passa a un tub falcon de 15 mL.
5. Se centrifuga durant 1 minut a 200g. S'aspira el PBS.
6. S'addicionen 5 mL de tripsina + 300 µL de ADNasa 4 mg/mL per a cada 0,5 g de teixit. S'incuba 30 minuts a 37°C.
7. Transcorreguts aquest temps, s'addicionen 5 mL de DFF₁₀ i s'homogeneïtza amb pipeta sereològica de 10 mL. Com a conseqüència de la dificultat per a disgregar el teixit, aquest pas es realitza en tres etapes:
 - I. Es pipeteja unes 15 – 20 vegades amb pipeta sereològica de 10 mL, es deixa reposar i es passen uns 6 mL del sobrenedant amb cura de no agafar el moc d'ADN a un tub Falcon de 15 mL net.
 - II. Amb el volum restant es torna a pipetejar unes 15 – 20 vegades amb pipeta sereològica de 10 mL. Es deixa reposar i es passen 3 mL de sobrenedant al tub Falcon de 15 mL del pas anterior.



- III. Amb el volum restant, d'1 - 2 mL es pipeteja unes 15 vegades amb una pipeta p1000 i es passa el teixit homogeneïtzat al tub Falcon de 15 mL dels passos anteriors.
8. Se centrifuga 7 minuts a 200g. S'apira el medi.
9. Es resuspèn el *pellet* en 8 mL de DFF₁₀, pipetejant 2 vegades amb una pipeta sereològica de 10 mL i es filtra amb un filtre de 100 µm. Es recull a un tub Falcon de 50 mL. A l'hora de filtrar, per a no obturar el filtre amb la mielina, és recomanable seguir aquests passos:
- I. Després de resuspènre el *pellet*, es deixa reposar i amb pipeta sereològica de 10 mL s'agafen 6 mL que s'aboquen al filtre.
 - II. Amb una pipeta p1000 es disgrega el teixit residual que queda als 2 mL restants i s'aboquen al filtre.
10. Se centrifuga 7 min a 200g. S'apira el medi.
11. Al tub Falcon de 50 mL on hi ha el *pellet*, s'afegeixen 7.5 mL de Percoll 30% (17-0891-02, GE Healthcare) a temperatura ambient. S'homogeneïtza donant copets suaus al tub Falcon i es passa a un tub Falcon de 15 mL net.
12. Se centrifuga 10 minuts a 700g. Passat aquest temps s'espera:



Mielina → s'aspira amb pipeta de 10 mL i es llença.

Percoll 30% → s'aspira amb pipeta de 10 mL i es llença.

Quan queden uns 500 µl s'acaba d'aspirar amb p1000.

Micròglia i eritròcits (anella vermella).



13. Es resuspèn el pellet en 400 μL de PBS 1X fred, es passa a un *ependorf* d'1.5 mL i se centrifuga 10 minuts a 300g a 4°C. S'aspira bé el sobrenedant.
14. Es repeteix el pas 13.
15. Per a ratolí: es resuspèn el pellet en 90 μL de tampó Miltenyi i 10 μL de MicroBeads anti-CD11b (1/10, ref. 130-093-634, Miltenyi) per a 10^7 cèl·lules totals.
16. Es barreja bé i s'incuba 15 minuts amb agitació a 4°C.
17. Es renten les cèl·lules amb 1 mL de tampó Miltenyi per cada 10^7 cèl·lules. Se centrifuga a 300g durant 10 minuts a 4°C. S'aspira bé el sobrenedant.
18. Fins a 10^8 cèl·lules es resuspèn el pellet en 500 μL de tampó Miltenyi.
19. Es procedeix a la separació magnètica a 4°C:
 - I. Es col·loca la columna MS (ref. 130-042-201, Miltenyi) amb les ales cap al front, ben encaixada a la ranura de l'imant OctoMACS Separator (ref. 130-042-109, Miltenyi), muntat al suport MACS Multistand (ref. 130-042-303, Miltenyi).
 - II. Es renta la columna amb 500 μL de tampó Miltenyi.
 - III. Es passen les cèl·lules del pas 18 a la columna i es recullen les cèl·lules no marcades amb CD11b en un tub *ependorf* de 2 mL net.
 - IV. Es renta la columna tres vegades amb 500 μL de tampó Miltenyi.
 - V. Es treu la columna de l'imant i s'elueixen les cèl·lules marcades amb 1 mL de tampó Miltenyi aplicant el pistó de la columna.
20. Se centrifuga 10 minuts a 300g a 4°C. S'aspira completament el sobrenedant i es procedeix a realitzar l'extracció d'ARN o proteïnes o bé es realitza un *cytospin*.



3.4 Immunocitoquímica.

Anticossos emprats

Tipus d'anticòs	Epítop	Animal	Dilució	Referència	Proveïdor
Primari	C/EBP β	Ratolí	1/500 (cultius) 1/1111 (cytospin)	ab18336	AbCam
	GFAP	Conill	1/1000	Z0334	DakoCytomation
	Iba1	Conill	1/1000	019-19741	Wako
	NOS2	Conill	1/400	610333	BD
	CD11b	Rata	1/300	MCA711G	Serotec
	CD68	Rata	1/1000	MCA1957	Serotec
Secundari	IgG ratolí	Cabra	1/1000	A11017 488	Invitrogen
	IgG conill	Cabra	1/1000	A11070 488	Invitrogen
	IgG ratolí	Cabra	1/1000	A11018 546	Invitrogen
	IgG rata	Cabra	1/1000	A11081 546	Invitrogen
	IgG ratolí	Ase	1/1000	A21203 594	Invitrogen
	IgG rata	Ase	1/1000	A21208 488	Invitrogen

3.4.1 Immunocitoquímica de cultius primaris.

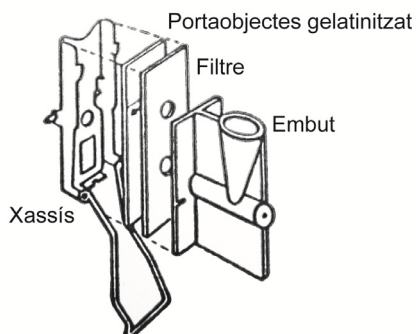
1. Es treu la placa de l'incubador de cultius.
2. S'aspira el medi.
3. Es fixen les cèl·lules amb PFA 4% durant 20 minuts a temperatura ambient.
4. Es fa un rentat de 5 minuts amb PBS 1X.
5. Es guarda la placa a 4°C amb PBS 1X + azida sòdica al 0.01%.
6. Es realitzen 2 rentats amb PBS 1X de 5 minuts (amb agitació).
7. Es permeabilitzen les cèl·lules afegint metanol 100% durant 7 minuts.
8. Es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb PBS 1X (amb agitació).
9. Es prepara la solució amb l'anticòs o anticossos primaris a la concentració de treball en PBS 1X + azida sòdica al 0.01% + 10% de sèrum normal de l'animal utilitzat per a produir l'anticòs secundari. S'incuba tota la nit a 4°C.



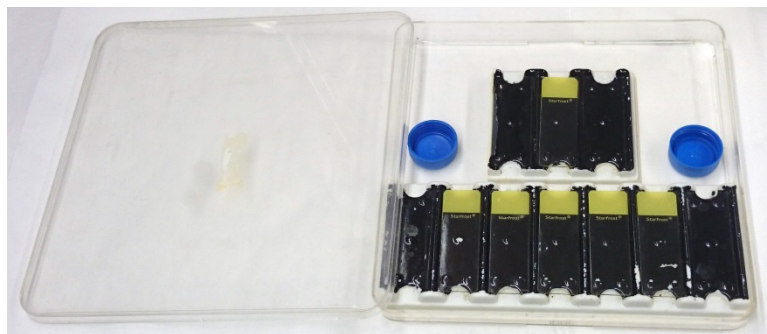
10. Es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb PBS 1X (amb agitació).
 - ▶ A partir d'aquest pas, es treballa amb la placa tapada amb paper d'alumini.
11. Es prepara la solució amb l'anticòs o anticossos secundaris a la concentració de treball i DAPI (5 mg/mL, ref. D9542, Sigma-Aldrich) a una dilució 1/2000 en PBS 1X + azida sòdica al 0.01% + 10% de sèrum normal de l'animal utilitzat per a produir l'anticòs secundari. S'incuba durant 1h a temperatura ambient (amb agitació).
12. Es realitzen 2 rentats de 5 minuts amb PBS 1X (amb agitació)
13. Es realitza un rentat de 5 minuts amb PBS 1X + azida sòdica al 0.01% (amb agitació).
14. Es realitza l'observació i obtenció de fotografies de la tinció emprant el microscopi Olympus IX71 juntament amb una càmera CC-12 i el programa Cell[^]F, també d'Olympus.
15. Es guarda la placa a 4°C.

3.4.2 Immunocitoquímica de cèl·lules microgials aïllades del cervell adult.

1. Un cop eluïdes les cèl·lules marcades amb l'anticòs anti-CD11b (veure passos 19 i 20 del protocol "Aïllament de la micròglia del cervell adult") es compten les cèl·lules microgials obtingudes i per cada animal es recull un volum amb 25.000 cèl·lules i un altre amb 50.000 cèl·lules.
2. Es porta a 500 µL amb PBS 1X.
3. Es munta el portaobjectes gelatinitzat amb el filtre (ref. 190005, Shandon) i l'embut, seguint l'esquema:



4. Es marca amb un retolador permanent la rodona del filtre per la cara del darrera del portaobjectes.
5. Utilitzant el Shandon Cytospin 4 de Thermo Scientific, se centrifuguen les cèl·lules a 1000 rpm durant 5 minuts.
6. Es treu el portaobjectes del muntatge i es deixa assecar a l'aire 5 minuts.
7. Es fixen les cèl·lules submergint el portaobjectes en una cubeta vertical amb PFA al 4%, durant 20 minuts a temperatura ambient.
8. Es realitzen dos rentats de 5 minuts amb PBS 1X.
9. Es col·loca el portaobjectes a una cambra humida.
10. S'encercla el punt on es troben les cèl·lules emprant el retolador Dako Pen (ref.S2002, DakoCytomation), per tal d'evitar que les solucions que s'empraran d'ara en endavant s'escampin per tot el portaobjectes.



Cambra humida. Col·locar un tros de paper humit o bé omplir els taps amb aigua evita, un cop tapada, l'evaporació de les solucions emprades durant les incubacions.

11. S'incuben les cèl·lules durant 20 minuts a temperatura ambient amb 50 μ L de la solució de bloqueig (PBS 1X, BSA1%, tritó 0.3% i 10% de sèrum normal de cabra o ase).
12. Es prepara la solució amb l'anticòs o anticossos primaris a la concentració de treball en solució de bloqueig. S'incuba tota la nit a 4°C.
13. Es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb PBS 1X
 - ▶ A partir d'aquest pas, es treballa amb la cambra tapada amb paper d'alumini.

16. Es prepara la solució amb l'anticòs o anticossos secundaris a la concentració de treball i DAPI (5 mg/mL, ref. D9542, Sigma-Aldrich) a una dilució 1/2000 en solució de bloqueig. S'incuba durant 1h a temperatura ambient.
17. Es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb PBS 1X.
18. Es munta la preparació emprant 10 μ L del medi de muntatge Mowiol 4-88 (ref.475904, Merck Millipore) i cobrint les cèl·lules amb un cobreobjectes. Es deixa assecar protegit de la llum.
19. Es realitza l'observació i obtenció de fotografies de la tinció emprant el microscopi Nikon Eclipse juntament amb una càmera DP-72 i el programa Cell[^]B, també d'Olympus.
20. Es guarda el portaobjectes dins una caixa a 4°C.

3.5 Extracció d'ARN

3.5.1 Extracció d'ARN de micròglia primària.

1. S'aspira el medi de cultiu del flascó T75.
2. Es realitzen 2 rentats de 6 i 4 mL amb PBS 1X estèril i fred.
3. Es recullen les cèl·lules en 750 μ L de PBS 1X estèril i fred.
4. Se centrifuga durant 10 minuts a 300g a 4°C.
5. S'aspira el PBS i s'afegeix 1 mL de TriReagent (ref. T9424-100 mL, Sigma-Aldrich) + 14.28 μ L de PureLink Carrier RNA 500 ng/mL (ref. 46-6026, Invitrogen).
6. S'homogeneïtza 10 vegades amb una xeringa de 2.5 mL i agulla 20G.
7. S'afegeixen 100 μ L de BCP (1-brom-3-cloropropà, B6240-4, Sigma-Aldrich), s'homogeneïtza amb vòrtex durant 15 segons i es deixa reposar a temperatura ambient durant 1 minut.
8. Se centrifuga durant 15 minuts a 12.000g a 4°C.
9. Es recull la fase aquosa en un *eppendorf* d'1.5 mL i es guarda la fase orgànica al -80°C.



10. S'addiciona un volum igual d'etanol 70% fred a la fase aquosa i s'homogeneïtza amb la pipeta.
11. Es procedeix a l'extracció de l'ARN emprant el kit PureLink RNA Micro Kit (12183-016, Life technologies):
 - I. Es passa un volum màxim de 700 μL a una columna de sílica i se centrifuga 1 minut a 12.000g a temperatura ambient. Es descarta el líquid del tub recol·lector. Es repeteix aquest pas fins haver passat tota la fase aquosa.
 - II. S'afegeixen 350 μL del tampó de rentat I i se centrifuga 1 minut a 12.000g a temperatura ambient. Es descarta el líquid del tub recol·lector.
 - III. Procurant mullar bé la columna de sílica, s'afegeixen 20 μL de ADNasa (10 μL de ADNasa reconstituïda i 10 μL del tampó ADNasa 2X). S'incuba 15 minuts a temperatura ambient.
 - IV. S'afegeixen 350 μL del tampó de rentat I i se centrifuga 15 segons a 12.000g a temperatura ambient. Es descarta el líquid del tub recol·lector.
 - V. S'afegeixen 500 μL del tampó de rentat II i se centrifuga 15 segons a 12.000g a temperatura ambient. Es descarta el líquid del tub recol·lector.
 - VI. Es repeteix el pas V.
 - VII. Sense afegir cap altra solució, se centrifuga la columna 1 minut a 12.000g a temperatura ambient.
 - VIII. Es col·loca la columna en un tub *ependorf* d'1,5 mL net i s'afegeixen mullant bé la columna de sílica, 12 μL d'aigua sense RNAasa.
 - IX. S'incuba 1 minut a temperatura ambient i se centrifuga 2 minuts a 12.000g a temperatura ambient.
 - X. Es descarta la columna i es quantifiquen 2 μL de la mostra amb l'espectrofotòmetre ND-1000 (Nanodrop, Control tècnica).
 - XI. Es guarda la mostra a -80°C .



3.5.2 Extracció d'ARN de micròglia aïllada del cervell adult.

Un cop centrifugades les cèl·lules obtingudes al protocol "Aïllament de la micròglia del cervell adult", s'aspira completament el sobrenedant i es procedeix a l'extracció de l'ARN emprant el kit PureLink RNA Micro Kit (12183-016, Life technologies).

1. A cada mostra s'afegeixen 350 μ L de tampó de lisi complementat amb 5 μ L de PureLink Carrier RNA 500 ng/mL i 3.5 μ L de β -mercaptoetanol (M-6250, Sigma-Aldrich).
2. Es disgrega passant-ho 10 vegades per una xeringa de 2.5 mL amb un agulla de 20G.
3. S'afegeixen 350 μ L d'etanol 70% fred i s'homogeneïtza pipetejant unes 5-10 vegades.
4. Es passen els 700 μ L a una columna de sílica i se centrifuga 1 minut a 12.000g a temperatura ambient. Es descarta el líquid del tub recol·lector.
5. S'afegeixen 350 μ L del tampó de rentat I i se centrifuga 1 minut a 12.000g a temperatura ambient. Es descarta el líquid del tub recol·lector.
6. Procurant mullar bé la columna de sílica, s'afegeixen 20 μ L de DNAasa (10 μ L de DNAasa reconstituïda i 10 μ L del tampó DNAasa 2X). S'incuba 15 minuts a temperatura ambient.
7. S'afegeixen 350 μ L del tampó de rentat I i se centrifuga 15 segons a 12.000g a temperatura ambient. Es descarta el líquid del tub recol·lector.
8. S'afegeixen 500 μ L del tampó de rentat II i se centrifuga 15 segons a 12.000g a temperatura ambient. Es descarta el líquid del tub recol·lector.
9. Es tornen a afegir 500 μ L del tampó de rentat II i se centrifuga 15 segons a 12.000g a temperatura ambient. Es descarta el líquid del tub recol·lector.
10. Sense afegir cap altra solució, se centrifuga la columna 1 minut a 12.000g a temperatura ambient.
11. Es col·loca la columna en un tub *ependorf* d'1,5 mL net i s'afegeixen mullant bé la columna de sílica, 12 μ L d'aigua sense RNAasa.
12. S'incuba 1 minut a temperatura ambient i se centrifuga 2 minuts a 12.000g a temperatura ambient.



13. Es descarta la columna i es quantifiquen 2 μL de la mostra amb l'espectrofotòmetre ND-1000 (Nanodrop, Control tècnica).
14. Es guarda la mostra a -80°C .

3.5.3 Extracció d'ARN de teixit.

1. A 0.1g de teixit continguts en un *ependorf* d'1.5 mL s'afegeixen 200 μL de TriReagent (ref. T9424-100 mL, Sigma-Aldrich) i s'homogeneïtza amb un politró manual (ref. Z359971-1EA, Sigma-Aldrich).
2. S'afegeixen 300 μL novament de TriReagent i es torna a homogeneïtzar fins a quasi disgregar tot el teixit.
3. S'afegeixen 50 μL de BCP (1-brom-3-cloropropà, B6240-4, Sigma-Aldrich) s'homogeneïtza amb vòrtex durant 15 segons.
4. Se centrifuga durant 15 minuts a 12.000g a 4°C .
5. Es recupera la fase aquosa en un *ependorf* d'1.5 mL net i s'afegeix un volum d'isopropanol fred igual al recuperat. S'incuba tota la nit a -80°C .
6. Se centrifuga durant 15 minuts a 12.000g a 4°C .
7. S'elimina el sobrenedant i es renta el *pellet* amb 1 mL d'etanol 70% fred.
8. Se centrifuga durant 3 minuts a 7.500g a 4°C i s'aspira el sobrenedant.
9. Es repeteixen els passos 7 i 8.
10. S'asseca el *pellet* durant 10 minuts en un bany sec a 50°C .
11. Es resuspèn amb un volum d'aigua estèril lliure d'ADNases i ARNases d'entre 20 i 150 μL segons la mida del *pellet* obtingut.
12. S'incuba l'ARN resuspès 10 minuts a 50°C i 10 segons en gel.
13. Es quantifiquen 2 μL de la mostra amb l'espectrofotòmetre ND-1000 (Nanodrop, Control tècnica).
14. Es guarda la mostra a -80°C .



3.6 PCR en temps real.

3.6.1 Reacció de transcripció inversa.

Reactius

- Tampó de reacció (5X) (ref. 03531317001, Roche).
- Inhibidors d'ARNases (ref. P/N 100000840, Invitrogen).
- Barreja de dNTPs (desoxinucleòtids trifosfat, ref. U151B, Promega).
- Transcriptasa inversa (ref. 03531287001, Roche).
- Encebadors aleatoris (ref. P/N 58875, Invitrogen).

Preparació de les mostres

	Concentració final	µL/mostra
Barreja 1		
H ₂ O autoclavada	-	2.85
Encebadors aleatoris (3 µg/µL)	0.6 µg	0.2
Barreja 2		
Tampó de reacció (5X)	1X	4
Inhibidors d'ARNases (40 U/µL)	20 U	0.5
Barreja de dNTPs (10 mM)	1 mM	2
H ₂ O autoclavada	-	2
Transcriptasa inversa (20 U/µL)	10 U	0.45

1. Es preparen les mostres en *ependofs* de 0.2 mL ajustant la concentració a 100 ng – 1.5µg d'ARN en 8 µL finals emprant aigua estèril, lliure d'ADNases i ARNases.
2. Es prepara la barreja 1 seguint les indicacions de la taula i s'hi afegeixen 3.05 µL a cada mostra.
3. S'incuba 10 minuts a 65°C al termociclador de Bio-Rad PTC-1148.
4. Mentrestant es prepara la barreja 2.



5. Passats els 10 minuts s'afegeixen 8.95 μ L de la barreja 2 a cada mostra i se segueix el següent protocol al termociclador:
 - I. 10 minuts, 25°C.
 - II. 30 minuts, 55 °C.
 - III. 5 minuts, 85°C.
6. Es guarden les mostres a -20 °C.

3.6.2 PCR en temps real.

Encebadors emprats

Gen	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
C/EBPβ	AAG CTG AGC GAC GAG TAC AAG A	TCA GCT CCA GCA CCT TGT G
Il23a	TGT GCC CCG TAT CCA GTG TG	AAA AGC CAG ACC TTG GCG GA
Cybb	ACT CCT TGG GTC AGC ACT GGC	GCA ACA CGC ACT GGA ACC CCT
Tnfa	TGA TCC GCG ACG TGG AA	ACC GCC TGG AGT TCT GGA A
Ptges	AGG CCA GAT GAG GCT GCG GA	AGC GAA GGC GTG GGT TCA GC
Csf3	AGA GCT GCA GCC CAG ATC ACC	AGC TGC AGG GCC ATT AGC TTC A
Nos2	GGC AGC CTG TGA GAC CTT TG	TTG CAT TGG AAG TGA AGC GTT TC
CD11b	AAG CAG CTG AAT GGG AGG AC	GAA TGA CCC CTG CTG TGT CT
PU.1	GGC AGC AAG AAA AAG ATT CG	CTT TCT TCA CCT CGC CTG TC
GFAP	AAG GTC CGC TTC CTG GAA	GGC TCG AAG CTG GTT CAG TT
CNPase	AGC TCA AGG AGA AGA ACC AT	TAA AGT GTC GAA GCT CTT TCT
MAP2	CAT CGC CAG CCT CGG AAC AAA	TGC GCA AAT GGA ACT GGA GGC
Rn18s	GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG
GAPDH	TGA ACG GGA AGC TCA CTG G	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA
Hprt1	ATC ATT ATG CCG AGG ATT TGG	GCA AAG AAC TTA TAG CCC CC
Rplp0	GAA ACT GCT GCC TCA CAT CCG	CTG GCA CAG TGA CCT CAC ACG
Sdha	TGG GGAGTG CCG TGG TGT CA	CAT GGC TGT GCC GTC CCC TG

1. Es dilueix la mostra amb aigua estèril i lliure d'ADNases i ARNases segons la quantitat de cADN de partida.
2. Per a cada mostra es prepara la següent barreja:
 - 3.6 μ L d'aigua estèril i lliure d'ADNases i ARNases



- 0.45 μ L d'encebador *forward* (10 μ M)
 - 0.45 μ L d'encebador *reverse* (10 μ M)
 - 7.5 μ L qPCRBIO Sygreen Mix Lo-ROX (PCB-P20.11-50, Vitro)
3. A cada pou de la placa de 96 pous (ref. HSP-9655, Bio-Rad) s'afegeixen 3 μ L de cADN i 12 μ L de la barreja.
 4. S'agita la placa amb el vòtex i se centrifuga a 800g durant 1 minut.
 5. Al termociclador CFX96 de Bio-Rad es programen 35-45 cicles:
 - I. 95°C, 30 segons
 - II. 60°C, 1 minut
 - III. 72°C, 30 segons
 6. Els resultats s'analitzen emprant el programa Bio-Rad CFX Managing de Bio-Rad usant el mètode comparatiu $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

3.7 Extracció de proteïnes.

3.7.1 Extracció de proteïnes de micròglia primària.

1. S'aspira el medi de cultiu del flascó T75.
2. Es realitzen 2 rentats de 6 i 4 mL amb PBS 1X estèril i fred.
3. Es recullen les cèl·lules en 750 μ L de PBS 1X estèril i fred.
4. Se centrifuga durant 10 minuts a 200g a 4°C.
5. S'aspira el sobrenedant i es resuspèn el *pellet* amb 50 μ L de tampó RIPA.
6. Es sònica 10 segons en cicle continu a un 80% d'amplitud.
7. Se centrifuga 5 minuts a 10.400g a 4°C.
8. Es guarda el sobrenedant en un *ependorf* d'1.5 mL net i es guarda a -80°C.



3.7.2 Extracció de proteïnes de micròglia aïllada de cervell adult.

Un cop centrifugades les cèl·lules obtingudes al protocol "Aïllament de la micròglia del cervell adult", s'aspira completament el sobrenedant i es procedeix a l'extracció de proteïnes.

1. Es resuspèn el *pellet* amb 50 μ L de tampó RIPA.
2. Es sònica 10 segons en cicle continu a un 80% d'amplitud.
3. Se centrifuga 5 minuts a 10.400g a 4°C.
4. Es guarda el sobrenedant en un *ependorf* d'1.5 mL net i es guarda a -80°C.

3.7.3 Extracció de proteïnes de teixit.

1. A 0.1g de teixit continguts en un eppendorf d'1.5 mL s'afegeixen 250 μ L de tampó RIPA i s'homogeneïtza amb un politró manual (ref. Z359971-1EA, Sigma-Aldrich).
2. S'afegeixen 500 μ L de tampó de RIPA i es torna a homogeneïtzar.
3. Es deixa reposar durant 15 minuts en gel.
4. Se centrifuga durant 15 minuts a 12.000g a 4°C.
5. Es passa el sobrenedant a un eppenbdorf d'1.5 mL net i es guarda a -80°C.

3.7.4. Quantificació de proteïnes. Mètode de Bradford.

1. Es fa una dilució 1/25 de les mostres amb aigua MilliQ autoclavada.
2. Es prepara la recta patró amb les concentracions 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 i 0 μ g/ μ L de BSA (de l'anglès, *bovine serum albumin*).
3. A una placa de 96 pous, es passen duplicats de 10 μ L de cada mostra i de cada punt de la corba patró.
4. Es fa una dilució 1/5 del reactiu de Bradford (ref. 5000006, Bio-Rad) amb aigua MilliQ autoclavada.



5. S'afegeixen 200 μL del reactiu a cada pou amb mostra o punt de la recta patró.
6. Es deixa reposar 5 minuts a temperatura ambient i es llegeix a $\lambda=595$ nm amb l'espectrofotòmetre Multiskan Spectrum de Thermo Electron Corporation.

3.8 Western blot.

Anticossos emprats

Tipus d'anticòs	Epítop	Animal	Dilució	Referència	Proveïdor
Primari	C/EBP β	Conill	1/500	Ab32358	AbCam
	β -Tubulina	Ratolí	1/50.000	T4026	Sigma-Aldrich
Secundari	IgG ratolí	Cabra	1/2.000	SC-2055	Santa Cruz
	IgG conill	Ase	1/15.000	NA934-1ML	GE Healthcare

Mouse α - β -Actina Peroxidase 1/40.000 ref.A3854-200ul Sigma-Aldrich

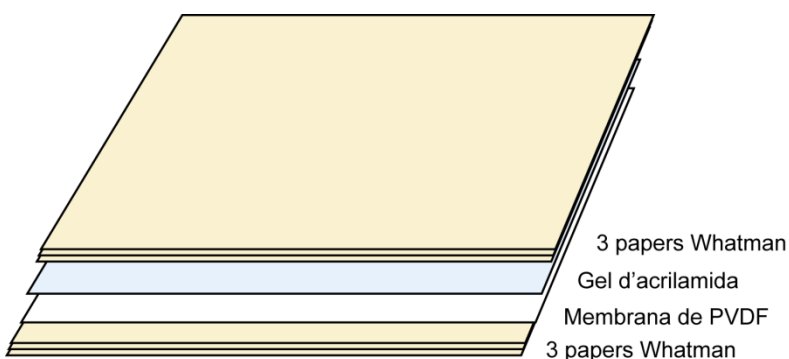
1. Es netegen bé els vidres amb etanol 70%.
2. S'encaixa un vidre petit amb un de gran per a preparar un gel d'1.5 mm de gruix dins del suport i s'omple d'aigua per a comprovar que el muntatge sigui estanc.
3. Es prepara en un tub Falcon de 50 mL el gel separador d'acrilamida al 12%:
 - Solució 1: 5 mL
 - Acrilamida al 30% (ref. 161-0158, Bio-Rad): 4 mL
 - Aigua MilliQ autoclavada: 1 mL
 - TEMED: 14 μL
 - PSA (persulfat amònic) al 13%: 50 μL
4. S'homogeneïtza amb vòrtex.
5. Es treu l'aigua del muntatge i s'afegeix amb pipeta sereològica el volum necessari de la barreja per a arribar fins a quasi arribar a la pinta.



6. S'afegeixen 50 μ L d'isopropanol per a eliminar les bombolles que s'hagin format.
7. Es deixa polimeritzar a temperatura ambient i mentrestant:
 - I. Es descongelen les mostres en gel.
 - II. En *eppendorfs* d'1.5 mL nous, s'ajusten els volums per tal de carregar 20 μ g de proteïna a cada pou amb aigua MilliQ autoclavada.
 - III. Considerant el volum final desitjat, s'afegeixen X μ L de tampó de càrrega 4X amb un 10% de DTT 100mM per tal d'aconseguir una concentració 1X del tampó a cada mostra.
 - IV. S'escalfen les mostres durant 3 minuts a 100°C.
 - V. Se centrifuga a màxima velocitat durant 10 segons.
 - VI. Si les mostres no s'utilitzen tot seguit es guarden a -20°C.
8. Es prepara en un tub Falcon de 15 mL el gel d'apilament:
 - Solució 3: 2 mL
 - Acrilamida al 30% (ref. 161-0158, Bio-Rad): 0.55 mL
 - Aigua MilliQ autoclavada: 1.5 mL
 - TEMED: 10 μ l
 - PSA (persulfat amònic) al 13%: 20 μ L
9. S'homogeneïtza amb vòrtex.
10. Es treu l'isopropanol del muntatge i s'afegeix amb pipeta sereològica el volum necessari de la barreja per a arribar fins a dalt.
11. Es col·loca la pinta de 10 o 15 pous amb cura de no formar bombolles i es deixa polimeritzar.
12. Un cop polimeritzat es treuen els vidres del suport i es munta la cubeta de l'electroforesi, col·locant el vidre petit cap a l'interior.
13. Es prepara 1 L del tampó electròlit diluïnt 100 mL de la solució mare 10X amb 900 mL d'aigua desionitzada i s'omple la cubeta.
14. Es carrega el marcador de pes molecular (161-0375, Bio-Rad) al primer pou i les mostres a la resta.



15. S'aplica un corrent de 50 V fins que el front de les mostres traspassi el gel d'apilament, llavors s'augmenta fins a 100 V.
16. Mentre es realitza l'electroforesi es tallen 6 papers tipus Whatman i 1 membrana de PVDF (ref. IPVH00010, Merck Millipore) de 8 x 5 cm.
17. S'activa la membrana de PVDF submergeint-la durant 1 minut en metanol. A continuació se submergeix en tampó de transferència juntament amb els papers Whatman.
18. Un cop el front de les mostres es troba a 1 cm del final del gel d'acrilamida es para el corrent i se submergeix el gel durant 10 minuts en tampó de transferència.
19. Es realitza la transferència amb l'aparell TransBlot SD Cell (Bio-Rad) col·locant la membrana de PVDF i el gel d'acrilamida entre els papers Whatman, seguint el següent esquema:



20. S'aplica un amperatge de 0.5 mA/cm^2 de membrana durant 50-60 minuts.
21. Es renta la membrana de PVDF durant 5 minuts amb tampó TBS 1X.
22. Es deshidrata la membrana de PVDF submergeint-la durant 10 segons en metanol i es deixa assecar a l'aire.
23. Es marquen les bandes del marcador de pes molecular amb un bolígraf blau.
24. S'hidrata la membrana de PVDF submergeint-la primer 5-10 segons en metanol i a continuació durant 5 minuts en tampó TBS-T .
25. Es bloqueja la membrana de PVDF durant 1 hora en tampó TBS-T + 5% de llet en pols.

26. S'incuba l'anticòs primari diluït en tampó TBS-T tota la nit a 4°C.
27. Es realitzen 3 rentats de 5 minuts en tampó TBS-T.
28. S'incuba l'anticòs secundari diluït en tampó TBS-T durant 1h a temperatura ambient.
29. Es realitzen 3 rentats de 5 minuts en tampó TBS-T.
30. S'afegeix a la membrana de PVDF el reactiu de quimioluminiscència WesternBright Quantum (ref. K-12042-C20, Advansta).
31. Es revela emprant els films CurixRP2Plus d'AGFA i l'aparell Curix60 (AGFA).

3.9 Avaluació de la mort cel·lular induïda per l'activació.

1. Es tracta el cultiu de micròglia primària amb LPS 1 µg/mL sol o conjuntament amb IFN γ a 1 ng/mL o 30 ng/ml.
2. 3, 5 o 7 dies després del tractament es fixa la placa de 48 pous tal i com es descriu a l'apartat "3.4.1 Immunocitoquímica de cultius primaris".
3. Es realitza la tinció de les cèl·lules microgials seguint el protocol descrit a l'apartat "3.4.1 Immunocitoquímica de cultius primaris" emprant l'anticòs Iba1 i DAPI.
4. Es fotografien 3 camps representatius de cada pou emprant el microscopi Olympus IX71 juntament amb una càmera CC-12 i el programa Cell[^]F, també d'Olympus.
5. Es compten manualment amb el programa ImageJ (NIH, EUA) aquells nuclis marcats amb la tinció de DAPI i Iba1 positius.

3.10 Determinació de la producció de NO.

La determinació de nitrit es realitza amb medi de cultiu recollit de cultius de micròglia sembrats en plaques de 96 pous i tractats durant 48h.



1. S'agafen alíquotes de 80 μL de medi de cultiu condicionat de cada pou i es passen a una placa de 96 pous per a espectrofotometria nova.
2. A cada banda de la placa de 96 pous es preparen els vuit pous de la recta patró de concentracions 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 i 0 μM NaNO_2 .
3. S'incuben les mostres i la recta patró amb 100 μL del reactiu de Griess (50 μL de N-1-dihidroclorid de naptiletilendiamina al 0,1% (ref. N5889, Sigma-Aldrich) en aigua MilliQ i 50 μL de sulfanilamida al 1% (ref. S9251, Sigma-Aldrich) en 5% d'àcid fosfòric i aigua MilliQ) durant 10 minuts.
4. La lectura es fa a $\lambda=540$ nm amb l'espectrofotòmetre Multiskan Spectrum de *Thermo Electron Corporation*.

3.11 Assaig de fagocitosi.

Aquest assaig es realitza emprant cultius de micròglia primària sembrats en una placa de 24 pous sobre un cobreobjectes.

Els bacteris *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (soca SV5015) s'han transformat usant el plàsmid *pBR.RFP.1* (Birmingham et al, 2006) per tal d'obtenir bacteris amb auto-fluorescència vermella.

1. 48 hores abans de la infecció amb *Salmonella Typhimurium* s'aspira el medi i se n'afegeix de nou sense antibiòtic.
2. Es tracten les cèl·lules amb LPS 100 ng/mL sol o conjuntament amb IFN γ 1 ng/mL 24 hores abans de la infecció.
3. Amb una punta de pipeta s'agafa una colònia de *Salmonella Typhimurium* i es deixa créixer en 10 mL de medi 2xYT (ref. Y1003-500ML, Sigma-Aldrich) amb ampicil·lina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A9393-5G, Sigma-Aldrich) tota la nit a 37°C en agitació (250rpm). Aquesta incubació dóna com a resultat una solució amb 3×10^9 CFUs de *Salmonella Typhimurium*/mL.
4. Es dilueixen els bacteris en medi de cultiu sense antibiòtics considerant que es vol un MOI (de l'anglès, *multiplicity of infection*) de 5:1. Així, estimant que



per cada pou hi ha 200.000 cèl·lules microglials, la concentració de bacteris al medi d'infecció serà de 1×10^6 CFUs/500 μ L.

5. S'aspira el medi de la placa i s'afegeixen 500 μ L/pou del medi d'infecció.
6. S'incuba a 37°C durant 30 minuts.
7. Es realitzen 2 rentats amb PBS 1X.
8. Els pous emprats per a avaluar la capacitat fagocítica a 30 minuts es fixen seguint el protocol descrit a l'apartat "3.4.1 Immunocitoquímica de cultius primaris".
9. Als pous emprats per a avaluar la capacitat per a resoldre la infecció s'afegeixen 500 μ L/pou de medi de cultiu complementat amb gentomicina 100 μ g/mL i s'incuben durant 1 hora a 37°C.
10. S'aspira el medi i s'afegeixen 500 μ L/pou de medi de cultiu complementat amb gentomicina 10 μ g/mL i s'incuba durant 3 hores a 37°C.
11. Es fixen els pous seguint el protocol descrit a l'apartat "3.4.1 Immunocitoquímica de cultius primaris".
12. Es realitza la tinció de les cèl·lules microglials seguint el protocol descrit a l'apartat "3.4.1 Immunocitoquímica de cultius primaris" emprant l'anticòs anti-Iba1 i DAPI.
13. Amb unes pinces es treuen amb cura els cobreobjectes dels pous i es munten sobre un portaobjectes amb 10 μ L del medi de muntatge Mowiol 4-88 (ref.475904, Merck Millipore).
14. Es fotografien 3 camps representatius de cada cobreobjectes emprant el microscopi Nikon Eclipse juntament amb una càmera DP-72 i el programa Cell^B, també d'Olympus.
15. Es compten les cèl·lules infectades i el nombre de bacteris per cèl·lula manualment amb el programa ImageJ (NIH, EUA).



3.12 inducció del model animal de l'esclerosi múltiple EAE.

Reactius

- MOG₃₅₋₅₅ (de l'anglès, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) (Espikem, Italia). El vial de 5 mg es resuspèn en 5 mL de PBS 1X. Es fan alíquotes d'1 mL que s'emmagatzemen a -20°C.
- CFA (de l'anglès, *complete Freund's adjuvant*) amb *Mycobacterium tuberculosis* (ref. F5881-10ML, Sigma-Aldrich).
- Toxina de *Bordetella pertussis* (ref. P7208-50UG, Sigma-Aldrich). Es prepara a una concentració de 5 µg/mL i es fan alíquotes d'1 mL que es guarden a -20°C.

1. Es descongelen les alíquotes de MOG₃₅₋₅₅ en gel.
2. S'homogeneïtzen CFA+ *Mycobacterium tuberculosis* amb vòrtex.
3. Es mesclen MOG₃₅₋₅₅ i CFA+ *Mycobacterium tuberculosis* 1:1, considerant que per a cada ratolí es necessiten 200 µL de la mescla i atès que l'emulsió resultant és molt densa i es perd volum durant les injeccions és recomanable preparar un 25% més.
 - I. Es connecten dues xeringues de vidre amb una clau de pas.
 - II. Es tanca la clau de pas que no conté cap xeringa i es treu l'èmbol d'una de les dues xeringues.
 - III. Amb pipeta s'addicionen 2 mL de CFA i a continuació 2 mL de MOG₃₅₋₅₅ a la xeringa sense èmbol.
 - IV. Es col·loca l'èmbol i es fa passar la mescla a la segona xeringa.
 - V. Es tanca la clau de pas i es treu la primera xeringa per tal d'eliminar l'aire que hagi pogut quedar-hi.
 - VI. Es torna a connectar les xeringues, s'obre la clau de pas i es fa passar la mescla d'una xeringa a l'altra unes 50 vegades. A mesura que es fa l'emulsió es notarà cada vegada més resistència.



- VII. Per a comprovar que l'emulsió s'hagi format correctament, es desconnecta una xeringa i es deixa caure una gota a un vas de precipitats amb aigua. Si la gota no es mescla amb l'aigua i flota, l'emulsió està ben feta. Si no cal continuar mesclant amb les xeringues.
- VIII. Es passa l'emulsió a una xeringa de plàstic de 10 mL amb una agulla 23G i es repeteix el procediment fins a obtenir el volum d'emulsió necessari. Fins a la seva utilització es guarda en gel.
- IX. Es neteja bé el material amb etanol 70%.
4. Es pesa el ratolí i s'adorm amb un anestèsic volàtil, 1-cloro-2,2,2-trifluoroetildifluorometil éter (IsoFlo, ref: 571329.8, Esteve), fins que no s'observa reflex plantar.
5. Es prepara la bomba d'IsoFlo. Es connecta l'oxigen i es connecta un tub amb una xeringa.
6. Es col·loca el cap de l'animal adormit dins la xeringa.
7. S'afaiten les extremitats posteriors del ratolí.
8. Amb la xeringa de vidre i una agulla 22G s'injecten subcutàniament 50 µL de l'emulsió a cada extremitat (100 µg de MOG₃₅₋₅₅/ratolí).
9. S'injecten per via intraperitoneal 100 µL de toxina de *Bordetella pertussis* (5 µg/mL, 500 ng/ ratolí).
10. Es deixa a l'animal dins la gàbia per a què es recuperi de l'anestèsia.
11. 48 hores després de la injecció es repeteix la injecció de la toxina i es pesen els animals.
12. A partir del dia 7-8 post-immunització es monitoritzen els animals diàriament fins al dia del sacrifici:
13. Es pesen els animals.
- I. S'avalua la progressió de la simptomatologia seguint la següent puntuació:



- 0 animal sense simptomatologia.
 - 1 paràlisi total de la cua.
 - 2 agafant l'animal per la base de la cua, aquest no mostra resistència a ser girat.
 - 3 paràlisi d'una de les extremitats posteriors.
 - 4 paràlisi de les dues extremitats posteriors.
 - 5 moribund o mort.
- II. Quan els animals assoleixen una puntuació de 2, se'ls subministra menjar humit dins la gàbia.
- III. Quan un animal presenta una puntuació superior a 3 i/o pesa menys de 15 g, se li administren 200-300 µL de salí per via subcutània.

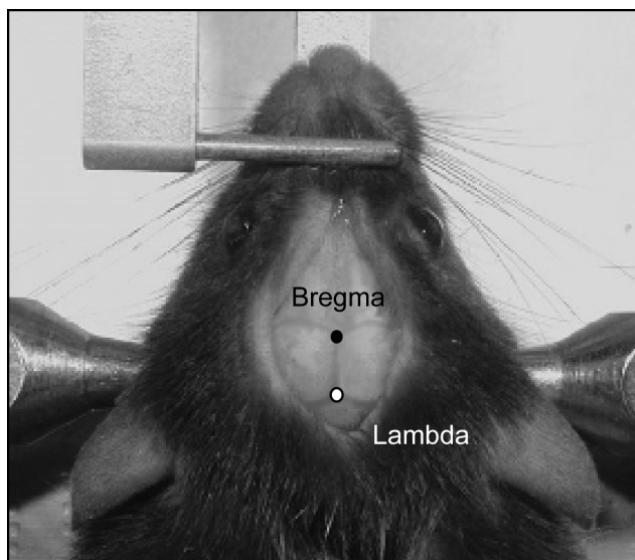
3.13 Model priònic murí ME7.

3.13.1 Inducció del model

1. Es pesa l'animal i s'anestesia injectant 100 mg/kg de ketamina (Imagene 100 mg/mL, Merial) + 5 mg/kg de xil·lacina (Rompun 20 mg, Bayer) per via intraperitoneal.
2. S'afaita el cap amb tisores.
3. S'aplica amb un cotó Lacrilube als ulls de l'animal i Lambdalina (lidocaína 40 mg/g) a l'entrada de les orelles.
4. S'injecta subcutàniament 0.1 mg/kg de Buprenorfina (Buprex 0.3 mg/mL, Reckitt Benckiser).
5. Es fixa l'animal a l'estereotàxic pels incisius superiors. S'ajusta la pinça al tabiq nasal.
6. S'ajusta la posició del crani per les orelles. Cal fixar l'animal amb cura, evitant perforar el timpà.



7. Es desinfecta l'àrea amb un cotó mullat en etanol 70%. Amb unes pinces es subjecta la pell del cap mentre es fa una incisió amb un bisturí. Amb l'ajuda de les pinces i un cotonet es retira el teixit conjuntiu fins a deixar l'os del crani "nu".
8. Es marca Bregma amb un retolador permanent. Amb un paper mil·limetrat es marquen també les coordenades anteroposteriors i laterals.

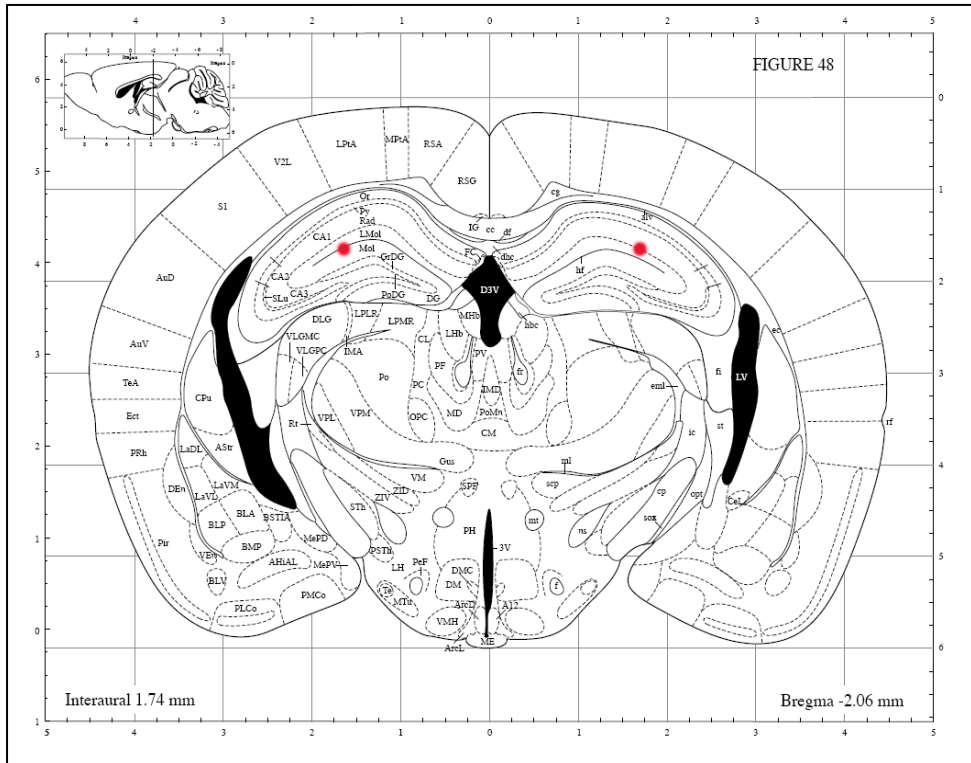


Fotografia on s'aprecien bregma i lambda al crani d'un ratolí

9. Es perfora el crani amb la màquina de perforar amb cura de no tocar l'escorça. Si l'animal sagna, es neteja amb un cotó.
10. Es munta el sistema de l'esterotàxic i es fa coincidir les línies del 0 per a què les coordenades siguin les correctes.
11. Es munta també la xeringa Hamilton de 5 μ L carregada i llesta per a injectar.
12. Es baixa l'agulla a Bregma, sense tocar el crani i s'anoten les coordenades on es troba. Per llegir-les, es mira l'escala gran i s'observa a on cau la ratlla del zero de l'escala petita (això dóna les desenes i les unitats, per exemple, si el zero es troba entre 5.4 i 5.5 cm, cal anotar 54). A continuació es mira

quin número de l'escala petita està completament alineat amb l'escala gran, això dona el primer decimal.

13. Es busquen les coordenades d'injecció sumant o restant (**anteroposterior - 2 mm, lateral ± 1.7 mm, profunditat o dorso-ventral -1.6 mm**) i es procedeix a injectar 1 μ L (per hemisferi) dels homogenats de cervell (NBH o ME7) a 0.2 μ L/min.



Secció coronal del nivell on s'injecta l'homogenat de cervell normal (NBH) o l'homogenat prionic (ME7). Els punts vermells indiquen les coordenades d'injecció

14. Passats 1-2 minuts es retira l'agulla amb cura.
15. Amb l'ajuda d'unes pinces es procedeix a cosir el tall fet prèviament. Es fan tres punts amb doble nus amb fil de seda no reabsorbible 5-0, separats 2-3 mm. Es pot acabar cobrint-los amb "super glue" per evitar que s'obrin.



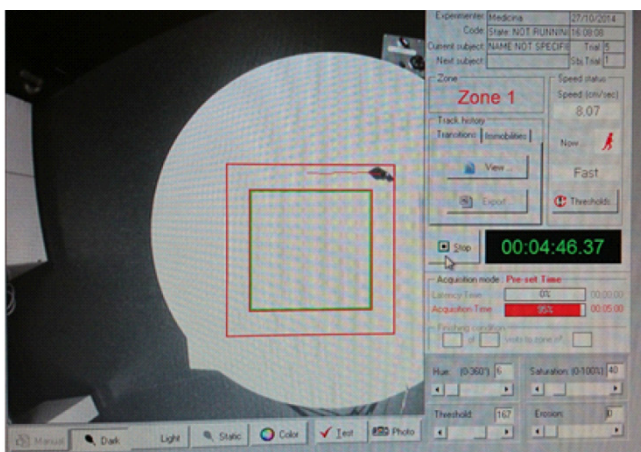


Esquema que il·lustra com cosir la incisió del crani

3.13.2 Test de comportament I: *Open-field*.

Per tal d'avaluar l'activitat exploradora i l'activitat motora es realitza aquest test de comportament a les 8 setmanes de la inducció del model. Es repeteix setmanalment fins al dia del sacrifici (20-21 setmanes post-inducció).

1. S'encén l'ordinador i s'obre el programa Smart 2.0 de Panlab.
2. Es comprova que la gàbia de 45x45x45 cm es troba completament dins del camp visual de la càmera de vídeo i s'ajusten els paràmetres de mesura del programa.
3. Es neteja bé la gàbia amb un detergent neutre per tal d'eliminar l'olor d'altres animals que puguin distreure al ratolí i alterar els resultats del test.
4. Es col·loca l'animal a una cantonada de la gàbia i es mesura durant 5 minuts la distància recorreguda. Mentre l'animal realitza el test es recomana evitar fer qualsevol tipus de soroll per tal de no pertorbar-lo.
5. Es guarda el resultat i es retorna l'animal a la seva gàbia.
6. Es neteja bé tota la superfície de la gàbia.

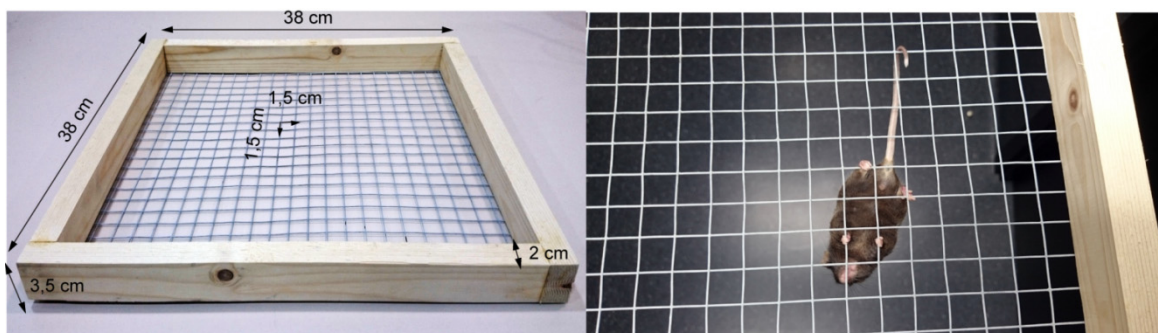


Captura del programa Smart 2.0 durant la realització del test d'*Open-field*.

3.13.3 Test de comportament II: *Inverted screen*.

Amb l'objectiu d'avaluar la força muscular dels animals es realitza aquest test:

1. Es col·loca l'animal sobre la reixa.
2. S'agafa la reixa pel marc de fusta i es col·loca a l'altura del pit. Amb cura es gira 180°.
3. Es mesura durant un màxim de 2 minuts, el temps que l'animal triga a caure.
4. Es retorna l'animal a la seva gàbia.
5. Es repeteix la mesura setmanalment des de la setmana 8 post-inducció del model fins al dia del sacrifici (20-21 setmanes post-inducció).



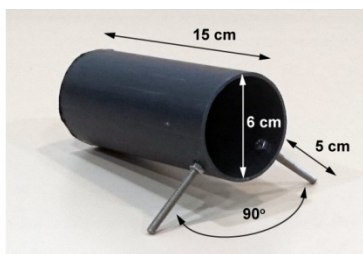
Esquerra. Fotografia de la reixa amb la qual es realitza el test d'*Inverted screen*. S'especifiquen les mesures. Dreta. Ratolí realitzant el test.

3.13.4 Test de comportament III: *Burrowing*.

Aquest test avalua un comportament instintiu dels ratolins, el d'excavar i construir un cau. No obstant, pot ésser que no tots els animals el realitzin. Per aquesta raó cal fer un entrenament/aprenentatge una setmana abans d'iniciar la monitorització setmanal.

1. S'omple un tub amb un extrem tapat amb 200 grams de pinso.

2. Es col·loca a una cantonada de la gàbia de manera que els animals hi puguin entrar però sense que obstaculitzi l'accés a l'aigua.
3. Es deixa tota la nit dins de la gàbia.
4. L'endemà, es comprova que els animals hagin retirat tot el pinso del tub i es repeteix el procediment, però aquesta vegada separant els animals de manera que a cada gàbia hi hagi un ratolí i un tub ple de pinso.
5. Al dia següent tots els animals haurien d'haver retirat tot el pinso. Si algun no ho ha fet es torna a repetir l'entrenament en grup i posteriorment l'individual fins a aconseguir-ho.
6. 8 setmanes després de la inducció del model, a última hora de la tarda se separen els ratolins i se'ls col·loca a cadascun d'ells un tub amb 200 grams de pinso.
7. L'endemà al matí es pesa el pinso que queda dins del tub i s'anota. La diferència entre els dos valors és la quantitat de pinso remoguda i és el paràmetre que s'avaluarà setmanalment fins a 20-21 setmanes després de la inducció del model.
8. Es tornen a estabular conjuntament els animals a la gàbia original.



A dalt. Tub on es col·loquen els 200 grams de pinso per a realitzar el test de *burrowing*. S'indiquen les mesures. A baix. Tres fotogrames on es mostra un ratolí realitzant el test.

3.14 Seqüenciació de l'ARN i anàlisi.

1 µg d'ARN total aïllat de cultius de micròglia tal i com s'ha descrit a l'apartat "3.5.1 Extracció d'ARN de micròglia primària" es quantifica i se n'avalua la qualitat i la integritat emprant el sistema Bioanalyzer 2100 d'Agilent. A continuació s'envien les mostres en gel sec al Centre per a la Recerca Biomèdica de la Rioja (CIBIR, Logroño) on es preparen les llibreries i se seqüencien les mostres seguint els protocols fixats per Illumina (San Diego, EUA). Breument, en primer lloc s'eliminen els ARN de transferència i ribosomals de les mostres emprant el kit TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kits d'Illumina. A continuació, els altres ARN (ARNm, ARNmi, ARNnc llargs i d'altres ARNs) es tallen usant cations divalents en condicions d'alta temperatura per tal de generar fragments de 200pb. Aquests fragments es retrotranscriuen de manera que la primera cadena de cADN s'obté emprant una transcriptasa inversa i encebadors aleatoris, mentre que la segona se sintetitza usant l'ADN polimerasa I i l'ARNasa H. Posteriorment, els extrems d'aquests fragments de doble cadena es reparen emprant l'ADN polimerasa T4 i es fosforilen usant la cinasa T4. Aquests productes es purifiquen emprant les partícules magnètiques Ampure XP d'Agentcourt Bioscience i a continuació s'amplifiquen durant 15 cicles usant l'ADN polimerasa Phusion (Finnzymes Reagents) per tal de construir les llibreries. Aquestes es validen emprant el sistema d'electroforesi automàtic Experion de Bio-Rad i es quantifiquen mitjançant qRT-PCR. Finalment, se seqüencien amb la plataforma Genome Analyzer Iix d'Illumina i s'obtenen seqüències de 150pb. Aquestes dades es processen seguint els següents passos:

- I. S'alineen les seqüències emprant com a referència el genoma de ratolí mm10 i el programa *tophat*.
- II. Els resultats es cataloguen en arxius Bam emprant el programa *Samtools*.
- III. Els arxius Bam es processen en un entorn d'R usant el *package* de *Rsubread* (Liao et al, 2013) i s'alineen novament al genoma de ratolí mm10 amb la funció *featureCounts* (Liao et al, 2014).



- IV. Les lectures obtingudes per a cada gen es normalitzen emprant la normalització de voom (Law et al, 2014) per tal d'ajustar la matriu de comptatge al model lineal del *package limma* (Ritchie et al, 2015).
- V. Un cop normalitzats, els comptages totals s'han utilitzat per a agrupar les mostres (*standard hierarchical cluster with average linkage*) emprant el *Package hcluster*.
- VI. Per tal d'obtenir els gens expressats diferencialment (DEG) que compleixin les condicions de $p < 0.01$ i *fold change* > 2 s'utilitza un algoritme lineal.
- VII. Es realitza la comparació dels DEG mitjançant diagrames de Venn.
- VIII. S'expressen els nivells dels diferents gens com a la desviació estàndard i es visualitza la seva expressió mitjançant *heatmaps*. A més s'agrupen els gens i les mostres (*hierarchical clustering with average linkage*) emprant el programa *Genesis* versió 7.
- IX. S'obté l'enriquiment del termes de GO i les vies de KEGG emprant l'eina *Genecodis* (Carmona-Saez et al, 2007) ajustant el valor de $p < 0.01$ després d'aplicar un test hipergeomètric.
- X. L'anàlisi WGCNA es realitza segons (Langfelder & Horvath, 2008) emprant els valors filtrats per RPKM (la suma de RPKM > 2 per a cada gen).

3.15 Anàlisi estadístic.

Les dades aquí presentades s'han analitzat emprant el programa GraphPad Prism 5.01. Per a comparar tres o més grups experimentals s'ha usat el test ANOVA d'un factor seguit del post-test Newman-Keuls. L'anàlisi ANOVA de dos factors seguit del post-test de Bonferroni ha estat emprat per a estudiar l'efecte del tractament i el genotip. Finalment, la puntuació dels animals al model animal d'esclerosi múltiple s'ha analitzat emprant el test per a dades no paramètriques Kruskal-Wallis i el post-test de Dunn per a comparacions múltiples. Es valors s'han considerat



estadísticament significatius quan $p < 0.05$ i totes les dades s'han representat com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana (SEM).

3.16 Solucions generals.

PBS (Phosphate Buffered Saline) 0.1M (10X):

Per a 1 L.

1. 13.41 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2. 3.45 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
3. 85 g de NaCl
4. Es porta a 1 L amb aigua MilliQ i s'autoclava

Tampó fosfat:

Per a 200 mL.

1. Es prepara dihidrogen fosfat de sodi 0.2M (27.6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 1 L d'aigua MilliQ).
2. Es prepara hidrogen fosfat de sodi 0.2M (35.6 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1 L d'aigua MilliQ).
3. Segons el pH desitjat es mesclen els següents volums:

pH	Volum (mL) NaH_2PO_4 0.2M	Volum (mL) Na_2HPO_4 0.2M
7	39	61
7.1	33	67
7.2	28	72
7.3	23	77
7.4	19	81

I es porta a 200 mL amb aigua MilliQ.



TAE (Tris-acetate-EDTA) 50X:

Per a 500 mL.

1. 121 g de Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)
2. 28.5 ml d'àcid acètic
3. 50ml d'EDTA 0.5M
4. S'ajusta el pH a 8 i s'autoclava

PFA (paraformaldehid) al 4%:

Per a 1L

1. Es treballa sota campana extractora.
2. Es dilueixen 40 g de PFA en 500 mL de tampó fosfat 0.1M (pH=7.4).
3. S'esclafa fins que la solució quedi transparent, vigilant de no sobrepassar els 65°C.
4. S'afegeixen unes gotes de NaOH 10N per acabar de dissoldre el PFA.
5. Un cop refredat es filtra i es porta a 1L amb tampó fosfat.

Percoll isotònic:

1. Es mesclen 9 parts de Percoll STOCK amb 1 part de PBS 10X estèril.

Percoll 30%:

1. Es mesclen 3 parts de Percoll isotònic amb 7 parts de PBS 1X estèril.

Tampó Milteny:

Per a 100 mL

1. 0,5 g de BSA
2. 400 μ L d'EDTA 0.5M
3. Es dissol en 100 mL PBS 1X estèril
4. S'ajusta el pH a 7.2



Ripa:

Per a 50 mL

1. 47.5 mL de PBS 1X estèril
2. 500 µL Igepal (ref. I3021, Sigma-Aldrich)
3. 250 mg Na-desoxicolat (ref. 6504, Merck Millipore)
4. 2.5 mL de SDS (Dodecil sulfat sòdic) al 20% en PBS 1X
5. 1 pastilla de l'inhibidor de proteases *Complete* (ref. 1836145, Roche)
6. Es fan alíquotes de 1 mL i es congelen a -20°C

Solució 1 de Western blot:

Per a 200 mL

1. 18.2 g de Tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) en 200 mL d'aigua MilliQ
2. S'ajusta el pH 8.8 amb HCl 5N
3. 4 mL de SDS al 10% en aigua

Solució 3 de Western blot:

Per a 200 mL

1. 6.1 g de Tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) en 200 mL d'aigua MilliQ
2. S'ajusta el pH 6.8 amb HCl 5N
3. 4 mL de SDS al 10% en aigua

Tampó electròlit 10X:

Per a 1 L

1. 144.1 g de glicina (ref. G8998, Sigma-Aldrich)
2. 30.3 g de Tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)
3. 10 g SDS
4. 1 L d'aigua MilliQ



Tampó de transferència :

Per a 5 L

1. 72.1 g de glicina (ref. G8998, Sigma-Aldrich)
2. 15.1 g de Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)
3. 1 g SDS
4. 1 L metanol
5. 4 L d'aigua MilliQ

TBS 10X (Tris-buffered saline):

Per a 5 L

1. 121.1 g de Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)
2. 438.32 g de NaCl
3. S'ajusta el pH 7.4-7.6 amb HCl 37%
4. Enrasar a 5 L amb aigua MilliQ
5. Si es vol preparar TBS-T, s'afegeixen 2.5 mL de Tween-20 per cada litre de TBS.

Tampó de càrrega 4X:

Per a 20 mL

1. 1.6 mL de tampó fosfat 0.5M pH=7
2. 8 mL de glicerol
3. 2 g de SDS
4. 13.3 mg de blau de bromofenol (ref. B8626, Sigma-Aldrich)
5. Es porta a 20 mL amb aigua MilliQ
6. Es fan alíquotes d'1 mL i es guarden a $-20^{\circ}C$





4. RESULTATS

4. RESULTATS

4.1 Obtenció i caracterització de la colònia LysMCre-C/EBP β ^{fl/fl}. Estudi dels efectes funcionals de la deleció de C/EBP β a les cèl·lules de la micròglia *in vitro* i *in vivo*.

C/EBP β és un factor de transcripció, membre de la família dels C/EBPs, que desenvolupa un paper important a varis òrgans i teixits. Per a estudiar aquestes funcions, als últims anys s'han utilitzat ratolins deficientes en C/EBP β . No obstant, en aquests animals s'ha observat esterilitat a les femelles a conseqüència de la manca del factor de transcripció en les cèl·lules de la granulosa del teixit ovàric. Aquestes cèl·lules en absència de C/EBP β perden la capacitat per a diferenciar-se i formar el cos luti necessari per a l'embaràs i el seu manteniment (Sterneck et al, 1997). Això impossibilita l'obtenció d'una línia estable de ratolins deficientes, ja que tots els creuaments s'han de realitzar entre animals heterozigots. A més, el paper clau de C/EBP β al metabolisme causa que en ésser eliminat la capacitat de mobilitzar i metabolitzar el glicogen al fetge dels ratolins disminueixi. Aquesta alteració provoca la mort perinatal d'un elevat percentatge dels animals genoanul·lats (Liu et al, 1999). Finalment, els que sobreviuen presenten un alt risc d'infecció com a resultat dels efectes que ocasiona la manca del factor de transcripció a les cèl·lules d'origen mielomonocític com els macròfags (Screpanti et al, 1995).

Estudis previs han demostrat que C/EBP β s'expressa tant a les cèl·lules microgials com als astròcits a on participa en la regulació de gens proinflamatoris implicats a l'activació glial (Ejarque-Ortiz et al, 2007a) (Straccia et al, 2011) (Straccia et al, 2013). A més, la seva eliminació resulta neuroprotectora en models de neurotoxicitat tant *in vitro* com *in vivo* (Straccia et al, 2011) (Kapadia et al, 2006) (Cortes-Canteli et al, 2008). No obstant, els animals amb deficiència total de C/EBP β no permeten concloure quin és el paper específic del factor de transcripció als diferents tipus cel·lulars del SNC. Aquesta limitació, juntament amb les



anteriorment descrites fan necessària l'obtenció d'una eina alternativa als animals amb tots els tipus cel·lulars genoanul·lats. Actualment les tècniques moleculars disponibles permeten dissenyar interruptors genètics per a eliminar qualsevol gen a qualsevol llinatge cel·lular. Una de les tècniques més utilitzades es basa en el sistema Cre/lox, on la recombinasa Cre, una proteïna de 38 kDa del bacteriòfag P1, reconeix una seqüència de 34 pb del genoma de P1 anomenada loxP. La recombinació que resulta de l'acció de Cre entre un parell de seqüències loxP properes dóna com a resultat l'excisió del fragment d'ADN que es troba entre les seqüències. Així, si es controla l'expressió de la recombinasa Cre és possible aconseguir la eliminació d'un gen en un tipus cel·lular concret (Sauer, 1998). En aquest treball es proposa emprar el promotor del gen de la lisozima M (LysM), expressat a les cèl·lules del llinatge mieloide al qual pertany la micròglia, per a restringir l'activitat de l'enzim a aquestes cèl·lules. Aquesta estratègia ha estat estudiada en macròfags i granulòcits on s'ha vist una alta eficiència i especificitat en la deleció del gen RFX5 (Clausen et al, 1999) i en micròglia on s'ha eliminat el gen *Ikk β* (Cho et al, 2008). Així el creuament d'animals que presentin aquesta mutació amb d'altres a on el gen de C/EBP β es trobi flanquejat per dues seqüències loxP (Sterneck et al, 2006) originarà els animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Aquesta colònia és l'eina que es proposa en aquesta tesi per tal d'estudiar les conseqüències de la deficiència de C/EBP β microglial. Amb aquest objectiu s'avaluaran els efectes funcionals de la deleció tant en cultius primaris de micròglia i glia mixta, com en animals adults. A més per primera vegada, s'estudiaran els efectes de la deleció de C/EBP β a les cèl·lules de la micròglia sobre la resposta inflamatòria derivada de l'administració sistèmica de LPS, així com el seu possible potencial neuroprotector al model animal d'esclerosi múltiple EAE i al model prionic murí ME7.

4.1.1 Obtenció de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$

Els animals LysMCre expressen l'enzim recombinasa Cre sota el control del promotor del gen lisozima M (LysM), específic de les cèl·lules del llinatge mieloide (Clausen et al, 1999). El creuament d'aquests ratolins amb la colònia C/EBP $\beta^{fl/fl}$



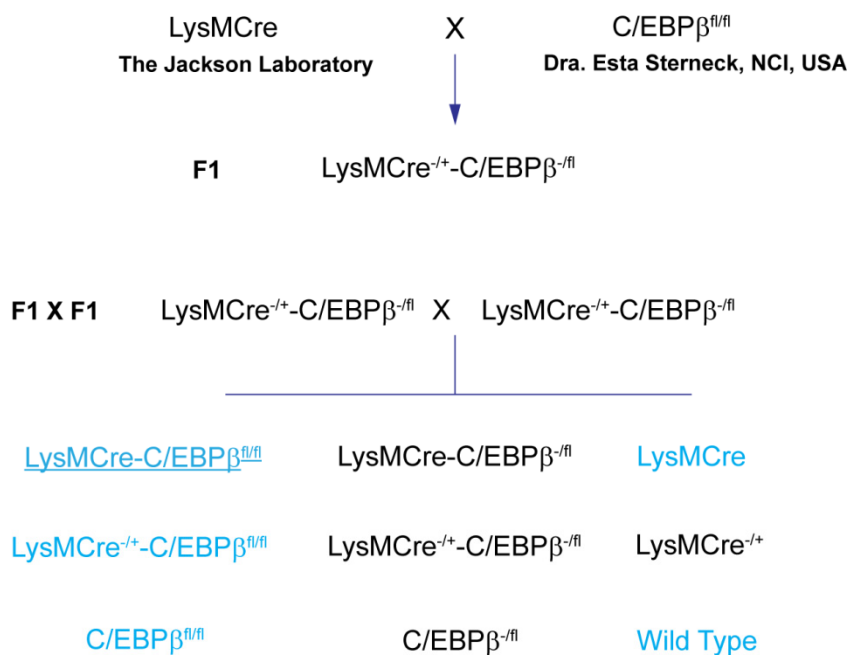
(Sterneck et al, 2006), on el gen de C/EBP β es troba flanquejat per dues seqüències loxP a totes les cèl·lules de l'animal, genera una descendència (F1) doble heterozigota per a les dues modificacions, LysMCre^{-/+}-C/EBP β ^{fl/fl}. A partir d'aquests animals heterozigots és possible obtenir els cinc genotips d'interès per a aquest projecte de tesi (Figura 14A). Aquests són:

LysMCre-C/EBP β ^{fl/fl} que presenta ambdues insercions en homozigosi, fet que teòricament resultarà en la deleció selectiva de C/EBP β a les cèl·lules microgials. **LysMCre** i **C/EBP β ^{fl/fl}** que contenen, també als dos al·lells, la inclusió de Cre a LysM i les seqüències loxP al gen de C/EBP β , respectivament. En aquest cas però, l'ablació de C/EBP β no es produirà a cap de les dues colònies, atès que presenten els dos elements del sistema Cre/lox per separat i per tant s'empraran com a animals control, juntament amb el genotip no modificat **Wild Type**. I finalment, els animals **LysMCre^{-/+}-C/EBP β ^{fl/fl}** el creuament dels quals permetrà obtenir els animals deficients condicionals, LysMCre-C/EBP β ^{fl/fl} i el genotip control, C/EBP β ^{fl/fl}, en una mateixa llogridada. Així, possibles efectes de deriva genètica entre les dues colònies que poguessin influenciar els resultats es podran evitar.

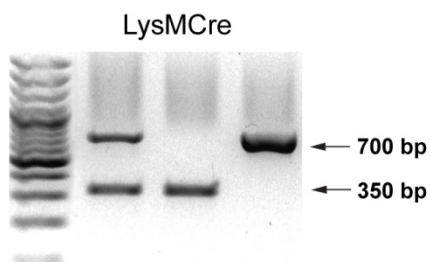
Aquests genotips són seleccionats mitjançant l'amplificació de l'ADN provinent de les cues dels ratolins. Així, la inclusió del gen de la recombinasa Cre sota el control de la lisozima M genera un producte d'amplificació de 700 parells de bases, mentre que en la seva absència el fragment en conté només 350 (Figura 14B). En canvi, un producte de la reacció en cadena de la polimerasa de 300 parells de bases indica la presència de les seqüències loxP al gen de C/EBP β , mentre que l'al·lel no modificat genera un amplicó de 240 (Figura 14C). A la taula 1 es detalla la relació entre la mida de les bandes dels diferents productes d'amplificació segons les modificacions introduïdes i els cinc genotips seleccionats.



A



B



C

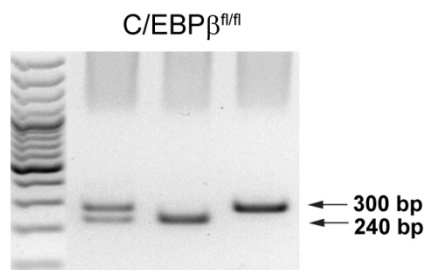


Figura 14. A. Generació de la colònia, en color blau es destaquen els cinc genotips d'interès per a aquest projecte de tesi. B. Detecció de la inclusió de la recombinasa Cre al promotor del gen LysM mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa. El primer carril correspon a la mostra d'ADN d'un animal heterozigot, el qual presenta Cre a un al·lel segons indica el producte d'amplificació de 700 parells de bases, mentre que l'amplicó de 350 parells de bases correspon a l'al·lel no modificat. El segon i tercer carril pertanyen a un animal no modificat i a un ratolí mutat homozigot, respectivament. C. Anàlisi de la inserció de les dues seqüències loxP al gen de C/EBPβ. Els dos productes d'amplificació de 300 i 240 parells de bases presents al primer carril indiquen la presència i l'absència, respectivament, de les seqüències a cadascun dels al·lells d'un animal heterozigot. El segon i tercer carril pertanyen a un animal no modificat i a un ratolí mutat homozigot, respectivament.

Genotip	Presenta inserció de Cre a LysM? (nombre de bandes i pb)	C/EBPβ flanquejat per loxP? (nombre de bandes i pb)
LysMCre-C/EBPβ ^{fl/fl}	Sí, als dos al·lels. (1 banda 700 pb)	Sí, als dos al·lels. (1 banda 300 pb)
LysMCre ^{-/-} -C/EBPβ ^{fl/fl}	Sí, a un al·lel. (2 bandes 700 i 350 pb)	Sí, als dos al·lels. (1 banda 300 pb)
LysMCre	Sí, als dos al·lels. (1 banda 700 pb)	No. (1 banda 240 pb)
C/EBPβ ^{fl/fl}	No. (1 banda 350 pb)	Sí, als dos al·lels. (1 banda 300 pb)
Wild Type	No. (1 banda 350 pb)	No. (1 banda 240 pb)

Taula 1. Relació entre els cinc genotips seleccionats i els productes d'amplificació que resulten d'avaluar la presència o absència de la recombinasa Cre al gen de la lisozima M i de les seqüències loxP al gen de C/EBPβ a les mostres d'ADN obtingudes de la cua dels ratolins.

4.1.2 Caracterització fenotípica de la colònia LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl}

Amb l'objectiu d'estudiar possibles diferències fenotípiques entre els ratolins LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl} i els animals control C/EBPβ^{fl/fl}, en primer lloc s'ha realitzat un control de pes setmanal. Així, el creixement de 6 femelles LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl} i 10 C/EBPβ^{fl/fl} va s'ha monitoritzat des del dia del seu deslletament fins als 6 mesos d'edat. Les dades obtingudes mostren que els animals LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl} presenten un creixement normal, comparable al dels animals control (Figura 15A). A més, a diferència d'allò observat en els ratolins amb deficiència total de C/EBPβ, les femelles LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl} són fèrtils (Sterneck et al, 1997) i no s'observa mort perinatal (Screpanti et al, 1995), atès que el nombre de cries per llodrigada és comparable al dels animals C/EBPβ^{fl/fl} (6.8±0.3, n=105 en el cas C/EBPβ^{fl/fl} i 6.2±0.3, n=110 al genotip LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl}). En segon lloc, s'ha dut a terme un estudi histològic emprant la tinció Hematoxilina/Eosina a diferents òrgans i teixits per a descartar alteracions prèviament descrites als animals genoanul·lats. Així, la deleció condicional de C/EBPβ a les cèl·lules d'origen mieloide no altera el desenvolupament de les glàndules mamàries de femelles joves, verges, tal i com es pot apreciar al panell superior de la figura 15B (Robinson et al, 1998). Aquestes imatges mostren que en el cas d'ambdós genotips les glàndules mamàries es troben envoltades per teixit adipós i són formades per conductes ductals. El seu



epitel·li consisteix en una capa interna de cèl·lules secretores luminals envoltada per cèl·lules mioepitelials basals. Un altre òrgan afectat per l'absència total de C/EBPβ com és la melsa, tampoc presenta alteracions destacables als animals LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl}, atès que no s'observa esplenomegàlia, ni hiperplàsia de les polpes vermella i blanca (Figura 15B, panell inferior). A més, tant els ratolins C/EBPβ^{fl/fl} com els LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl} presenten megacariòcits, fet que indica la presència de processos d'hematopoesi extramedul·lar (Figura 15B, panell inferior, detall augment 40X). No obstant, a diferència dels animals genoanul·lats, aquestes cèl·lules són poc abundants i no es troben envoltades d'agregats de cèl·lules plasmàtiques (Screpanti et al, 1995). Finalment, els altres òrgans i teixits analitzats, fetge, pulmó, ronyó, cervell, os i cor, tampoc presenten alteracions destacables

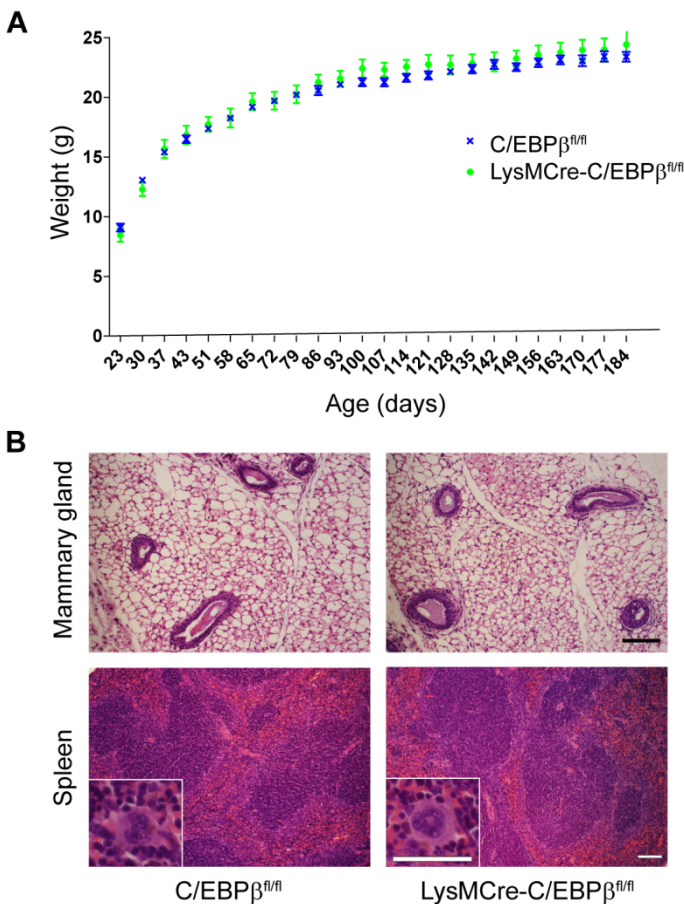


Figura 15. A. Control de pes realitzat setmanalment a 10 femelles C/EBPβ^{fl/fl} i 6 femelles LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl} des del dia dels seu deslletament fins a l'edat de 6 mesos. No s'observen diferències entre els dos genotips. Es representa la mitjana ± SEM. B. Estudi histològic emprant la tinció d'Hematoxilina/Eosina de la glàndula mamària (panell superior) i la melsa (panell inferior). La barra representa 100 μm a les fotografies de baix augment i 50 μm al detall dels megacariòcits presents a la melsa d'ambdós genotips.

4.1.3 Confirmació de l'absència selectiva de C/EBP β a les cèl·lules microgials *in vitro*

L'eficiència i selectivitat de la recombinació del gen de C/EBP β mediada per la recombinasa Cre sota el control del promotor LysM a les cèl·lules de la micròglia primària s'ha estudiat emprant cèl·lules primàries gials de ratolins C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ nounats. En aquests cultius, el tractament durant 24h amb LPS+IFN γ indueix un clar augment dels nivells de la proteïna de C/EBP β a la micròglia primària dels ratolins C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Malgrat que a la figura només es mostra la isoforma LAP de 35 kDa, les altres dues, Full i LIP, també es detecten si se satura l'exposició. Contràriament, a la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ no s'observa expressió de C/EBP β ni en condicions basals ni per efecte del LPS+IFN γ (Figura 16A i B).

El mateix resultat s'obté en realitzar una tinció de immunofluorescència. Les imatges mostren com la majoria de les cèl·lules microgials C/EBP $\beta^{fl/fl}$ presenten expressió, nuclear, del factor de transcripció. A més, novament, el tractament augmenta la senyal de C/EBP β a la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$. En canvi, als cultius LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ els nuclis cel·lulars només són visibles gràcies a la tinció de DAPI, atès que no s'observa marcatge del factor de transcripció a cap de les dues condicions (Figura 16C).

Aquestes dades indiquen una recombinació de C/EBP β a les cèl·lules microgials primàries propera al 100%.

Finalment, cultius de glia mixta d'ambdós genotips demostren l'especificitat de la deleció controlada pel promotor de la lisozima M. D'una banda, s'observa com les cèl·lules microgials dels animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ identificades pel marcatge de la proteïna Iba1 no presenten senyal de C/EBP β (Figura 17A i B puntes de fletxa), mentre que d'altra banda, l'expressió del factor de transcripció a astròcits, identificats pel marcatge contra la proteïna GFAP no es veu alterada (Figura 17B,



fletxes). Aquests cultius també presenten un increment dels nivells de proteïna de C/EBP β en resposta al tractament amb LPS+IFN γ que s'observa clarament a les cèl·lules microgials del ratolins C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i en menor mesura als astròcits d'ambdós genotips.

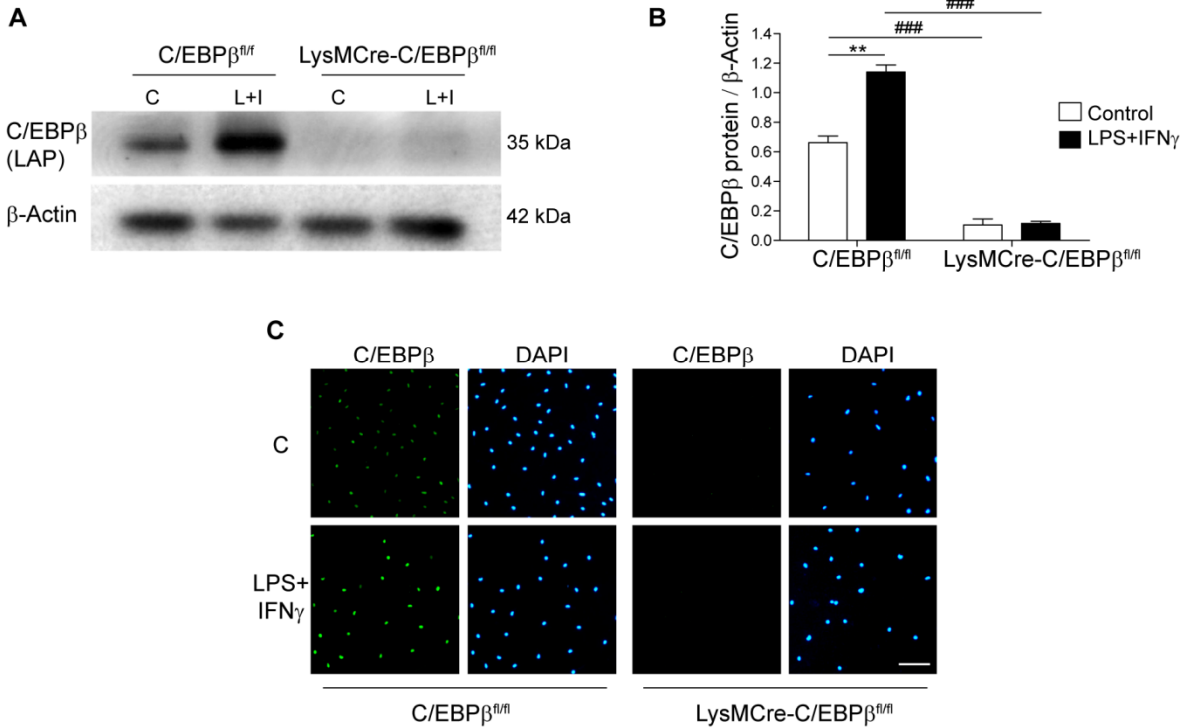


Figura 16. A. *Western blot* de microglia primària tractada durant 24h amb LPS+IFN γ dels genotips C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Al primer s'observa un increment de l'expressió de la isoforma de C/EBP β , LAP a conseqüència del tractament, mentre que a les cèl·lules microgials del segon genotip no s'observa expressió del factor de transcripció ni en condicions basals ni per efecte de l'estímul proinflamatori. B. Quantificació dels nivells de proteïna de C/EBP β presents a cultius primaris de microglia d'animals C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractats a 24h amb LPS+IFN γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 3 experiments independents. ** $p < 0.01$ respecte la corresponent situació control. #### $p < 0.001$ respecte el corresponent genotip C/EBP $\beta^{fl/fl}$. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni. C. Immunocitoquímica de cultius primaris microgials tractats durant 24h amb LPS+IFN γ . Novament els animals C/EBP $\beta^{fl/fl}$ mostren un increment de l'expressió nuclear de C/EBP β en resposta al tractament, mentre que els nuclis de la microglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ només poden ésser observats mitjançant la llum ultraviolada. La barra representa 100 μ m.

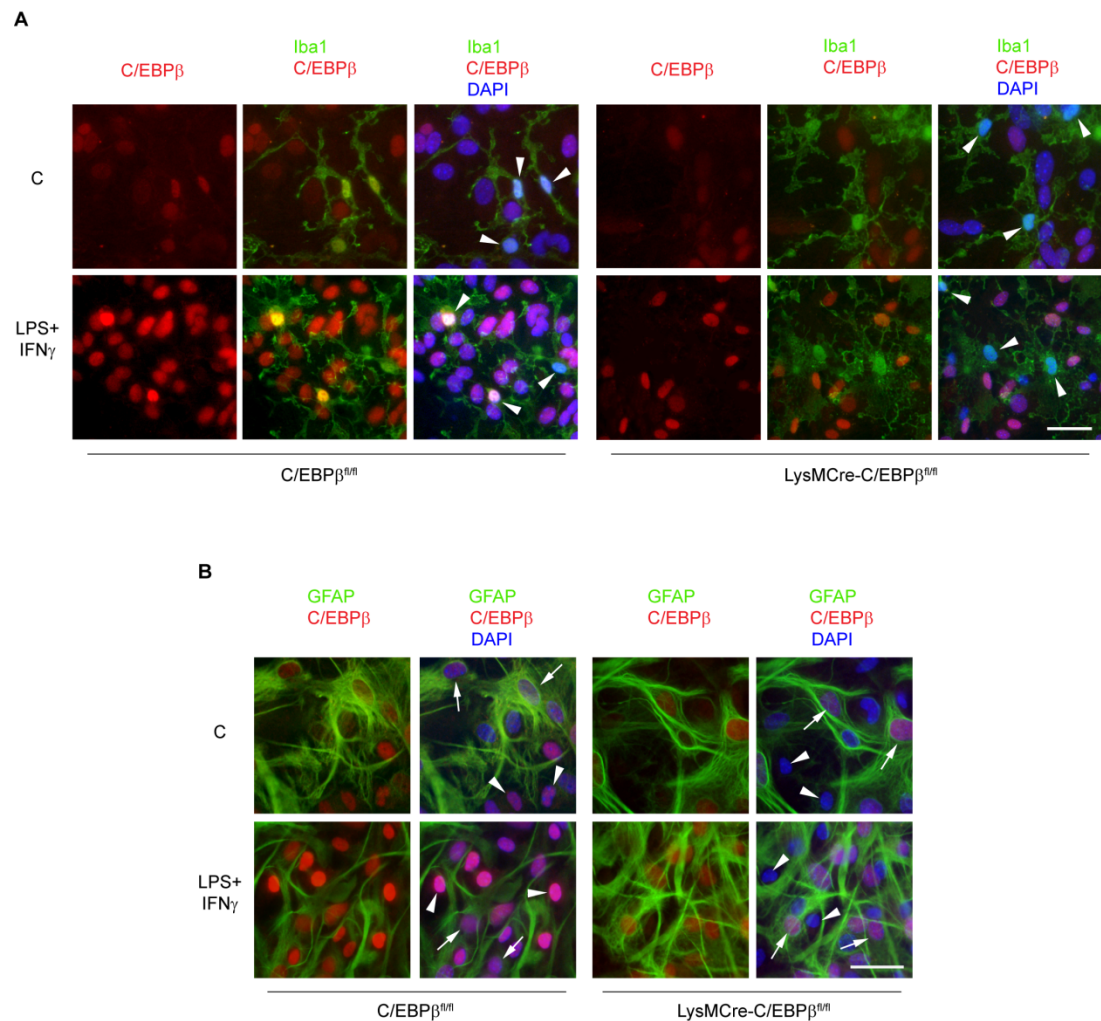


Figura 17. A. Immunocitoquímica de cultius de glia mixta d'animals C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractats a 24h amb LPS+IFN γ . Les cèl·lules microgials s'identifiquen pel marcatge contra la proteïna Iba1 i només presenten expressió de C/EBP β en el cas del genotip C/EBP $\beta^{fl/fl}$. B. Els mateixos cultius mostren que els astròcits d'ambdós genotips, identificats pel marcatge de GFAP, expressen el factor de transcripció. Tant la micròglia com les cèl·lules de l'astroglia augmenten l'expressió de C/EBP β en resposta al tractament, no obstant aquest increment és major en el cas del primer tipus cel·lular. La barra representa 50 μ m.

4.1.4 Anàlisi de l'efecte de la deleció de C/EBP β a les cèl·lules microgials *in vitro*

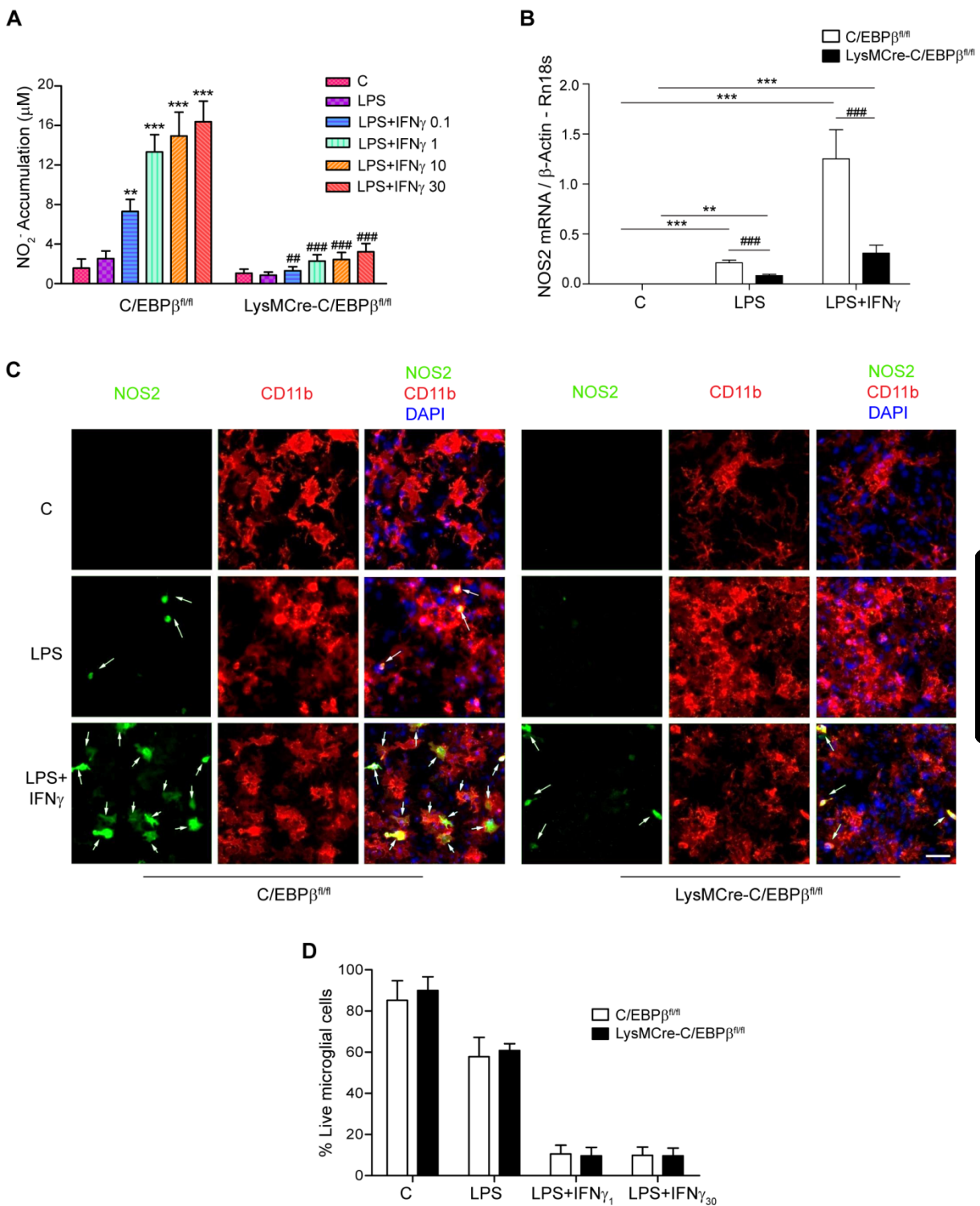
Amb l'objectiu de caracteritzar els efectes funcionals de la deleció de C/EBP β a les cèl·lules microgials, s'ha estudiat la producció de NO i l'expressió de l'enzim que el

produeix, NOS2, així com la mort cel·lular induïda per l'activació i la capacitat fagocítica de la micròglia.

El tractament amb LPS sol o conjuntament amb diferents dosis d'IFN γ indueix la producció de NO, que augmenta a mesura que s'incrementa la concentració d'IFN γ , a les cèl·lules microglijals primàries. No obstant, en el cas de la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$, la quantitat de NO alliberada disminueix clarament (~80%) (Figura 18A). Aquesta reducció també s'observa a nivell de l'ARNm de NOS2, l'enzim induïble encarregat de la producció de NO (Figura 18B). La tinció d'immunofluorescència realitzada a cultius de glia mixta d'ambdós genotips, mostra novament l'increment de l'expressió de NOS2 que es produeix en resposta al tractament, principalment enfront dels dos estímuls (LPS+IFN γ), així com l'efecte inhibitori de la deleció de C/EBP β sobre la producció de NO en aquestes cèl·lules. A més, aquestes preparacions permeten identificar a les cèl·lules microglijals marcades amb CD11b com les principals cèl·lules productores de NO en aquests cultius (Figura 18C, fletxes).

A continuació, per tal d'establir un possible paper de C/EBP β en la mort cel·lular induïda per l'activació, cultius primaris de micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ s'han tractat amb LPS sol o conjuntament amb dues concentracions d'IFN γ . Els comptatges realitzats 3, 5 i 7 dies després dels tractaments mostren una marcada mort cel·lular induïda per aquests, sobretot en presència de l'IFN γ . Així, mentre la viabilitat cel·lular disminueix un 40% per efecte del LPS, el percentatge de cèl·lules mortes augmenta fins al 90% en afegir ambdues concentracions d'IFN γ . No obstant, en aquest cas la deleció de C/EBP β no sembla participar en aquest procés de mort cel·lular, atès que no s'observen diferències entre els dos genotips. (Figura 18D)





RESULTATS

Figura 18. A. Determinació de la producció de NO a cultius microglials tractats durant 48h amb LPS sol o conjuntament amb diferents concentracions d'IFN γ . L'alliberació de NO augmenta en resposta al tractament, i principalment en incrementar la dosi d'IFN γ . No obstant, aquesta pujada s'atenua significativament a conseqüència de la deleció de C/EBP β a la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Les dades es representen com la mitjana \pm SEM de 6

experimentos. B. Expressió de l'ARNm de l'enzim NOS2 a cultius de micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractats amb LPS i LPS+IFN γ durant 6h. Els resultats es representen com la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments independents. C. Expressió de NOS2 a cultius de glia mixta d'ambdós genotips tractats 24h amb LPS i LPS+IFN γ . Es confirmen els resultats observats a A i B, alhora que s'identifiquen les cèl·lules de la micròglia com les principals productores de NO en aquests cultius. D. Percentatge de cèl·lules microgials primàries vives després d'ésser tractades amb LPS sol o conjuntament amb IFN γ a dues concentracions diferents durant 5 dies. Els tractaments, sobretot en presència de IFN γ indueixen la mort cel·lular. No obstant, no s'observen diferències entre els dos genotips. Els mateixos resultats es van obtenir 3 i 7 dies post-tractament. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 3 experiments. **p<0.01 i ***p<0.001 respecte la corresponent situació control. ##p<0.01 i ####p<0.001 respecte el corresponent genotip C/EBP $\beta^{fl/fl}$. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni.

Finalment, la resposta de la micròglia primària, tractada o no prèviament, d'ambdós genotips enfront d'una infecció bacteriana va ser avaluada emprant bacteris *Salmonella typhimurium* fluorescents. La capacitat fagocítica, mesurada 30 minuts després de l'adició dels bacteris al cultiu primari, mostra en el cas del tractament amb LPS, un increment del nombre de cèl·lules infectades semblant en els dos genotips. No obstant, la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ fagocita més bacteris que la C/EBP $\beta^{fl/fl}$ en aquestes condicions. La diferència més gran entre els genotips s'observa en aquelles cèl·lules tractades amb LPS+IFN γ . En aquest cas, el genotip LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ presenta un percentatge de cèl·lules infectades i un nombre de bacteris fagocitats major que la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$, els valors de la qual són quasi indistingibles dels de la condició basal. Per últim, la capacitat de resoldre la infecció avaluada 4h després de l'addició de la *Salmonella*, indica que l'absència de C/EBP β podria afavorir l'eliminació bacteriana. Així, tant el percentatge de cèl·lules infectades com el nombre de bacteris internalitzats disminueix respecte el temps anterior en el cas del genotip LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. No obstant, a la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ només disminueix el nombre de cèl·lules infectades en presència del LPS (Figura 19 i Taula 2).



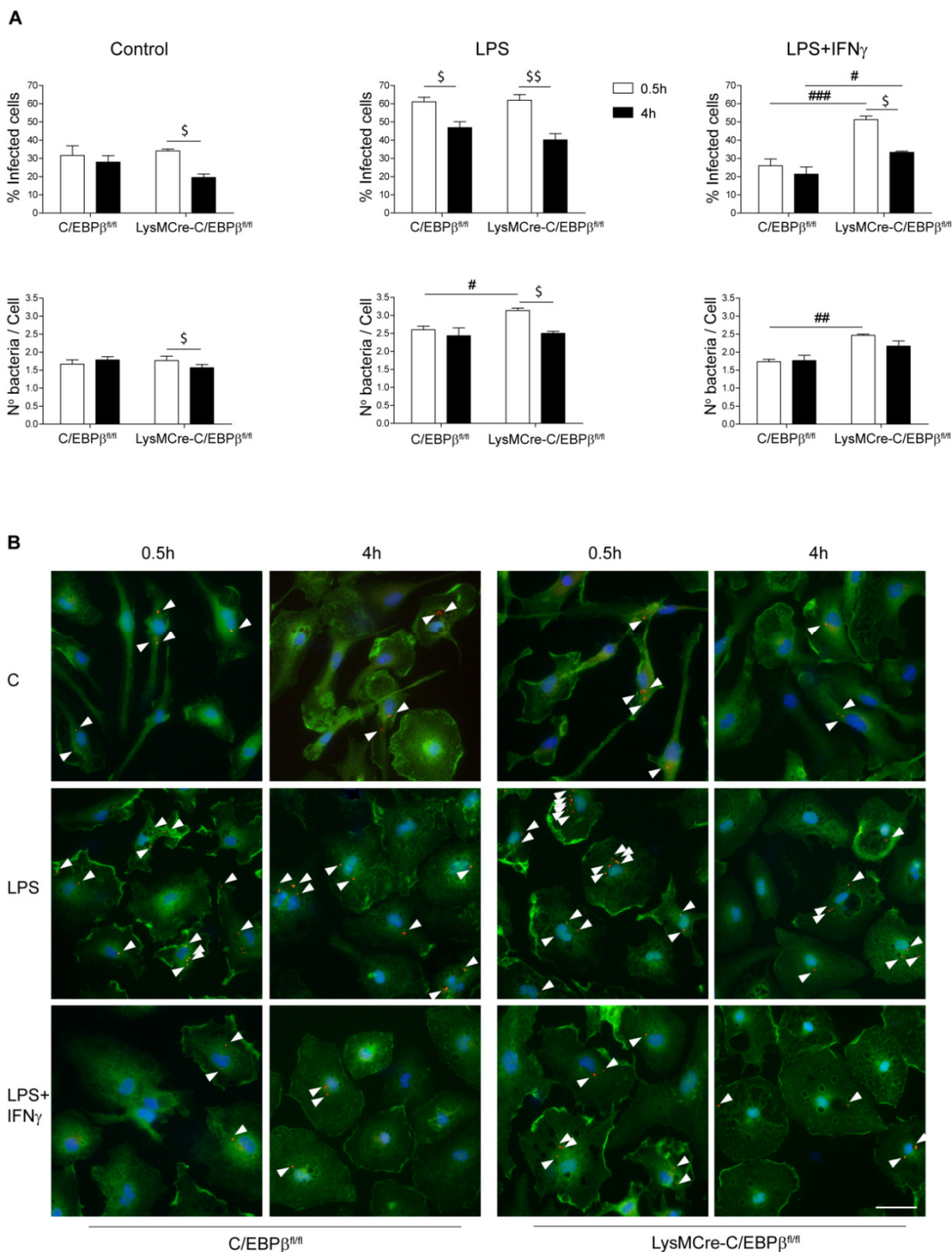


Figura 19. A. Gràfiques dels comptatges de 3 experiments independents realitzats per a avaluar, absència de C/EBP β , la capacitat de fagocitar i eliminar *Salmonella typhimurium* de la micròglia tractada prèviament durant 24h amb LPS o amb LPS+IFN γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). #p<0.05, ##p<0.01 i ###p<0.001 respecte el corresponent genotip C/EBP $\beta^{fl/fl}$. \$p<0.05 i \$\$p<0.01 respecte el corresponent temps 0.5h. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni. B. Immunocitoquímica dels cultius infectats amb *Salmonella typhimurium*. Les cèl·lules microgials s'identifiquen pel marcatge amb l'anticòs Iba1 (verd), mentre que els bacteris internalitzats (vermell) s'indiquen amb puntes de fletxa. La barra indica 25 μ m.

		0.5h		4h	
		C/EBPβ ^{fl/fl}	LysMCre-C/EBPβ ^{fl/fl}	C/EBPβ ^{fl/fl}	LysMCre-C/EBPβ ^{fl/fl}
% Infected cells	C	31.6 ± 5.3	34.1 ± 1	28 ± 3.5	19.6 ± 1.9 [§]
	LPS	61 ± 2.5***	61.9 ± 3.1***	46.9 ± 3.2**,§	40.1 ± 3.4***, §§
	LPS+IFNγ	26 ± 3.7	51.3 ± 1.9**, ###	21.4 ± 3.9	33.3 ± 0.7*, #, §
N° Bacteria / Cell	C	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1 [§]
	LPS	2.6 ± 0.1***	3.1 ± 0.1***, ##	2.4 ± 0.2*	2.5 ± 0.1***, §
	LPS+IFNγ	1.7 ± 0.1	2.5 ± 0.02***, ###	1.7 ± 0.2	2.2 ± 0.2*

Taula 2. Mitjana ± SEM de 3 experiments independents. *p<0.05, **p<0.01 i ***p<0.001 respecte la corresponent situació control. #p<0.05, ##p<0.01 i ###p<0.001 respecte el corresponent genotip C/EBPβ^{fl/fl}. §p<0.05 i §§p<0.01 respecte el corresponent temps 0.5h. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni.

4.1.5 Caracterització de la micròglia aïllada del cervell de ratolí adult.

Els resultats obtinguts emprant cultius primaris han demostrat que l'eficiència de recombinació de la recombinasa Cre sota el control del promotor del gen LysM és gairebé del 100% a les cèl·lules microgials *in vitro*. Amb l'objectiu d'avaluar l'ús del promotor LysM com a eina per a controlar l'activitat de Cre a la micròglia adulta, es va procedir a aïllar aquest tipus cel·lular. El protocol consisteix en una primera separació, que a més permet eliminar la mielina, amb un gradient de Percoll al 30%. A continuació, una segona separació mitjançant unes columnes magnètiques (Miltenyi) permet enriquir la població microgial, marcada amb anticossos anti-CD11b. Aquesta fracció, juntament amb la fracció no retinguda per la columna i homogenat de cervell total, s'han analitzat per RT-PCR. Els resultats mostren un enriquiment dels marcadors microgials, CD11b i PU.1, a la fracció positiva microgial, mentre que, altres marcadors com GFAP (astròcits), CNPasa (oligodendròcits) i MAP2 (neurons) presenten molt poca expressió en aquesta fracció (Figura 20A). Aquestes dades indiquen un gran enriquiment de cèl·lules microgials a la fracció retinguda a la columna magnètica. Amb tot, no permeten quantificar la puresa que es pot aconseguir emprant aquesta tècnica. En canvi, la



tinció amb l'anticòs CD68, un marcador microglial, de preparacions de la fracció positiva obtingudes per *cytospin* permet definir en un $87 \pm 1\%$ el percentatge de cèl·lules microgials presents en aquesta fracció (Figura 20B).

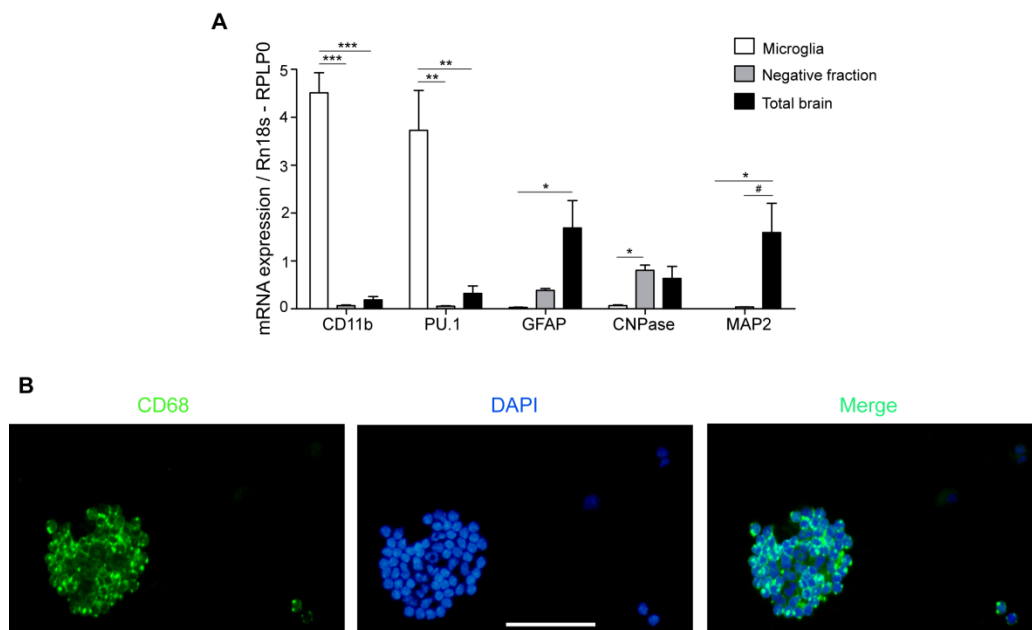


Figura 20. A. Anàlisi de l'expressió de l'ARNm dels gens, CD11b, PU.1, GFAP, CNPasa i MAP2 a les cèl·lules retingudes per la columna (microglia), a les no retingudes (negative fraction) i a l'homogenat de cervell (total brain). Els alts nivells dels gens microgials, CD11b i PU.1, juntament amb la baixa expressió dels gens característics de les altres cèl·lules presents al SNC que s'observen a les mostres de microglia aïllada, indiquen l'alta puresa d'aquesta fracció. Es representa la mitjana \pm SEM de 4 experiments independents. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ respecte la corresponent fracció microglial. # $p < 0.05$ respecte la corresponent fracció negativa. ANOVA d'un sol factor seguida del test de Bonferroni. B. Immunocitoquímica de preparacions de la fracció microglial obtingudes amb *cytospin*. La col·localització del marcador de microglia CD68 amb la tinció nuclear DAPI permeten quantificar la puresa del protocol emprat per a aïllar aquestes cèl·lules, $87 \pm 1\%$. La barra representa 50 μm .

4.1.6 Confirmació de l'absència selectiva de C/EBP β a les cèl·lules microgials *in vivo*:

Un cop realitzada la posta a punt del mètode és possible analitzar l'expressió de C/EBP β a les cèl·lules microgials de ratolins adults C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Els nivells de proteïna revelen que en condicions basals no es detecta

l'expressió del factor de transcripció a la micròglia. No obstant, la injecció sistèmica de LPS indueix al cap de 16h una forta pujada de la senyal de C/EBP β , tot i que aquest augment només s'observa en el cas del genotip C/EBP $\beta^{fl/fl}$ (Figura 21A i B).

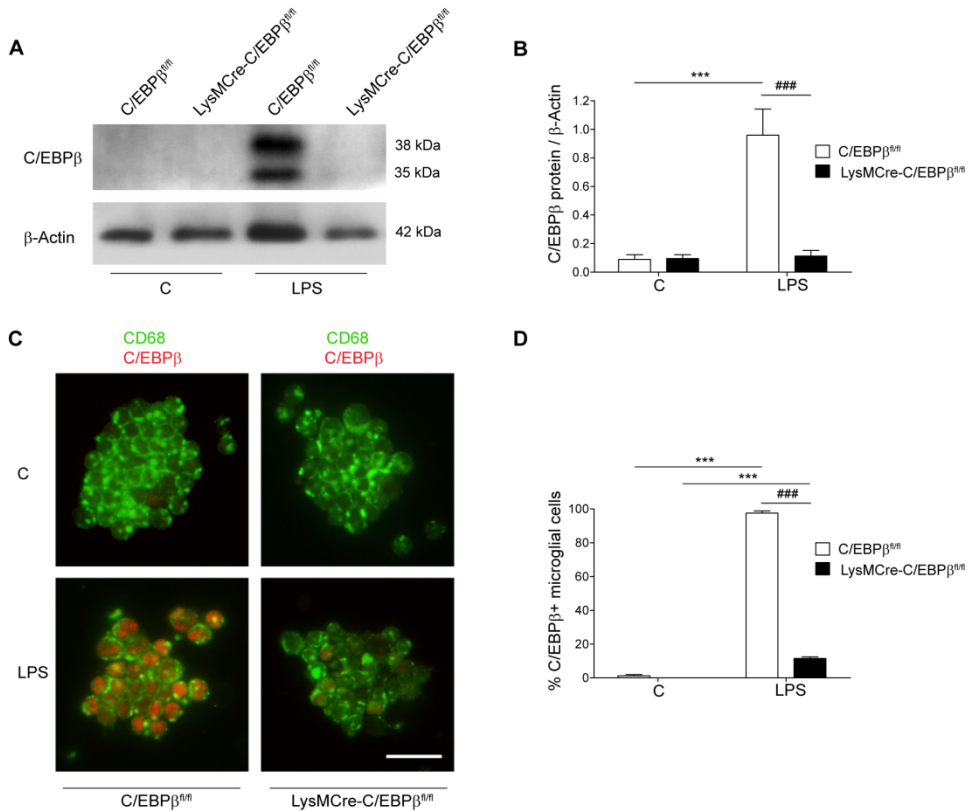


Figura 21. A. *Western blot* representatiu on es mostra l'expressió de C/EBP β a la micròglia aïllada del cervell adult de ratolins C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractats sistèmica amb LPS durant 16h. El factor de transcripció només es detecta a les cèl·lules microglials C/EBP $\beta^{fl/fl}$ en presència del tractament. B. Quantificació dels nivells de proteïna de C/EBP β . C. Immunocitoquímica de preparacions de micròglia adulta obtingudes per *cytospin*. Les imatges confirmen l'augment de l'expressió de C/EBP β en resposta al tractament amb LPS. En aquest cas però, aproximadament un 10% de la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ també presenta senyal del factor de transcripció. La barra representa 25 μ m. D. Quantificació del nombre de cèl·lules microglials que expressen C/EBP β . Les dades representen la mitjana \pm SEM de 4 experiments independents. *** p <0.001 respecte la corresponent situació control. ### p <0.001 respecte el corresponent genotip C/EBP $\beta^{fl/fl}$. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni

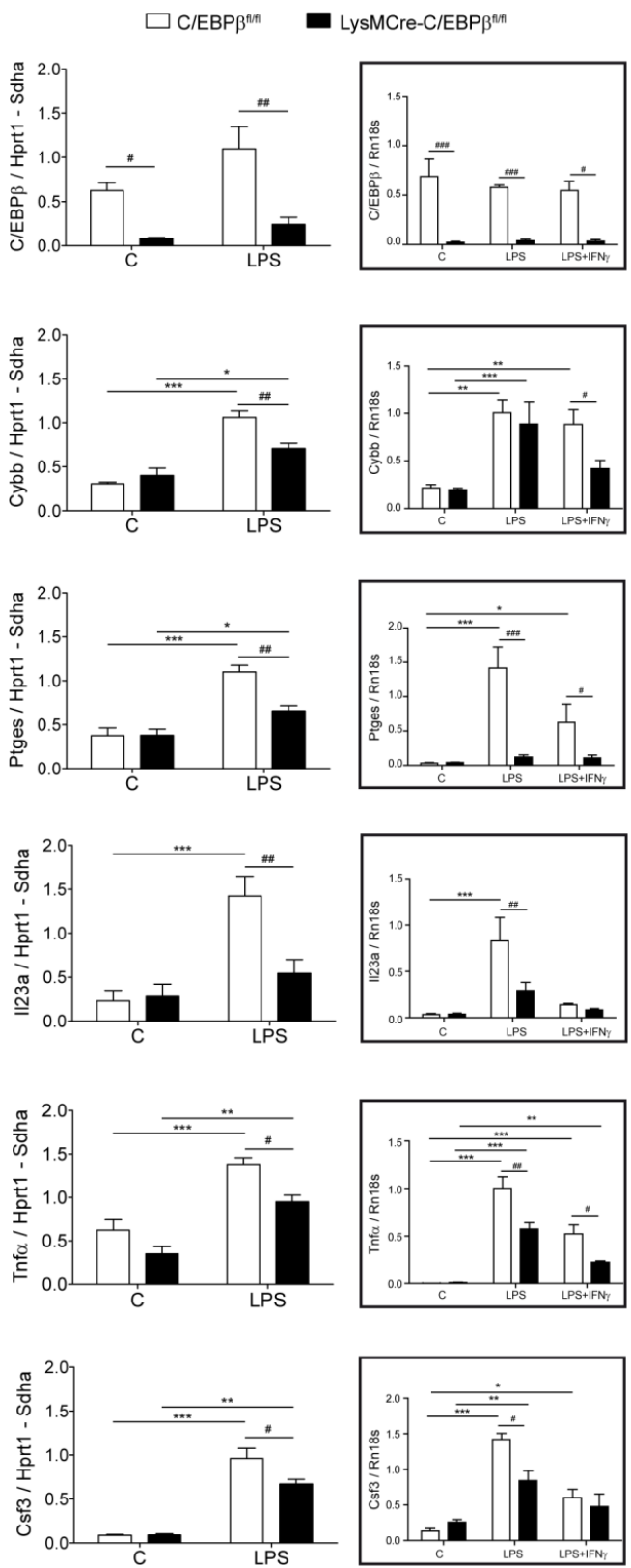
Aquests resultats però, tot i indicar una alta eficiència de recombinació no permeten quantificar el nombre de cèl·lules microgials on s'ha produït la deleció del factor de transcripció. Per aquesta raó, s'ha realitzat una immunocitoquímica emprant preparacions obtingudes per *cytospin*. Aquestes mostres confirmen la quasi nul·la expressió de C/EBP β en condicions control i la inducció de la seva expressió en resposta al LPS. Aquest cop però, l'eficiència de recombinació és lleugerament inferior a l'observada a les cèl·lules microgials primàries i el $11 \pm 1\%$ de la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractada presenta senyal del factor de transcripció (Figura 21C i D). No obstant, aquest percentatge continua sent clarament inferior al $97 \pm 1\%$ de la micròglia tractada C/EBP $\beta^{fl/fl}$ que expressa el factor de transcripció.

Aquestes dades indiquen doncs que la recombinasa Cre sota el control del promotor de la lisozima M recombinava el gen de C/EBP β a quasi el 90% de les cèl·lules microgials del cervell adult.

4.1.7. Reducció de l'expressió de gens proinflamatoris en absència de C/EBP β microglial

Pel que fa a l'ARNm, a més del propi C/EBP β , també s'ha estudiat l'expressió dels gens pro-inflamatòris Tnfa, IL-23a, Csf3, Ptges i Cybb. A la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$, tots 6 gens, experimenten un augment de la seva expressió com a conseqüència del tractament amb LPS. No obstant, aquest increment es redueix significativament en el cas del genotip LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ (Figura 22). La inducció amb el tractament i la disminució de l'expressió en absència de C/EBP β s'observa també en la micròglia primària d'ambdós genotips tractada amb LPS i LPS+IFN γ (Figura 22, gràfiques petites). El cas de C/EBP β però, mereix una menció especial, atès que els seus nivells d'ARNm reflecteixen l'eficiència de recombinació del gen tant al cervell adult (~90%) com als cultius primaris (~100%). Així mentre que a la micròglia de ratolí adult, l'expressió del factor de transcripció augmenta





lleugerament en resposta al tractament, a les cèl·lules microglials primàries l'ARNm de C/EBPβ quasi no es detecta a cap de les tres condicions.

Aquests resultats demostren que l'absència de C/EBPβ resulta en una disminució de l'expressió de gens proinflamatoris a la microglia *in vitro* i *in vivo* i permeten especular sobre un possible paper neuroprotector de l'absència del factor de transcripció en un context patològic.

Figura 22. Expressió de l'ARNm dels gens C/EBPβ, Cybb, Ptges, IL-23a, Tnfα i Csf3 a la microglia aïllada del cervell d'animals C/EBPβ^{fl/fl} i LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl} adults, tractats amb LPS durant 16h. Quadres: anàlisi dels nivells d'ARNm dels mateixos gens, però a la microglia primària d'ambdós genotips tractada amb LPS i LPS+IFNγ durant 6h. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments independents. *p<0.05, **p<0.01 i ***p<0.001 respecte la corresponent situació control. #p<0.05, ##p<0.01 i ###p<0.001 respecte el corresponent genotip C/EBPβ^{fl/fl}. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni

4.1.8 Estudi dels efectes de la deleció de C/EBP β microglial al model animal de l'esclerosi múltiple EAE.

Amb l'objectiu de comprovar aquesta hipòtesi, en primer lloc es va estudiar l'expressió de C/EBP β al model animal EA, emprant ratolins no modificats. Els nivells d'ARNm i proteïna del factor de transcripció s'han analitzat a sis regions del SNC, tres medul·lars i tres encefàliques, 9, 14, 21 i 28 dies després de la immunització amb el pèptid MOG₃₅₋₅₅. Els resultats mostren un clar augment de l'expressió de C/EBP β , a la medul·la toràctica i al cervell posterior, a dia 14, mentre que aquest increment és més moderat a dies 21 i 28 (Figura 23A-D). Aquests resultats s'han observat també a les altres quatre regions estudiades, les medul·les cervical i lumbar, el cervell mig i el prosencèfal.

Els ratolins LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i els animals control LysMCre i C/EBP $\beta^{fl/fl}$ manifesten els primers símptomes de la patologia 10 dies després de la immunització. No obstant, al voltant del dia 14, coincidint amb l'augment de l'expressió de C/EBP β descrit, s'aprecien les primeres diferències entre els genotips. Així, la patologia s'agreuja clarament en el cas dels animals control, assolint el seu màxim a dia 20 i estabilitzant-se a dia 25 fins al final de l'experiment 52 dies després de la immunització. En canvi, la simptomatologia s'atenua en absència de C/EBP β i un cop assolit el màxim a dia 22 els ratolins LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ es recuperen parcialment de la patologia (Figura 23E). El mateix resultat s'ha observat als dos experiments addicionals realitzats emprant només ratolins C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. A més, les dades dels tres experiments indiquen que l'absència de C/EBP β no afecta al percentatge d'incidència del model, (70% (30/41) a C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i 68% (26/38) a LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$, però sí resulta en una menor mortalitat (12% (5/41) a C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i 5% (2/38) a LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$).

Per últim, el factor de transcripció també s'ha estudiat emprant material humà. Així, en analitzar mostres *post-mortem* humanes s'observa un increment de l'expressió de la proteïna de C/EBP β en pacients amb esclerosi múltiple quan es comparen amb controls (Figura 23F i G).



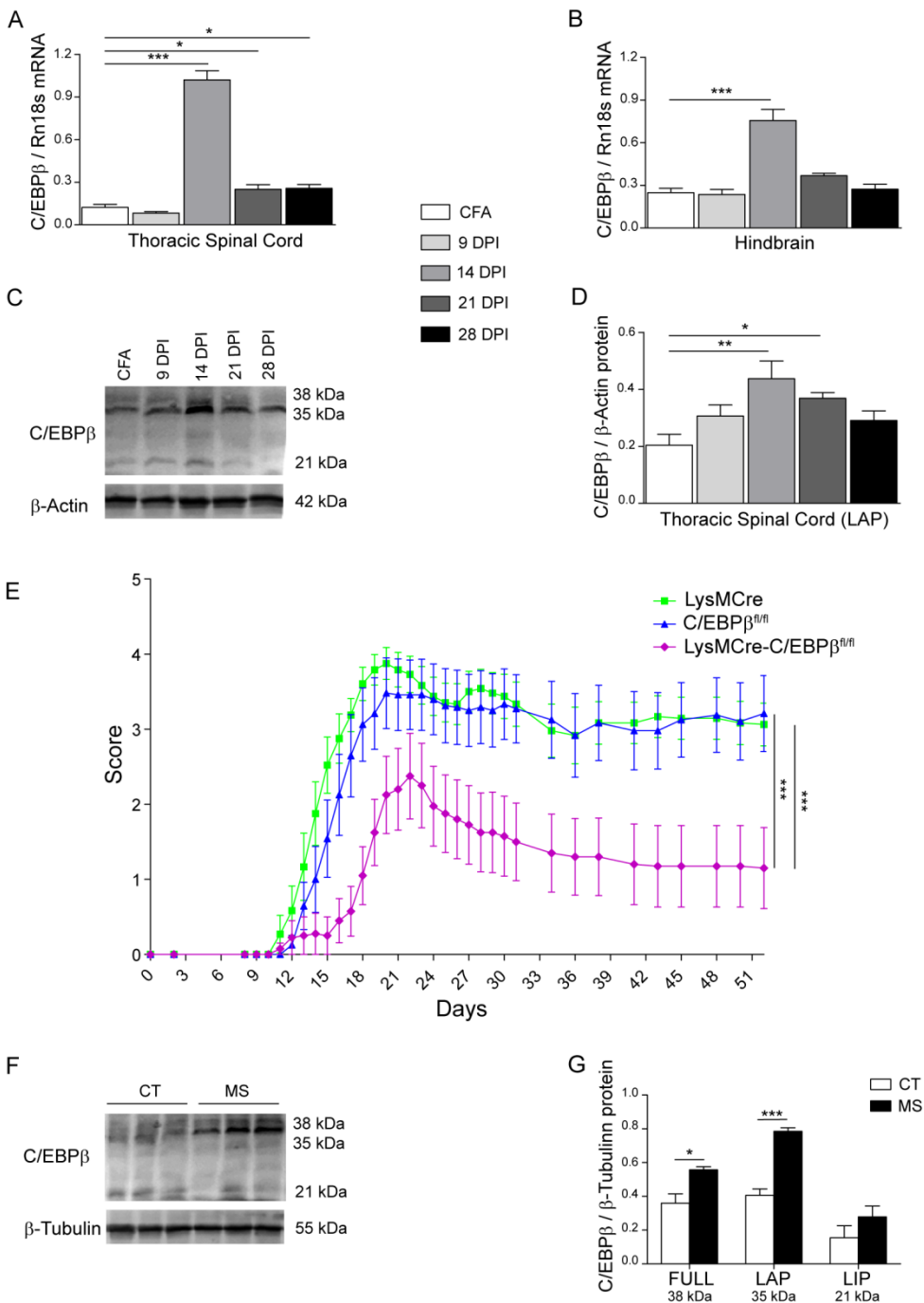


Figura 23. A i B. Expressió dels nivells d'ARNm de C/EBPβ 9, 14, 21 i 28 dies després de la immunització amb el pèptid MOG₂₅₋₃₅ a la medul·la espinal toràctica i al cervell posterior, respectivament. L'increment més notable es produeix a dia 14. C. *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de la proteïna de C/EBPβ 9, 14, 21 i 28 dies després de la immunització amb el pèptid MOG₃₅₋₅₅ a la medul·la espinal toràctica. Novament, l'augment d'expressió més important s'observa a dia 14. D. Quantificació de la isoforma LAP detectada per *Western blot* a les mostres de medul·la espinal toràctica. E. Experiment

representatiu on es monitoritza la simptomatologia del model EAE als animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i als dos genotips controls LysMCre i C/EBP $\beta^{fl/fl}$ durant 52 dies. Els primers mostren un perfil més atenuat alhora que després d'assolir la màxima severitat experimenten una recuperació parcial de la patologia. F. *Western blot* representatiu on es compara l'expressió proteica de C/EBP β a mostres del còrtex temporal de pacients d'esclerosi múltiple amb pacients control. S'observa un augment dels nivells del factor de transcripció amb la malaltia. G. Quantificació de la proteïna de les tres isoformes de C/EBP β presents a les mostres de pacients amb esclerosi múltiple i controls. Les dades es representen com a mitjana \pm SEM mitjana amb $n=4-6$ per a l'anàlisi d'ARNm i proteïna i LysMCre $n=12$, C/EBP $\beta^{fl/fl}$ $n=12$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ $n=10$ a la gràfica *EAE score*. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ i *** $p<0.001$ respecte la corresponent situació CFA (A, B iD), LysMCre, C/EBP $\beta^{fl/fl}$ (E) o control (G). ANOVA d'un sol factor seguida del test Newman-Keuls Anàlisi Kruskal-Wallis factor aplicant el test de comparació múltiple de Dunn per a les dades no paramètriques de la gràfica *EAE score*.

4.1.9. Inducció del model prionic murí, ME7, als animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$

Finalment, la possible neuroprotecció de la deleció de C/EBP β també s'ha estudiat emprant el model prionic murí, ME7. La col·laboració amb el grup dels Drs. Hugh Perry i Diego Gómez-Nicola de la Universitat de Southampton ha permès aprendre el model i realitzar els primers estudis emprant mostres prèviament obtingudes al seu laboratori.

En aquests experiments, s'ha observat que la patologia prionica es caracteritza per una progressiva proliferació de la població microglial, sobretot a l'hipocamp i al tàlem (Figura 24A). Els resultats presentats per (Gomez-Nicola et al, 2013) mostren que aquesta proliferació és controlada per la via de senyalització de CSF-1R. Així, l'administració de GW2580, un inhibidor selectiu de l'activitat tirosina cinasa de CSF-1R, redueix el nombre de cèl·lules microgials, alhora que atenua la severitat de la patologia. C/EBP α i PU.1 participen en la proliferació microglial, juntament amb CSF-1R. Així 20 setmanes després de la inducció del model, els nivells d'ARNm d'aquests tres gens augmenten als animals ME7 en comparació amb els animals control o NBH (de l'anglès, *normal brain homogenate*), mentre que el tractament amb GW2580 en redueix l'expressió. En canvi, tot i que la patologia sí que n'incrementa els nivells, l'inhibidor de CSF-1R no disminueix significativament l'expressió de C/EBP β (Figura 24B). Tot i aquest resultat, s'ha estudiat el model



emprant animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$, atès l'augment de l'ARNm del factor de transcripció observat a animals malalts.

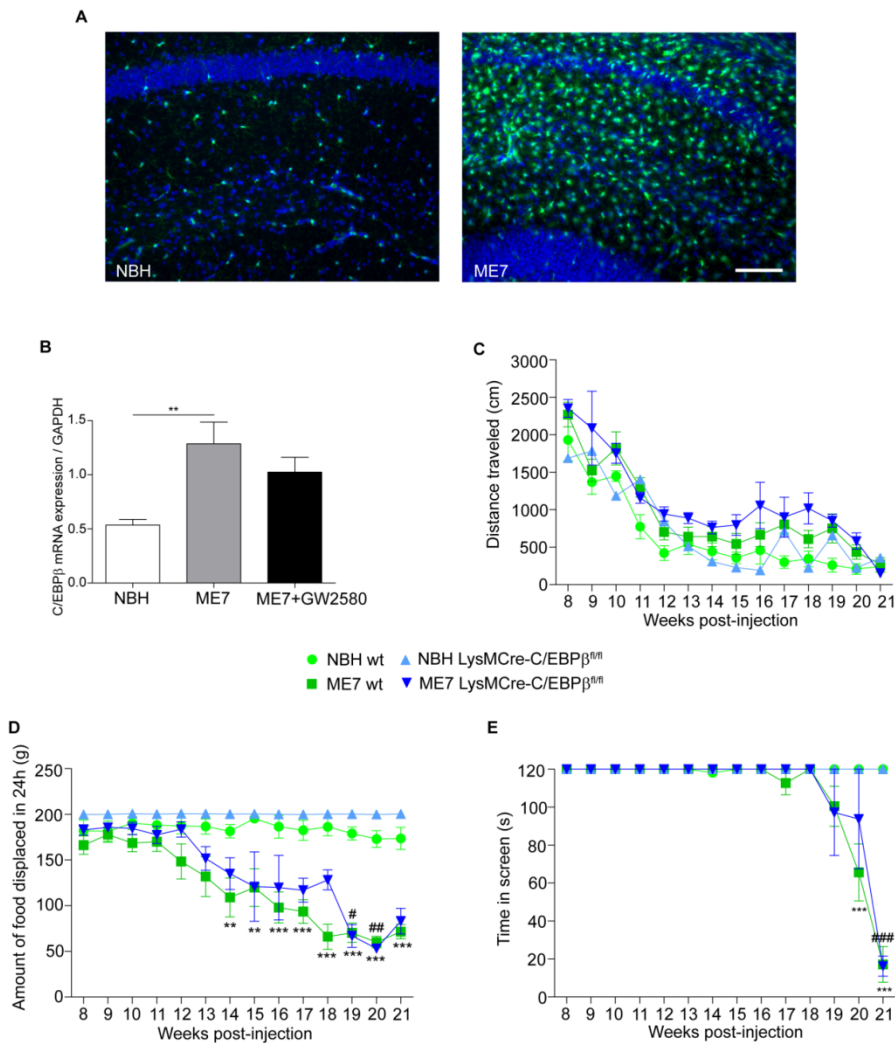


Figura 24. A. Hipocamp de ratolins amb expressió de la proteïna fluorescent verda, EGFP, sota el promotor del receptor CSF-1R. S'observa un gran augment del nombre de cèl·lules microgials als animals ME7 20 setmanes després de la inoculació. La barra representa 100 μ m. B. Anàlisi dels nivells d'ARNm de C/EBP β al tàlem d'animals control, ME7 i ME7+GW2580 20 setmanes després de la inducció de la patologia. S'observa un augment de l'expressió del factor de transcripció a la patologia. El tractament amb l'inhibidor de l'activitat tirosina cinasa de CSF-1R, GW2580, no afecta significativament els nivells de C/EBP β . Les dades es representen com mitjana \pm SEM amb n=4-6. **p<0.01 respecte el corresponent control (NBH). ANOVA d'un sol factor seguida del test Newman-Keuls. C. Test *open-field*. D. Test *burrowing*. E. Test *inverted screen*. No s'observen diferències entre genotips ni en condicions control (NBH) ni en condicions patològiques (ME7). No obstant, la disminució de l'activitat de *burrowing* i del temps a la reixa dels animals ME7, sí indiquen

una correcta inducció de la patologia. Les dades es representen com la mitjana \pm SEM de 8 animals NBH wt (n=2 *wild type*, n=3 LysMCre i n=3 C/EBP $\beta^{fl/fl}$), 1 animal NBH LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$, 12 animals ME7 wt (n=4 *wild type*, n=4 LysMCre i n=4 C/EBP $\beta^{fl/fl}$) i 4 animals ME7 LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. **p<0.01 i ***p<0.001 respecte la corresponent situació NBH wt. #p<0.05, ##p<0.01 i ###p<0.001 respecte la corresponent situació NBH LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni.

La progressió del model priònic ME7 s'ha avaluat a través de diferents proves de comportament, el test *d'open-field*, el de *burrowing* i el d'inverted screen. Aquests s'han realitzat setmanalment a partir de la setmana 8 post-injecció, ja que anteriorment els animals resten asimptomàtics.

En el cas de *l'open-field*, s'observa que els animals ME7 mostren una activitat exploradora exacerbada, segurament a causa de la impossibilitat de reconèixer un entorn prèviament explorat, ja que la patologia afecta a l'hipocamp (Figura 24C). L'alteració de l'hipocamp també modifica el comportament de recompensa que aquests animals experimenten en desplaçar el pinso i crear un cau on amagar-se. Així, els ratolins ME7, a mesura que avança la patologia, progressivament presenten una disminució de l'activitat de *burrowing* (Figura 24D). Finalment, la funció muscular dels ratolins es deteriora sobretot a les etapes finals del model, fet que els provoca debilitat muscular a les extremitats. Per tant, els animals no són capaços de subjectar-se a la reixa més de dos minuts, quan realitzen el test *d'inverted screen* (Figura 24E).

Malauradament, tot i haver reproduït el model amb èxit, tal i com demostren les dades obtingudes en realitzar els diferents tests, no s'observen diferències entre genotips, fet que suggereix que l'absència de C/EBP β a les cèl·lules microgials no reverteix aquestes alteracions.



4.2 Anàlisi del perfil transcriptòmic de la micròglia primària activada.

El SNC dels mamífers presenta una gran complexitat estructural, juntament amb una àmplia diversitat cel·lular. Per tal d'entendre els mecanismes que hi tenen lloc i obtenir respostes per a tractar els diferents trastorns neurodegeneratius, cal realitzar una rigorosa anàlisi dels gens i les isoformes d'ARN que s'expressen als diferents tipus cel·lulars que el conformen. El transcriptoma es compon de tots els transcrits sintetitzats a una cèl·lula, teixit o organisme, és a dir, dels gens codificants de proteïnes i dels ARN no codificants. Prèviament al desenvolupament de les noves tècniques de seqüenciació, l'ús de la tecnologia dels *microarrays* ha permès aprofundir en el coneixement del cervell. No obstant, aquesta tècnica presenta una resolució i una precisió limitades, fet que ha comportat la necessitat de desenvolupar noves eines com la seqüenciació de l'ARN o ARN-Seq. Aquesta tècnica permet detectar nous transcrits, variants genètiques i esdeveniments d'*splicing* alternatiu. A més, presenta avantatges significatives respecte els *microarrays*:

1. És molt més sensible i quantitativa.
2. Presenta un rang de detecció dels transcrits molt més ampli.
3. Les seqüències obtingudes són molt més específiques, ja que el soroll de fons és menor.
4. La seva capacitat de detecció no depèn del nombre o tipus de sondes emprades, fet que permet estudiar qualsevol zona del genoma, fins i tot gens no anotats.
5. No presenta limitacions físico-químiques com la temperatura d'hibridació de les sondes, la formació d'estructures secundàries o hibridacions creuades.

En aquesta tesi doctoral, la seqüenciació d'ARN s'ha emprat per tal de determinar la signatura transcriptòmica de la micròglia primària activada amb estímuls clàssicament proinflamatoris com ara el LPS o l'IFN γ . A partir de la fracció d'ARN total de cultius primaris microglicals tractats a 6 h amb LPS o LPS+IFN γ es varen construir les llibreries i es va procedir a la seqüenciació de les mostres, un cop



eliminats els RNA de transferència i els ribosòmics. L'anàlisi bioinformàtic del nombre de transcrits detectats a cada mostra ha proporcionat els següents resultats:

4.2.1 Espècies d'ARN detectades a la micròglia C/EBP β ^{fl/fl} tractada a 6h amb LPS i LPS+IFN γ .

En primer lloc, les seqüències detectades s'han mapejat i anotat emprant com a referència el genoma de ratolí mmu10. Un cop mapejades i anotades, les seqüències s'han quantificat utilitzant el programa DESeq. A la taula 3 es visualitzen els diferents gens codificants i no codificants detectats tant a la situació control com als dos tractaments. La majoria de transcrits identificats corresponen a gens codificants de proteïnes. No obstant, també hi ha una presència important d'ARNs no codificants, com ara els ARNnc llargs (lncRNAs), interessants pel seu potencial regulador de la transcripció i la traducció, o els miARNs (miRNAs), capaços d'unir-se a gens específics i promoure el seu silenciament o la seva eliminació, contribuint així a la regulació de la seva expressió. Menys nombrosos són els ARN nuclears petits (snRNAs) la funció principal dels quals és el processament del pre-ARNm, tot i que també participen en la regulació de factors de transcripció i de la ARN polimerasa II i en el manteniment dels telòmers. Aquests ARNs però, poden ésser modificats pels ARNs nucleolars petits (snoRNAs), juntament amb el ARN de transferència i ribosomals. D'altres ARNs, encara no identificats (miscellaneous RNAs) o amb una funció majoritàriament encara desconeguda com els pseudogens, la seqüència dels quals és molt semblant a la d'un gen normal però el producte de la qual no és funcional, també s'han detectat.

Cal destacar que en aquesta taula, el nombre de gens de cada categoria no és igual per a les tres situacions, C, LPS i LPS+IFN γ , doncs l'expressió d'alguns gens s'encén o s'apaga en funció del tractament, fet que origina aquestes diferències (veure taula 4 per a més detalls).



	Control	LPS	LPS+IFN γ
Protein coding	11225	12694	13004
Non coding RNAs	1104	1174	1169
Pseudogenes	266	291	296
lncRNAs	642	678	668
lincRNA	117	123	124
Antisense	140	144	140
Processed transcripts	126	128	124
Sense intronic	7	8	8
Other ncRNA	252	275	272
snoRNA	68	79	81
snRNA	7	7	9
miRNA	69	66	63
Miscellaneous RNA	52	53	52

Taula 3. El mapeig i la posterior anotació de les seqüències detectades emprant el genoma de referència de ratolí mmu10, revela la presència d'una àmplia varietat d'espècies d'ARN a les mostres de la micròglia primària tractada a 6h amb LPS i LPS+IFN γ . D'aquestes, les corresponents a gens codificants de proteïnes són les més abundants. Destaca el diferent nombre de seqüències detectades dins d'un mateix tipus d'ARN entre les diferents condicions C, LPS i LPS+IFN γ , conseqüència de l'encesa o apagada d'alguns dels gens en resposta als tractaments. lincRNA, de l'anglès *long intergenic non-coding RNA*.

4.2.2 Anàlisi WGCNA (Weighted Correlation Gene Network Analysis) de la micròglia C/EBP β ^{fl/fl} tractada amb LPS i LPS+IFN γ durant 6h.

L'anàlisi no supervisat WGCNA és un mètode emprat per a agrupar els gens detectats segons els seus perfils d'expressió. Els resultats d'aquesta anàlisi mostren 12 patrons de coexpressió diferents, cadascun d'ells identificat amb un color. La representació d'aquestes dades mitjançant un dendrograma permet apreciar la mida dels diferents grups de gens (Figura 25). D'aquests, el que n'agrupa, amb diferència, un major nombre, concretament 9344, és el mòdul turquesa, mentre que el color blau identifica el segon agrupament més nombrós. L'ordre de la resta de mòduls de major a menor és: marró>groc>verd>vermell>negre> rosa>magenta>gris>porpra>verd-groc. A més, la



primera divisió que s'observa a les branques del dendrograma mostra que la totalitat dels gens agrupats dins dels mòduls blau, verd i groc juntament amb la meitat dels continguts al negre presenten un patró d'expressió marcadament diferent al dels altres grups.

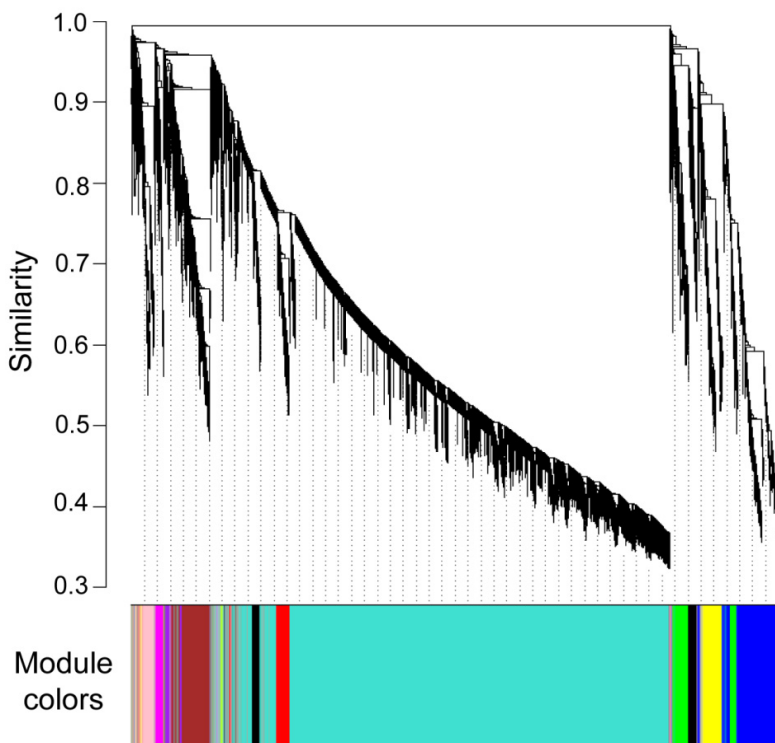


Figura 25. Dendrograma on es mostra la correlació dels gens obtinguda aplicant l'algoritme WGCNA. Les branques mostren l'agrupament dels gens segons la semblança entre els seus patrons d'expressió. Els mòduls s'han definit emprant la funció *dynamic Treecut*. Els diferents mòduls s'indiquen emprant 12 colors arbitraris.

Per a representar la correlació entre els diferents mòduls i el tractament amb LPS i LPS+IFN γ s'han utilitzat les gràfiques de tipus *eigengene* que presenten el perfil d'expressió representatiu dels gens agrupats dins d'un determinat mòdul. Així, s'observa que els grups groc, blau, negre i turquesa són els més afectats pels estímuls. L'expressió dels gens dels mòduls groc i blau s'indueix amb els tractaments, mentre que els estímuls proinflamatoris redueixen els nivells dels gens dels grups negre i turquesa. Finalment, els tractaments no afecten significativament l'expressió dels gens agrupats als altres mòduls. No obstant, als clústers rosa,

verd i vermell s'aprecia la tendència del tractament amb LPS a induir una expressió gènica contrària a l'observada en el cas del tractament o de la situació control (Figura 26).

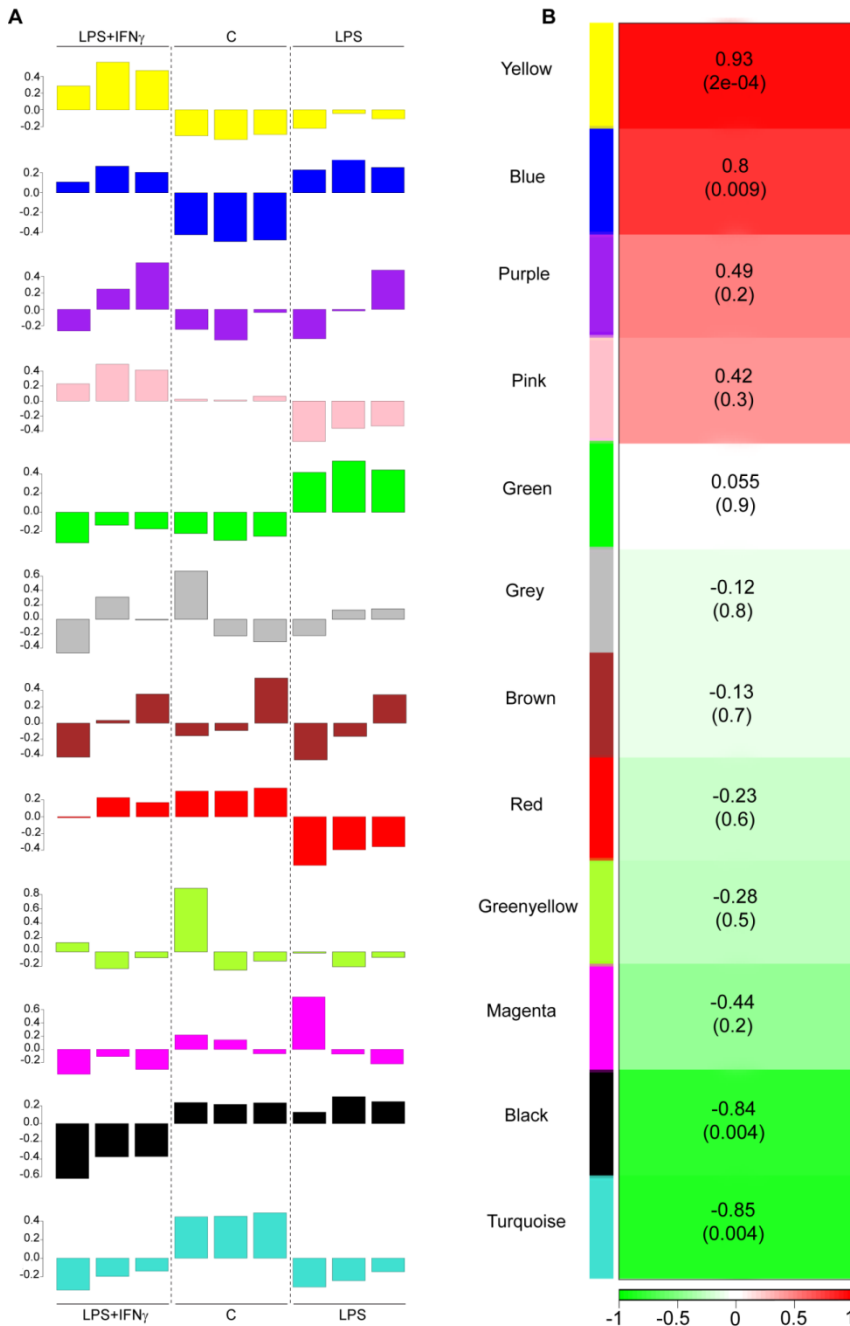


Figura 26 A. Gràfiques d'expressió *eigengene* dels diferents mòduls. L'eix d'ordenades mostra els nivells d'expressió a les diferents mostres, representades a l'eix de les abscisses. B. Correlació entre l'expressió gènica dels diferents mòduls amb el tractament, on 1 (vermell) representa un augment dels nivells amb els estímuls mentre que -1 (verd) correspon a aquells gens que experimenten una reducció de la seva expressió en resposta als tractaments. Entre parèntesi s'indica el valor de p de cada comparació. S'observa que els únics mòduls amb correlació significativa amb el tractament són el groc, el blau, el negre i el turquesa. Els dos primers agrupen els gens que s'activen davant dels estímuls proinflamatoris. En canvi, l'expressió dels gens representats als dos últims s'inhibeix en resposta als tractaments.

RESULTATS

A continuació, per tal d'interpretar i entendre el significat biològic d'aquests canvis, es varen analitzar els gens agrupats als mòduls groc, blau, negre i turquesa emprant la plataforma *Gencodis* (Carmona-Saez et al, 2007). Aquesta eina permet obtenir les anotacions associades a un grup de gens determinat usant diferents bases de dades. En aquest estudi però, ens hem centrat específicament en la categoria processos biològics del *Gene Ontology* (GO) i en les vies de KEGG (de l'anglès, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) afectades.

Així, l'anotació dels gens del mòdul groc, els quals experimenten un gran augment de la seva expressió en resposta al co-tractament amb LPS+IFN γ , resulta principalment en un enriquiment dels processos biològics relacionats amb la transcripció i l'apoptosi. No obstant, dins dels 25 termes de GO més significatius també en destaquen de relacionats amb la defensa contra patògens, la senyalització a través de la via de les citocines, la resposta inflamatòria i la resposta cel·lular a l'IFN γ . Aquest últim resulta especialment interessant, ja que relaciona el patró d'expressió gènica específic del mòdul amb un procés biològic que es produeix directament a causa d'un dels dos estímuls del co-tractament. A més, 3 dels 4 gens anotats (Gbp8, IL-12Rb1, Gbp10 i Gbp1) són membres de la família de les GTPases induïbles per l'IFN γ , amb un paper clau en la defensa contra bacteris i virus, l'expressió dels quals no s'ha descrit mai a la micròglia (Figura 27 panell superior esquerre).

En canvi, l'anàlisi dels gens agrupats dins del mòdul blau revela que 18 dels 25 termes de GO tenen relació amb la resposta immune i inflamatòria. Aquest resultat no és sorprenent si es considera el perfil d'expressió d'aquests gens, clarament augmentat enfront al tractament amb LPS, sol o conjuntament amb IFN γ . De fet, dins d'aquest mòdul es troben gens clàssicament proinflamatoris com IL-1 β , Ptgs2 (COX2), NOS2, Cybb, IL-6, IL-12a, IL-12b i Tnfa. Així doncs, aquestes dades confirmen el tractaments amb LPS i LPS+IFN γ com a inductors de l'activació microglial clàssica, amb un patró que es podria definir com a típicament M1 (Figura 27 panell superior dret).



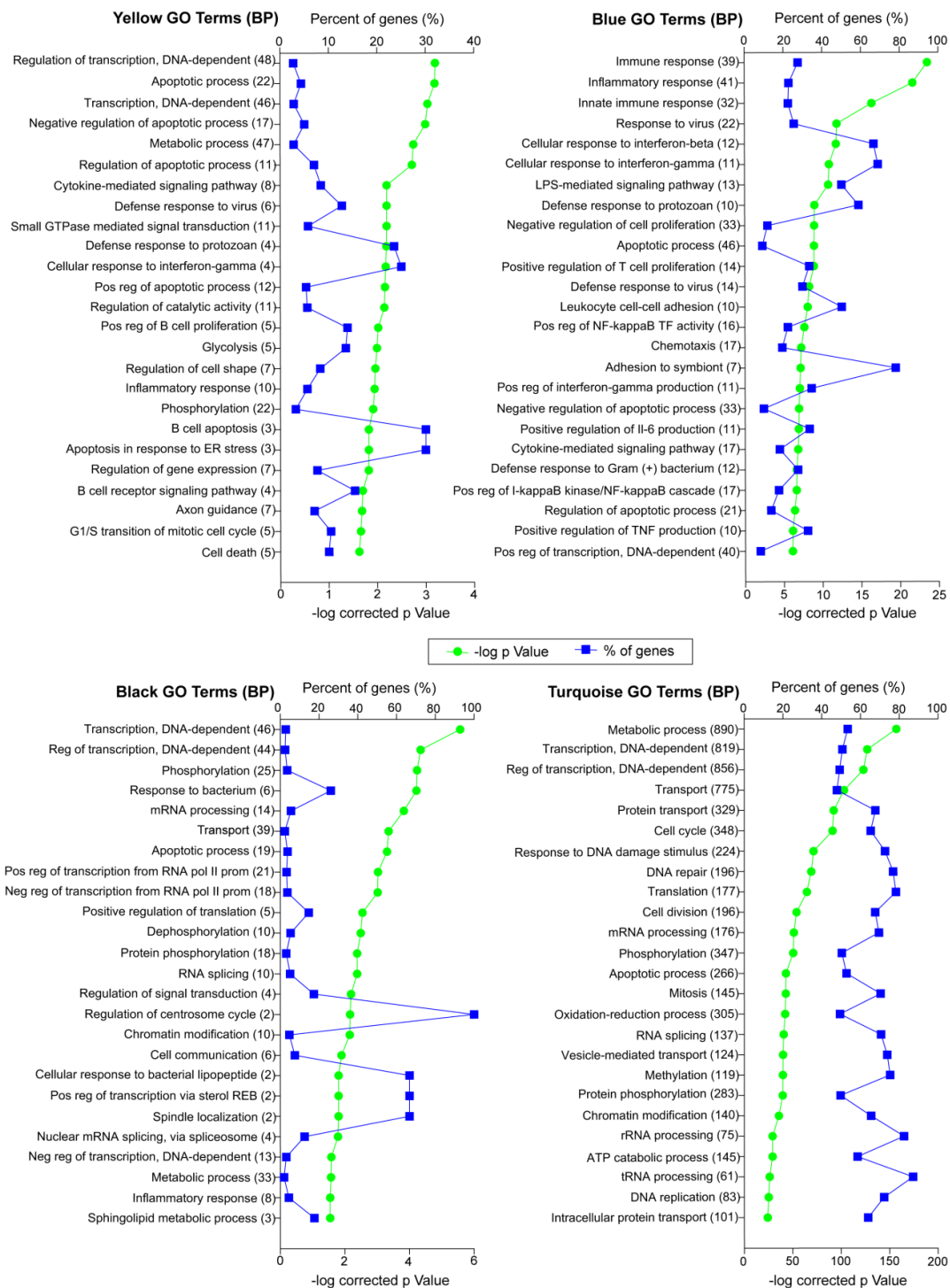


Figura 27. Representació dels 25 termes GO (categoria processos biològics) més significatius dels mòduls groc, blau, negre i turquesa. A l'eix de les abscisses superior s'indica el percentatge que representen els gens detectats al present estudi dins del total de cada categoria, mentre que l'eix inferior mostra els valors del logaritme negatiu de la p de cada terme. Finalment, els diferents processos biològics, juntament amb el nombre de gens anotats a cadascun d'ells, es presenten a l'eix d'ordenades.

En canvi, els gens continguts dins dels mòduls negre i turquesa el patró d'expressió dels quals és oposat a l'observat als clústers groc i blau, respectivament, participen majoritàriament en processos relacionats amb la transcripció, el transport, el metabolisme i la fosforilació (Figura 27 panell inferior).

Pel que fa a les vies de KEGG afectades l'enriquiment d'aquelles vies relacionades amb l'activació o la resposta pro-inflamatòria no és tant notable. De fet, només als mòduls groc, blau i negre presenten gens implicats en la via de les citocines, les quimiocines, dels receptors de tipus *Toll* o la fagocitosi (Figura 28 panells superiors i inferior esquerre). No obstant, dins les vies més significatives presents al clúster turquesa, que agrupa aquells gens reduïts per efecte del LPS i el LPS+IFN γ , destaquen aquelles associades a les malalties de Huntington, Alzheimer i Parkinson. A més, els gens detectats en aquest treball i classificats dins d'aquestes vies representen més del 60% dels gens totals anotats per aquestes malalties, fet que indica l'alta rellevància de les dades obtingudes (Figura 28 panell inferior dret). Així doncs, a conseqüència de l'interès per al present estudi del paper de l'activació microglial als processos neurodegeneratius, s'ha considerat oportú aprofundir més en l'anàlisi d'aquests gens.

Atès que aquestes tres malalties neurodegeneratives presenten diferents característiques clíniques i patològiques, però tenen en comú la presència d'agregats proteics, l'estrès oxidatiu i les alteracions mitocondrials (Carvalho et al, 2015), és d'esperar trobar gens específics per a cadascuna d'elles, però també de gens comuns. El diagrama de Venn (Figura 29) mostra un total de 64 gens implicats a les tres patologies, mentre que només 15, 35 i 48 estan relacionats únicament amb la malaltia de Parkinson, Alzheimer i Huntington, respectivament. Finalment, en comparar les patologies dos a dos s'observa que el grup Huntington comparteix 5 gens amb el conjunt Parkinson i 2 amb el d'Alzheimer, però aquestes dues malalties no presenten cap gen en comú, que no participi també a la primera.



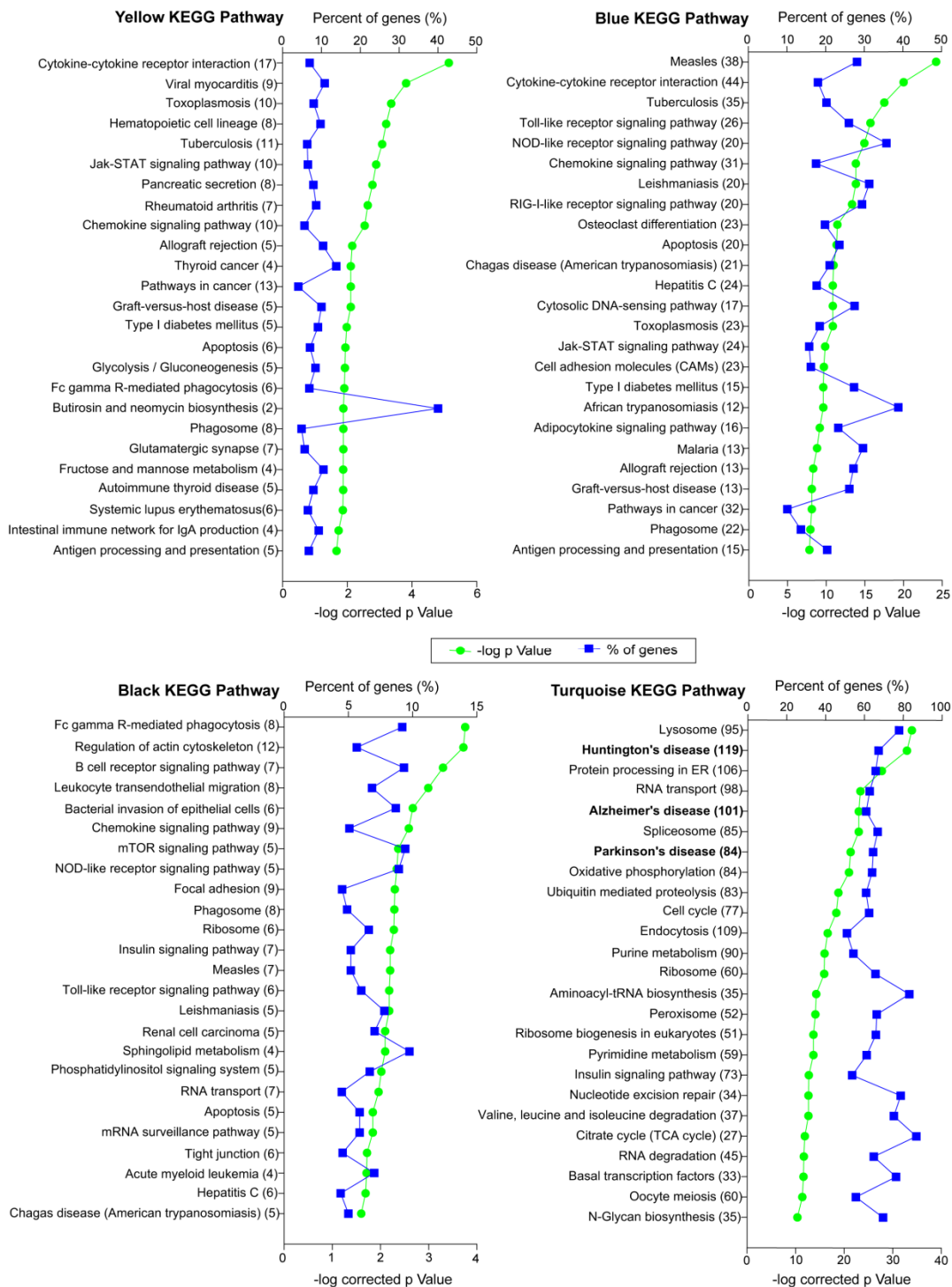


Figura 28. Representació de les 25 vies de KEGG més significatives dels mòduls groc, blau, negre i turquesa. A l'eix de les abscisses superior s'indica el percentatge que representen els gens detectats al present estudi dins del total de cada via, mentre que l'eix inferior mostra els valors del logaritme negatiu de la p. Finalment, les diferents vies, juntament amb el nombre de gens anotats a cadascuna d'elles, es presenten a l'eix d'ordenades.

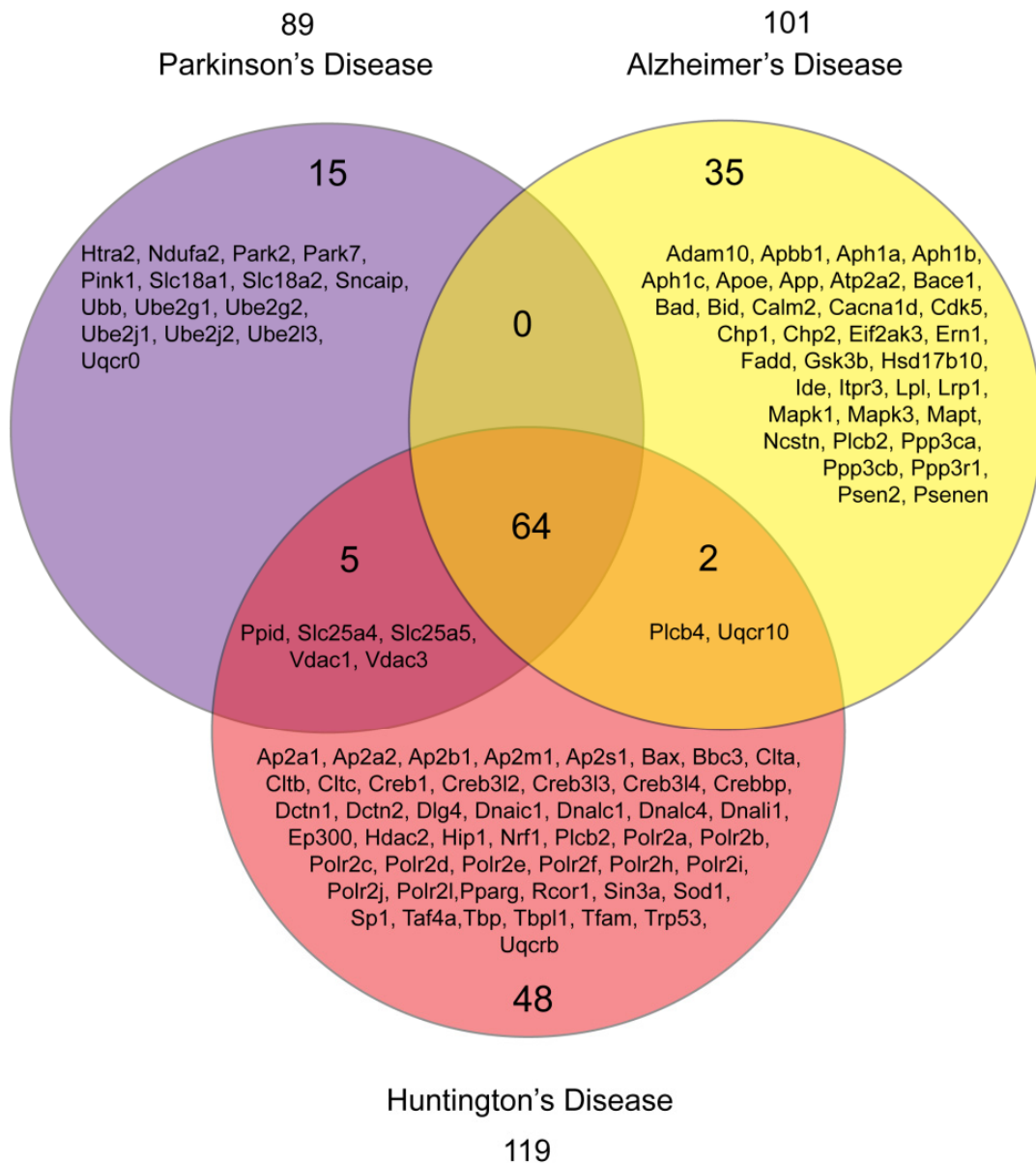
Dins dels gens comuns hi ha diferents membres de la família de les ATP sintases, de les citocrom c oxidases, de les NADH deshidrogenases, de les succinat deshidrogenases i de les ubiquinol citocrom c reductases. Tots aquests gens participen a la cadena respiratòria que té lloc a la mitocondria. Concretament, les NADH deshidrogenases, les succinat deshidrogenases, les citocrom c oxidases i les citocrom c reductases formen els complexos I, II, III i IV, respectivament, responsables de la cadena de transport d'electrons que empra l'energia obtinguda de l'oxidació del NADH i el succinat, productes del cicle de Krebs, per a reduir l'oxigen a aigua. Aquest procés genera un gradient de protons que permet la síntesi de l'ATP mitjançant les ATP sintases.

No obstant, tot i l'alta eficiència d'aquest procés, un petit percentatge d'electrons reacciona directament amb l'oxigen sense passar per la cadena, fet que provoca la síntesi d'espècies reactives d'oxigen implicades en la neurodegeneració. L'anotació d'aquests gens confirma la seva participació en aquests processos mitocondrials alhora que revela la importància de la funció (o disfunció) d'aquest orgànul a les tres malalties (Figura 30).

D'altra banda, en fer una ullada als gens específics de cada patologia, destaquen: Park2, Park7 i Pink1 a la malaltia de Parkinson, Adam10, Apoe, App, Bace1 i Psen2 a la d'Alzheimer i finalment Bax, Hdac2 i Sp1 a la patologia de Huntington.

A més, l'anàlisi dels termes de GO posa de manifest els diferents processos biològics que s'alteren en el cas de cadascuna de les malalties i que estan també afectats en estimular la micròglia primària amb LPS i LPS+IFN γ . Així, la ubiquitinació, els trastorns motors, la degradació mitocondrial i aquells processos relacionats amb el neurotransmissor dopamina estan relacionats amb la patogènia Parkinsoniana. En canvi, la via de *Notch*, el processament de proteïnes, l'apoptosi, el metabolisme de la proteïna β -amiloide i el catabolisme de la proteïna App són processos importants que tenen lloc a la malaltia d'Alzheimer. Finalment, les vies relacionades amb la transcripció i l'apoptosi resulten ésser afectades en el cas de la malaltia de Huntington.





All common

Atp5a1, Atp5b, Atp5c1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5g1, Atp5g2, Atp5g3, Atp5h, Atp5j, Atp5o, Casp3, Casp9, Cox4i1, Cox5a, Cox6a1, Cox6b2, Cox7a2l, Cox7b, Cox8a, Cyc1, Ndufa4, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa7, Ndufa8, Ndufa9, Ndufa10, Ndufa11, Ndufa12, Ndufa13, Ndufab1, Ndufb2, Ndufb3, Ndufb4, Ndufb5, Ndufb6, Ndufb7, Ndufb8, Ndufb9, Ndufb10, Ndufb11, Ndufc1, Ndufc2, Ndufs1, Ndufs2, Ndufs3, Ndufs5, Ndufs6, Ndufs7, Ndufs8, Ndufv1, Ndufv2, Ndufv3, Sdha, Sdhb, Sdhc, Uqcrb, Uqcrc1, Uqcrc2, Uqcrcs1, Uqcrh, Uqcrcq

Figura 29. Diagrama de Venn on es mostren els gens agrupats dins el mòdul turquesa que desenvolupen una funció a les malalties de Parkinson, Alzheimer i Huntington. Dins de cada cercle es representen aquells gens que participen a cadascuna de les patologies. Aquells gens comuns a més d'una malaltia es presenten a les zones on se solapen els corresponents cercles.

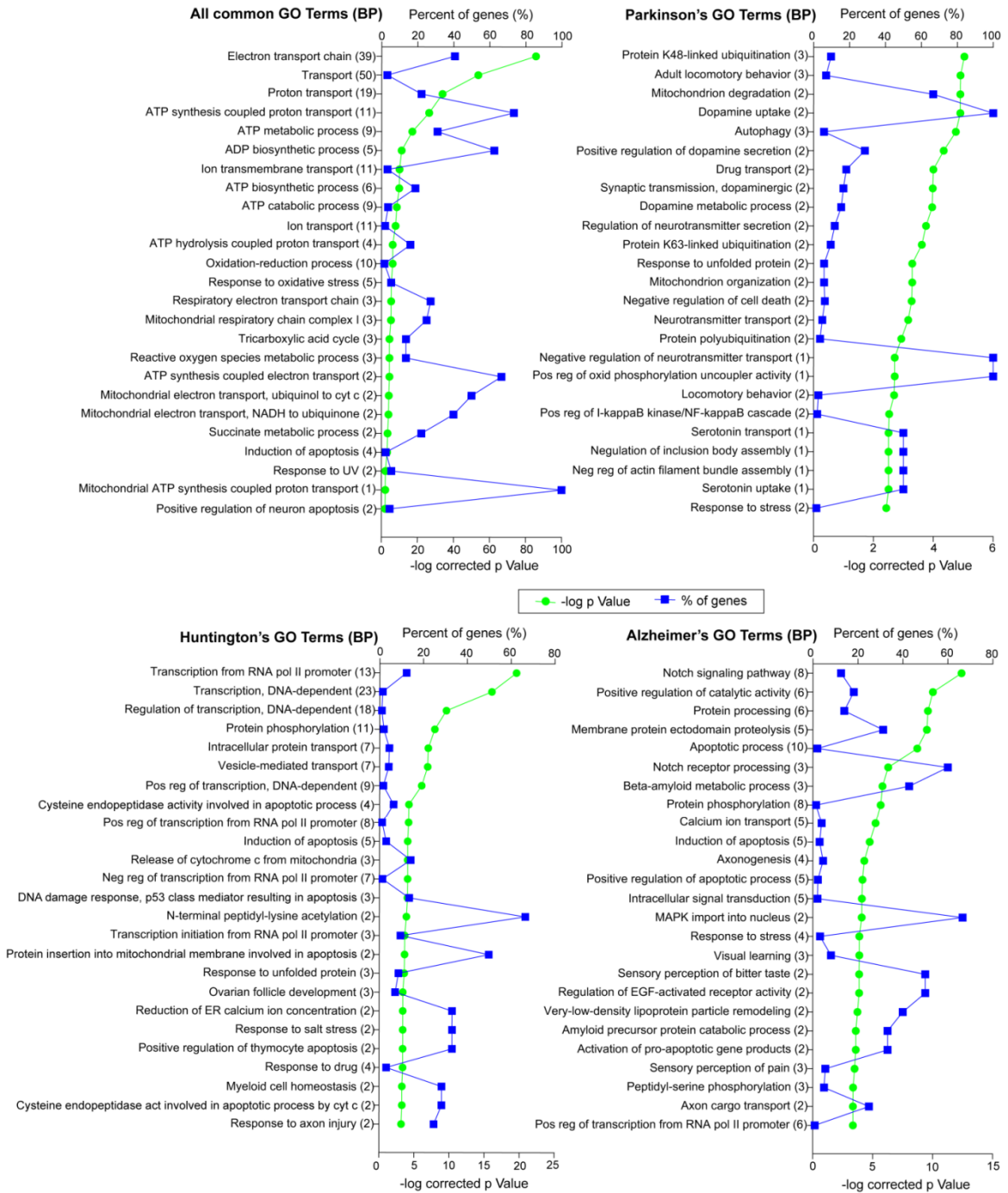


Figura 30. Representació dels 25 termes GO més significatius obtinguts en anotar els gens comuns a les tres malalties i els gens presents únicament a la malaltia de Parkinson, de Huntington i d'Alzheimer. A l'eix de les abscisses superior s'indica el percentatge que representen els gens detectats al present estudi dins del total de cada via, mentre que l'eix inferior mostra els valors del logaritme negatiu de la p. Finalment, les diferents vies, juntament amb el nombre de gens anotats a cadascuna d'elles, es presenten a l'eix d'ordenades.

4.2.3 Anàlisi dels gens expressats diferencialment a la micròglia C/EBP β ^{fl/fl} tractada amb LPS i LPS+IFN γ durant 6h.

Un cop estudiats els diferents patrons d'expressió que s'obtenen en tractar la micròglia primària amb LPS i LPS+IFN γ , s'ha procedit a analitzar mitjançant el programa DeSeq aquells gens detectats que presenten un canvi d'expressió significatiu en resposta als estímuls.

- **Efecte del LPS:**

Les dades obtingudes revelen el marcat canvi que indueix el LPS a l'expressió dels gens codificants, atès que el 37% d'aquests gens expressats a la micròglia primària mostren canvis significatius. En aquest cas, s'observa que aproximadament la meitat dels canvis (52,4%) corresponen a un augment de l'expressió, mentre que l'expressió del 47.6% dels gens es veu reduïda. A més, el nombre de gens (32) sense expressió basal, però que s'expressen en estimular la micròglia amb LPS és lleugerament superior al nombre dels gens (27) que deixen d'expressar-se per efecte de l'estímul. La resposta al tractament de la majoria de gens no codificants, també és traduïda en un percentatge més gran de gens sobreexpressats, sent els miARNs i els snoARNs l'exemple més clar, ja que en cap cas l'efecte del LPS es traduïa en una reducció dels seus nivells (Taula 4).

- **Efecte del LPS+IFN γ , acció diferencial de l'IFN γ :**

En analitzar els resultats obtinguts en resposta al tractament amb LPS+IFN γ , en línies generals, aquests no es diferencien molt, tant pel que fa a percentatge d'ARNs afectats com en la inducció o disminució de la seva expressió, d'aquells ja descrits pel LPS. No obstant, s'observa que el co-tractament no afecta els nivells dels ARNsno, contràriament a allò reportat en el cas del tractament amb el LPS (Taula 4).

Per la seva banda, l'estudi dels efectes del tractament LPS+IFN γ amb els del LPS revela que les diferències entre les dues situacions són sensiblement menors a les descrites en comparar els canvis induïts pels estímuls respecte a la condició basal.



Tot i això, al voltant de 1000 ARNs codificants veuen alterada la seva expressió a conseqüència de l'acció d'IFN γ . Aquest efecte tant pot ésser sinèrgic, induint una major expressió que el tractament amb LPS sol, o antagònic, reduint l'expressió induïda pel LPS, atès que el nombre de gens afectats en ambdós casos és molt semblant (Taula 4).

Els diagrames de Venn (Figura 31) també resulten ésser una eina molt útil per a avaluar globalment les semblances i diferències entre els canvis que es produeixen en activar la micròglia només amb el LPS o conjuntament amb l'IFN γ i les alteracions que s'observen en comparar les dues condicions d'activació.

En el cas dels gens codificants de proteïnes, en primer lloc s'aprecia que el tractament de la micròglia control només amb LPS indueix més canvis en l'expressió gènica (4684) que l'activació amb LPS+IFN γ (4397). No obstant, la gran majoria de gens alterats en resposta al LPS també canvien a causa del co-tractament, concretament 3011. Així, només 934 gens s'alteren únicament en estimular la micròglia amb LPS, mentre que 644 ho fan només davant l'estímul amb LPS+IFN γ . En canvi, l'estudi dels dos estats d'activació (LPS+IFN γ vs LPS) revela que dels 1086 gens alterats, només 80 canvien exclusivament en aquesta comparació. En canvi, l'expressió de 474 gens canvia tant en activar la micròglia amb qualsevol dels dos estímuls, com en comparar les diferències entre els efectes dels dos tractaments.

L'efecte de l'activació amb LPS també és més notable en el cas dels pseudogens i dels ARNnc llargs, on novament molts dels gens alterats també responen a l'estímul del LPS+IFN γ . El cas però, on les diferències entre els dos tractaments és menor és el dels miARNs. En aquestes mostres, només es detecten 6 miARNs expressats diferencialment en tractar la micròglia primària amb LPS o LPS+IFN γ . Tots 6 varien en activar les cèl·lules amb LPS+IFN γ i 5 s'alteren també en resposta al LPS. Contràriament al cas dels gens codificants, els pseudogens i els ARNnc llargs, cap miARN s'expressa diferencialment en comparar els dos tractaments.



	LPS vs Control					
	Upregulated		Downregulated		TOTAL	
	n	ON	n	OFF	n	%
Protein coding	2456	32	2169	27	4684	37%
Non coding RNAs						
Pseudogene	13	0	4	0	17	14%
Pseudogene polymorphic	1	0	0	0	1	33%
Pseudogene processed	19	0	3	1	23	16%
Pseudogene unprocessed	7	0	5	0	12	41%
lincRNA						
lincRNA	18	1	10	2	31	25%
Antisense	21	1	9	0	31	22%
Processed transcript	14	0	6	0	20	16%
Sense intronic	1	0	0	0	1	13%
miRNA	5	0	0	0	5	7%
snoRNA	5	0	0	0	5	6%
miscRNA	27	1	13	2	43	83%
Unknown	16	0	7	1	24	13%

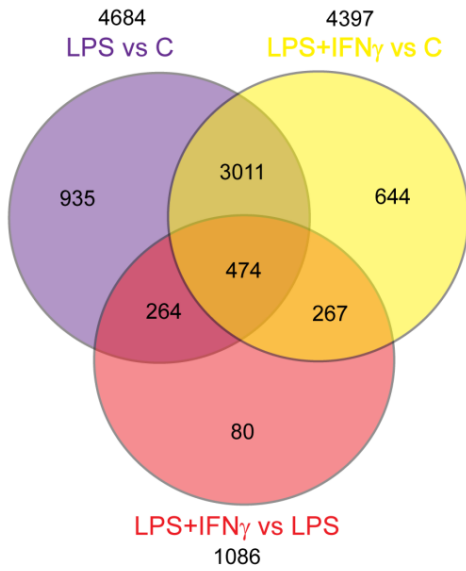
	LPS+IFN γ vs Control					
	Upregulated		Downregulated		TOTAL	
	n	ON	n	OFF	n	%
	2312	46	2021	18	4397	33.8%
	11	0	2	0	13	10.8%
	1	0	0	0	1	33.3%
	17	0	2	0	19	13.2%
	8	0	3	0	11	37.9%
	18	1	9	1	29	23.4%
	14	0	6	0	20	14.3%
	13	0	5	0	18	14.5%
	1	0	1	0	2	25.0%
	6	0	0	0	6	9.4%
	0	0	0	0	0	0.0%
	27	1	11	2	41	80.4%
	15	0	8	0	23	12.2%

	LPS+IFN γ vs LPS					
	Upregulated		Downregulated		TOTAL	
	n	ON	n	OFF	n	%
	532	1	549	3	1085	10%
	1	0	2	0	3	3%
	0	0	0	0	0	0%
	1	0	1	0	2	2%
	1	0	1	0	2	8%
	2	0	3	0	5	4%
	1	0	2	0	3	2%
	2	0	2	0	4	3%
	0	0	0	0	0	0%
	0	0	0	0	0	0%
	0	0	0	0	0	0%
	0	0	5	0	5	10%
	3	0	3	0	6	3%

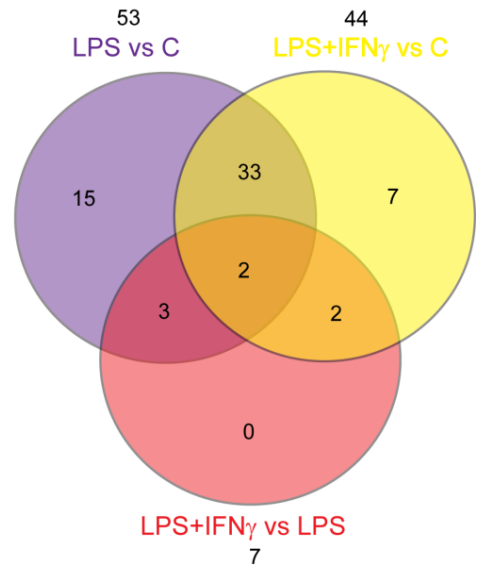
Taula 4. L'anàlisi de l'expressió diferencial del gens detectats revela que els tractaments amb LPS i LPS+IFN γ induïxen marcats canvis en l'expressió dels ARNs. Tot i certa tendència a l'augment dels nivells amb els tractaments, una part important dels gens experimenta una reducció de la seva expressió a la micròglia activada. A més, la comparació entre les dues situacions tractades, indica que tot i no ésser iguals, atesa la detecció de gens expressats diferencialment en comparar les dues situacions, les seves diferències són menors en comparació amb la condició basal. El nombre de gens ON/OFF no s'inclou dins el total de gens augmentats o disminuïts, mentre que el nombre total d'ARNs de cada tipus afectats els recull tots. El percentatge total indica el nombre de gens modificats respecte el total detectat a les mostres.



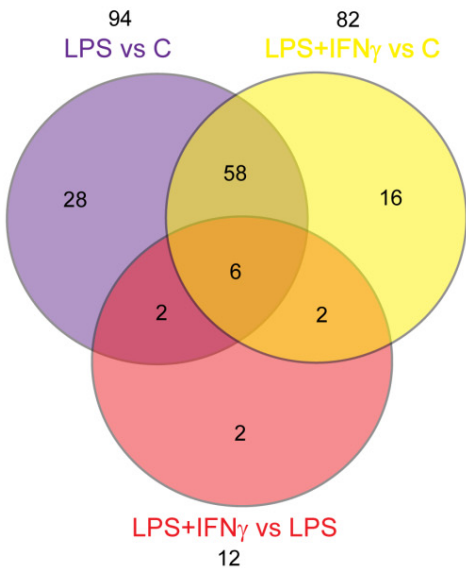
PROTEIN CODING RNAs



PSEUDOGENES



lncRNAs



miRNAs

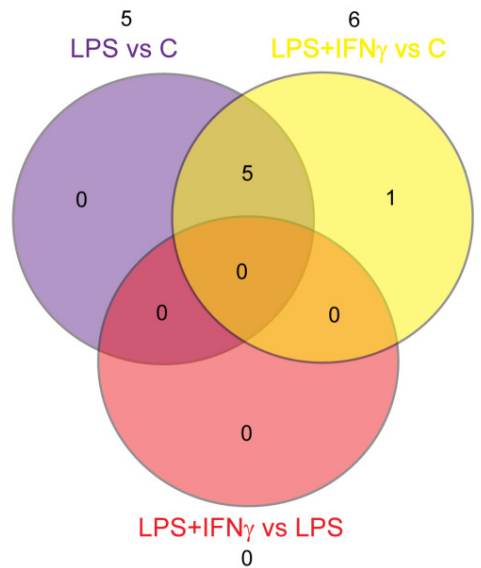


Figura 31. Diagrames de Venn on es mostra per a quatre espècies d'ARNs el nombre de gens afectats per l'activació amb LPS (lila) o LPS+IFN γ (groc) juntament amb aquells alterats en comparar les dues situacions activades (vermell). Aquells gens modificats a més d'una comparació es presenten a les zones on se solapen els corresponents cercles.

Amb l'objectiu d'estudiar el significat biològic d'aquests canvis, s'ha analitzat l'enriquiment dels termes GO dels ARN codificants per a proteïna.

En primer lloc, els 474 gens amb expressió diferencial en les tres comparacions: LPS enfront C, LPS+IFN γ enfront C i LPS+IFN γ enfront LPS (Figura 32) resulten estar involucrats de forma prominent en la resposta immune, atès que set dels deu GO més significatius hi tenen relació (Figura 32 panell superior esquerre). Aquest resultat no és sorprenent si es considera el paper de la micròglia com a cèl·lula immune del SNC i l'estimulació proinflamatòria del LPS i l'IFN γ .

Per la seva banda, l'estudi de la funció biològica dels gens diferencialment expressats exclusivament a LPS enfront C o bé LPS+IFN γ enfront C també resulta interessant, atès que els resultats dibuixen un perfil d'activació microglial diferent per als dos tractaments. Així, mentre que en ambdós casos els processos biològics més afectats estan relacionats amb la transcripció, els gens alterats en cada cas són diferents. Per exemple, l'expressió d'Atf1, C/EBP δ i Myc tres factors de transcripció involucrats en la proliferació i l'apoptosi cel·lular s'altera únicament en activar la micròglia amb LPS, mentre que Hdac9, Sirt1 i Jmjd6 involucrats en la modificació de les histones canvien només en resposta al LPS+IFN γ . Curiosament, l'apoptosi i la modificació de la cromatina són dos dels processos més alterats juntament amb la transcripció gènica en presència del LPS i el LPS+IFN γ respectivament.

Finalment, la implicació dels 80 gens afectats únicament a la comparació entre els dos tractaments en processos biològics molt dispars ha impedit obtenir una anàlisi dels termes de GO significatiu. Per tant, aquestes dades no ens permeten inferir les implicacions biològiques d'aquesta expressió gènica diferencial.

L'anàlisi funcional dels altres tres tipus d'ARNs tampoc ha aportat resultats concluints, molt probablement a causa de la poca informació de què es disposa actualment sobre el paper dels transcrits no codificants.



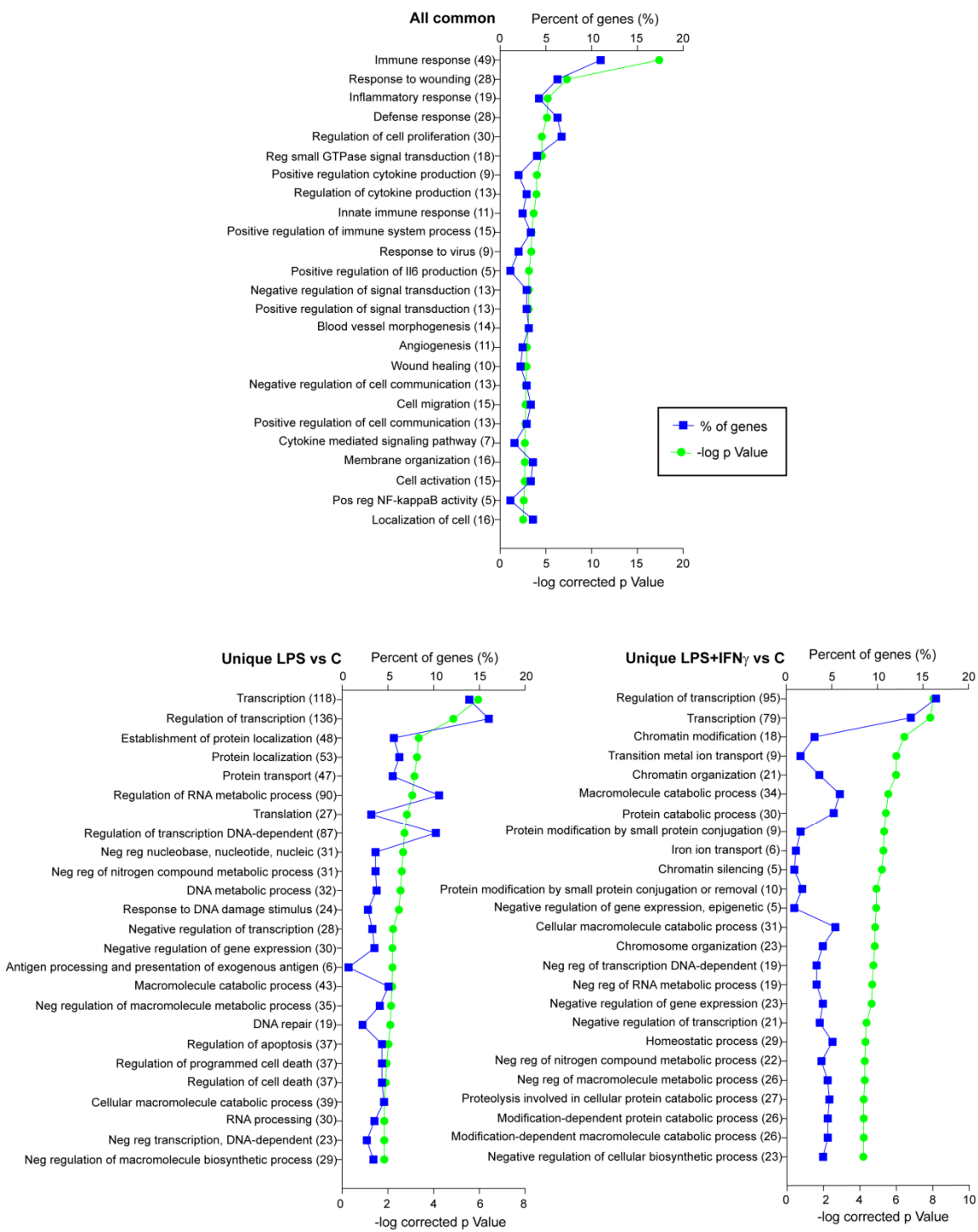


Figura 32. Representació dels 25 termes GO més significatius obtinguts en anotar els gens comuns a les tres comparacions i els gens presents únicament a LPS respecte control, LPS+IFN γ respecte control i LPS+IFN γ respecte LPS. A l'eix de les abscisses superior s'indica el percentatge que representen els gens detectats al present estudi dins del total de cada via, mentre que l'eix inferior mostra els valors del logaritme negatiu de la p. Finalment, les diferents vies, juntament amb el nombre de gens anotats a cadascuna d'elles, es presenten a l'eix d'ordenades.

Una llista dels 50 gens que presenten una major pujada (o “encesa”) o una baixada (o “apagada”) de la seva expressió a conseqüència dels tractaments es troba a les taules 5 i 6.

En aquestes taules, tot gen remarcat en blau mostra una afectació per efecte d’ambdós tractaments respecte el control. Una dada a destacar és el fet que la major coincidència entre gens modificats per LPS i LPS+IFN γ es troba en analitzar els gens activats pels estímuls. De fet, només 30 gens s’encenen com a resposta al LPS+IFN γ i tots mostren aquest mateix patró d’expressió enfront només del LPS (Taula 5). Alguns canvis que es poden observar, com ara la inducció de NOS2 i IL-6 o la reducció de C/EBP α com a conseqüència dels tractaments, ja han estat descrits prèviament pel grup (Ejarque-Ortiz et al, 2007b) (Straccia et al, 2011) fet que permet validar els resultats aquí presentats.

Una altra informació que s’obté d’aquesta classificació és la identitat dels gens induïts o atenuats en comparar els dos estat d’activació. Així, l’expressió del factor de transcripció Irf8 induïda pel LPS es veu potenciada en estimular la micròglia amb al LPS+IFN γ , contràriament a allò observat en el cas de les interleucines IL-23a i IL-10, els receptors de membrana Tlr2 i Tlr13, les citocines Csf2 i Csf3 i les quimiocines Ccl4 i Cxcl2. La implicació de tots aquests gens en la resposta inflamatòria indica que els canvis més importants d’expressió que s’observen en comparar aquests dos estímuls tenen relació amb aquest procés biològic.

Finalment, s’observa que gens no codificants de proteïnes (subratllats a les taules 5 i 6), com ara mir-155, implicat en l’activació glial, també presenten canvis importants en resposta als estímuls. Malauradament, tot i l’excepció de emir-155, tal i com ja s’ha comentat, poques són les funcions conegudes dels ARN no codificants, fet que dificulta establir la rellevància biològica d’aquestes observacions.



	By LPS (vs Control)	By LPS+IFN γ (vs Control)	By LPS+IFN γ (vs LPS)
ON	Cxcl11 , Gm20115 , Apol7c , Il2ra , Ildr1 , Gm3636 , Gm3667 , Gja4 , 4933416M07Rik , Faah , 2610042L04Rik , Alpk2 , Gm3739 , Pax4 , Gm3248 , Orm1 , Apol6 , Hrc , Ubd , Pacsin1 , Gm5796 , Ttc36 , Rnase10 , Sele , Ido1 , Il23a , Sell , Tnfsf4 , Nt5c1a , Smtnl1 , Il12a , Gm3591 , Aplnr , Adgrf3 , Il23r , Prkcq , Slc25a21 , Rtn4r , Sectm1a , Gm19263 , 4933403O08Rik , Gm3252 , Lta , Cnksr1 , Fgf23 , Havcr1 , Gpr33 , Oprd1	Cxcl11 , 4933416M07Rik , Hrc , Il2ra , Gm20115 , Il23a , Apol7c , Gm5796 , Gm3636 , Gm3667 , Sele , 2610042L04Rik , Orm1 , Alpk2 , Rnase10 , Il12a , Fgf23 , Ttc36 , Il23r , Oprd1 , Faah , Gm3739 , Gja4 , Lta , Sell , Gm19263 , Apol6 , Aplnr , Smtnl1 , Tnfsf4	Ism2, Clec9a, Rnase6
Upregulated	Nos2 , Cxcl9 , Serpina3f , Upp1 , Serpina3g , Mmp25 , Cd40 , Il6 , Mmp13 , Il12b , Cxcl10 , Gbp4 , Mab2113 , Irg1 , Il27 , Clic5 , Tarm1 , Slamf7 , Gbp2 , Gbp2b , Gbp5 , Tnf , Traf1 , AA467197 , BC023105 , Ccr7 , Mir155 , Il1a , Tgtp1 , Hdc , Ccl22 , Ilgp1 , Slamf1 , Il1rn , Il12rb1 , Lad1 , Il18rap , Timd4 , Gpr132 , Asap3 , Pou3f1 , Slc7a2 , Ifnb1 , Cd69 , Lck , Ch25h , Adora2a , Procr , Slamf8 , Ifi205	Il6 , Nos2 , Cxcl10 , Tnf , Cd40 , Il12b , Hdc , Mmp13 , Traf1 , Irg1 , Serpina3f , Ifnb1 , Il1a , Il27 , Tarm1 , Cd69 , Ccl4 , Csf3 , Cxcl2 , Ch25h , Gbp5 , Mir155 , Lad1 , Adora2a , Cxcl9 , Serpina3g , Ccl3 , Clic5 , Adamts4 , H2-M2 , Upp1 , Clec4e , Shisa3 , Cxcl1 , Ifi205 , Ccl22 , Cmpk2 , Ccl5 , Rsad2 , Gbp2 , Lipg , Lhx2 , Heatr9 , Slamf7 , Slc7a2 , Mmp25 , Dusp2 , Ccr7 , AW112010 , Ido2	Cd207, Bcl2l14, Ubd, Cacnb4, Gm4392, Slc44a3, P2rx5, Ptger4, Cytip, Slc22a15, Lck, B3gnt7, Ildr1, Cxcl9, Ccdc64b, Slc39a2, Gm19562, Rgs9, Upp1, Pdgfc, Pgm2l1, Tubb3, Cish, Wdr62, Gbp2b, Ly6a, Irf8, Gpr132, Il12rb1, Mmp25, Klhl6, 4930523C07Rik, Zfp961, Nlrp1c-ps, Tmem173, F830016B08Rik, Mab2113, Ciita, Il18rap, Bst1, Taf4b, Fcgr3, Gm20031, Plagl1, EphA1, Ocln, BC068281, Smagp, Armcx6, Laptm4b

Taula 5. Es mostren els 50 gens que experimenten un major augment (o “s’encenen”) dels seus nivells d’expressió en comparar la situació LPS respecte la C, el tractament amb LPS+IFN γ contra la situació C i els dos tractaments. Aquells gens remarcats en blau són comuns a les dues primeres columnes. Els gens subratllats són ARNs no codificants. Els gens es presenten en ordre decreixent de significància.



	By LPS (vs Control)	By LPS+IFN γ (vs Control)	By LPS+IFN γ (vs LPS)
OFF	Zfyve28, BC106179 , Gm19424 , Frat1, Fam195a, Armc2, Shpk, Neil2 , Gm3604, C030034L19Rik, Enho, Zfp791, Mblac1, Cmtm8, Cyb5rl, Asb10 , 5930430L01Rik, Them6, Gper1, Tmem204, Rwdd2a	Rtn4rl1, BC106179 , Gm19424 , Tmem144, Tfap4, Gm14461 , Tmem150b, Trem11, Neil2 , Asb10	Gm5132 (there is only 1 gene in this class)
Downregulated	Abhd15, 1810011H11Rik, Rab3il1 , Rtn4rl1, Abi3 , Bmf , Slco2b1 , 3222401L13Rik, Cebpa , Arhgap19 , Zdhhc14 , Igf1it , Nat8l , Cx3cr1, Engase , Cd300lb, Slc40a1 , C130050O18Rik , Fam105a, Wscd1, Tmem86a, Depdc7 , Tfap4, Dnajc28 , B3galt5, St6gal1 , 4833423F13Rik , CerK, Nxpe5, A730017L22Rik , 1810011O10Rik, Slc43a2, BC052040 , Lpar5 , Lpin1 , Gins3, Acad12 , LOC100502705 , Pparg, Cd300a, Rasgrp3, Deptor, Gm4980, B3gnt8 , Rslcan18, Rnf144b, Tmem8b, Eef2k, Cracr2b, Pank1	Arhgap19 , Igf1it , Slco2b1 , C130050O18Rik , Lpin1 , Dnajc28 , Cep131, Engase , Zfyve28, Lpar5 , Rab3il1 , Acad12 , Traf3ip3, Depdc7 , Cxcr4, 4833423F13Rik , Bmf , B3gnt8 , Pcdhga1, Cnr2, Zdhhc14 , Nat8l , Chek2, Fam217b, Abi3 , Cebpa , 2610507I01Rik , Ypel2, Gm14403, Slc7a15, St6gal1 , Abcg3, Arvcf, Slc40a1 , Zfp661, Zfp395, Tmem37, lpp, CCDC166, Bcl7a, Gm20263 , BC052040 , A430033K04Rik, Zbtb16, Arrdc3, Slc26a11, 6430548M08Rik, Klc4, Armc2, Oscp1	Il10, Ifit1b11, 1810011H11Rik, Csf2, Sla, 100862308, Shisa3, Il23a, Rgag4, Magohb, Cd55, Pla2g4c, Acp5, A530064D06Rik, Ptpu, Cdk20, D8Ert82e, Adamts4, Cxcl2, Ifitm7, Spic, Adgrl2, Tlr2, Nr4a1, Slc28a2, Arhgef10l, Ccl4, A930003A15Rik, Pigz, Csf3, H2-M2, Rrad, Abcb4, Slamf9, Calcr1, Asb2, Tlr13, Nxpe3, Dock8, Lrp4, Lrrc18, Prickle1, Ifit1b12, Rps6ka5, Rilpl1, Icosl, Adam33, Fabp4, Itgb8, Atp2b4

Taula 6. Es mostren els 50 gens que experimenten una major reducció (o apagada) dels seus nivells d'expressió en comparar la situació LPS respecte la C, el tractament amb LPS+IFN γ contra la situació C i els dos tractaments. Aquells gens remarcats en blau són comuns a les dues primeres columnes. Els gens subratllats són ARNs no codificants. Els gens es presenten en ordre decreixent de significància.



4.2.4 Canvis a l'expressió gènica de la micròglia primària en absència de C/EBP β :

Les dades reportades per la seqüenciació de l'ARN mostren la gran quantitat de canvis en l'expressió gènica que es produeixen durant l'activació de la micròglia. Aquest procés però requereix d'una acurada regulació de la transcripció gènica. Així, amb l'objectiu d'estudiar el paper de C/EBP β en la resposta microglial enfront el tractament amb LPS o LPS+IFN γ s'ha analitzat el perfil transcriptòmic de la micròglia primària C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tant en condicions basals com en presència dels dos estímuls.

L'anàlisi no supervisada de les mostres seqüenciades en primer lloc mostra un perfil transcriptòmic afectat pels tractaments, ja que les mostres no tractades queden agrupades i separades clarament d'aquelles que sí ho han estat. Una altra dada interessant d'aquest primer resultat és l'efecte del genotip que s'observa a les situacions LPS i LPS+IFN γ . Així, mentre a la micròglia no activada no s'observa un agrupament diferenciat de les mostres, en el cas d'ambdós tractaments les branques del dendrograma mostren una clara divisió segons el genotip de la micròglia. Aquest fet, suggereix un paper de C/EBP β en la regulació dels canvis transcripcionals que es produeixen durant la resposta microglial a aquests dos estímuls clàssicament proinflamatoris, però no en condicions basals (Figura 33).

Dels 15228 gens detectats a la micròglia primària, l'absència de C/EBP β afecta l'expressió de 1068, és a dir un 10% dels 10888 gens expressats diferencialment (Figura 33B, el·lipsi vermella). Dins d'aquests 1068 gens, els nivells de 201 s'alteren únicament per efecte del genotip, mentre que l'expressió de 58 i 63 gens canvia només en activar la micròglia amb LPS i LPS+IFN γ , respectivament. A més, la comparació entre els dos estats d'activació mostra l'alteració de 12 gens exclusivament en aquesta situació. No obstant, la major part dels canvis en l'expressió gènica que es produeixen en resposta al tractament són comuns. Així, els nivells de 421 gens varien tant en activar la micròglia amb LPS com amb LPS+IFN γ , mentre que l'alteració de l'expressió de 149 gens és comuna a totes les comparacions (Figura 33 B).



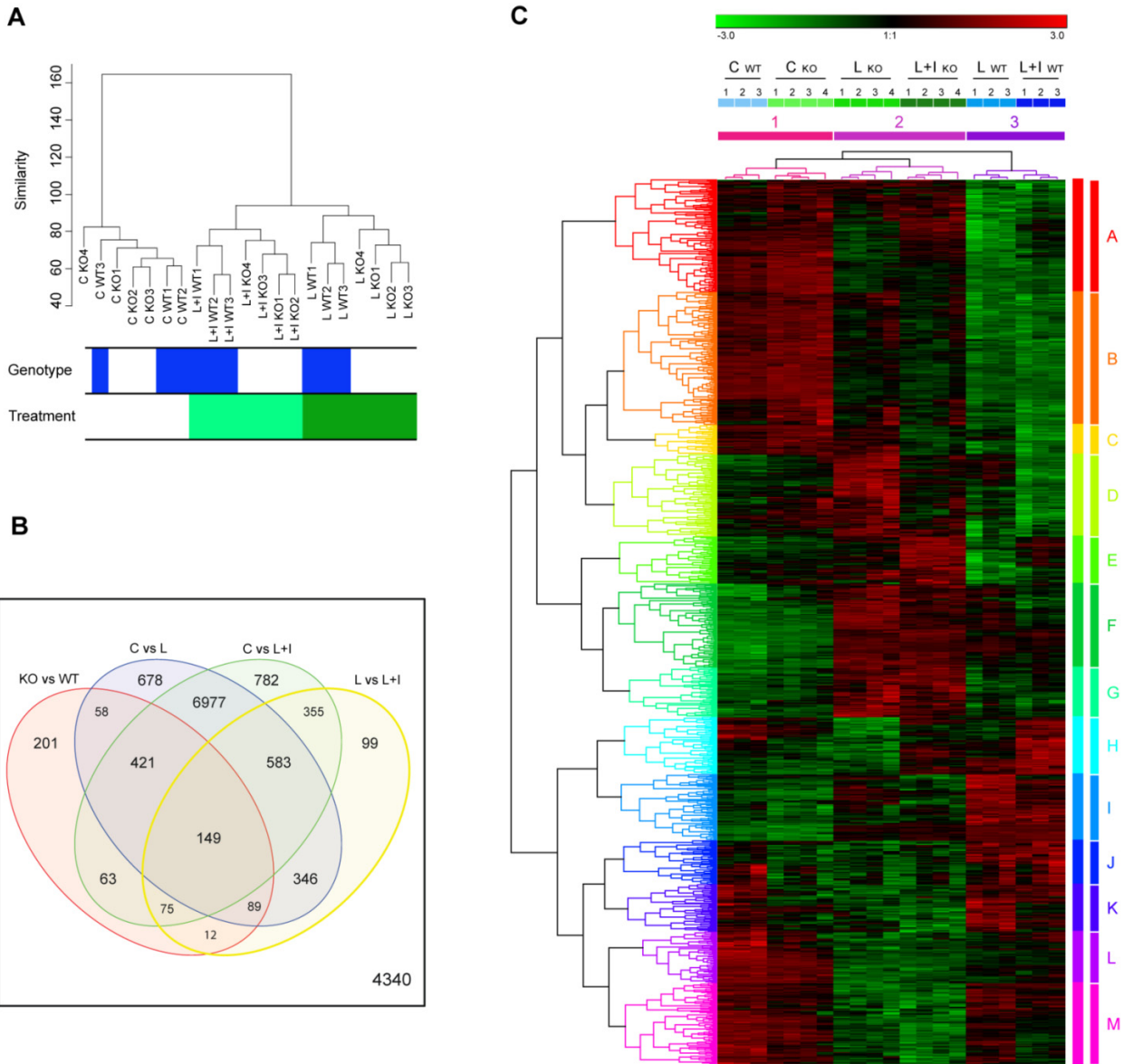


Figura 33. A. Dendrograma on es mostra l'agrupament de les mostres analitzades per ARN-Seq. S'observa una clara separació entre les mostres tractades i no tractades. A més, dins de cada grup activat les mostres s'agrupen diferencialment segons els seu genotip WT ($C/EBP\beta^{fl/fl}$) o KO ($LysMCre-C/EBP\beta^{fl/fl}$). B. Dels 15288 gens detectats a la micròglia primària, 10888 presenten una expressió diferencial. L'el·lipse vermella del diagrama de Venn mostra l'efecte del genotip sobre els nivells de 1068 d'aquests gens. C. La representació del perfil transcriptòmic dels 1068 gens mostra l'agrupació de les mostres en tres subgrups (1-3), on novament la delecció de $C/EBP\beta$ es fa evident en estimular la micròglia, mentre que els 1068 gens s'agrupen segons el seu patró d'expressió en 13 clústers (A-M). El color verd indica una disminució dels nivells respecte la mitjana d'expressió normalitzada de cada gen, mentre que la inducció es mostra en vermell.

Es defineix com a *heatmap* la representació gràfica de les dades obtingudes on els valors individuals de cada mostra es representen emprant un codi de colors. Així, la visualització del perfil transcriptòmic dels 1068 gens afectats pel genotip mostra que l'efecte de la deleció de C/EBP β sobre la seva expressió no és homogeni, ja que l'agrupament no supervisat dels gens permet identificar 13 patrons diferents (Figura 33 C, grups A-M). A més, l'agrupament de les mostres revela novament la separació entre les mostres activades amb expressió de C/EBP β (WT) i aquelles on el factor de transcripció ha estat eliminat (KO). En aquest cas però, s'observa una major semblança entre la micròglia activada genoanul·lada i les cèl·lules microglijals no estimulades d'ambdós genotips (Figura 33, grups 1-3). A més, també es pot apreciar l'agrupament diferenciat entre les mostres no tractades segons el seu genotip, fet que suggereix un paper de C/EBP β a la micròglia no activada

L'observació detallada dels diferents clústers que agrupen els gens segons l'alteració del seu patró d'expressió provocada per l'absència de C/EBP β i el tractament amb LPS i LPS+IFN γ permet distingir un primer bloc de gens, agrupats als clústers A, B i C, on els estímuls redueixen la seva expressió. No obstant però, la deleció del factor de transcripció atenua aquesta disminució. D'entre aquests 332 productes gènics, pel seu important paper a la micròglia destaca el receptor de la fractalquina CX3CR1 (Figura 34, clúster B).

Per la seva banda els 99 gens agrupats al mòdul D veuen més reduïda la seva expressió per efecte del cotractament que en presència del LPS sol en el cas de la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ (WT). No obstant, el tractament amb LPS augmenta notablement l'expressió gènica en el cas de les cèl·lules microglijals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ (KO). En canvi, al clúster E els nivells dels 57 gens en la condició no activada es redueixen sensiblement en estimular la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ amb LPS i s'indueixen significativament en resposta al LPS+IFN γ en el cas del genotip LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Dins d'aquest grup destaquen el factor de transcripció induïble per l'IFN γ , Irf8, i el receptor involucrat en la resposta immune innata, Tlr9.



Als gens 101 del mòdul F experimenten un increment de l'expressió gènica en resposta als estímuls proinflamatoris. A més, aquest augment és més significatiu en absència de C/EBP β . Un efecte semblant s'aprecia en el cas dels 60 gens agrupats al clúster G. Dos gens de la família dels receptors de tipus *Toll* involucrats en la resposta cel·lular al LPS com Tlr1 (F) i Tlr7 (G) es troben entre els gens classificats dins d'aquests mòduls.

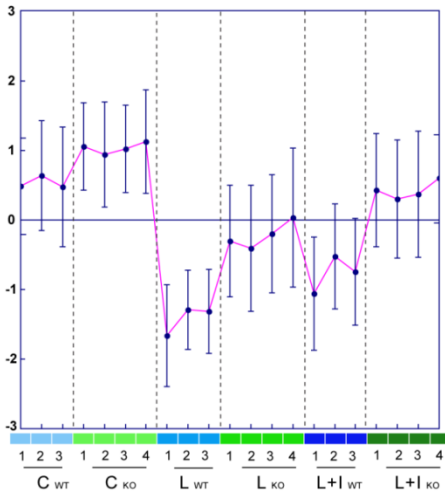
Contràriament, als 69 i 80 gens dels mòduls H i I l'augment dels nivells d'expressió en estimular la micròglia amb LPS+IFN γ o només amb LPS, respectivament, és clarament major a la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$, i és sobretot al clúster I on destaquen gens proinflamatoris com Csf3, Cybb, IL-1 α , IL-23a i Ptgs2 (COX2).

L'expressió dels 53 i 58 gens inclosos dins dels mòduls J i K, en canvi, no s'altera en resposta als tractaments, però tant en condicions basals com en presència dels estímuls pro-inflamatòris els nivells observats a la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ són sensiblement inferiors als del genotip C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Així doncs, dins d'aquests mòduls s'agrupen gens amb un marcat efecte de la deleció de C/EBP β sobre la seva expressió independentment de l'estat d'activació microglial. De fet, el propi factor de transcripció es localitza dins del mòdul K.

Finalment, dins dels clústers L i M s'agrupen 62 i 98 gens, respectivament, on els nivells d'expressió disminueixen en resposta als estímuls, sent la reducció més marcada en el cas de la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. CSF-1R es troba dins el clúster L, mentre que Tlr8, un altre membre de la família de receptors de tipus *Toll*, destaca dins el mòdul M.



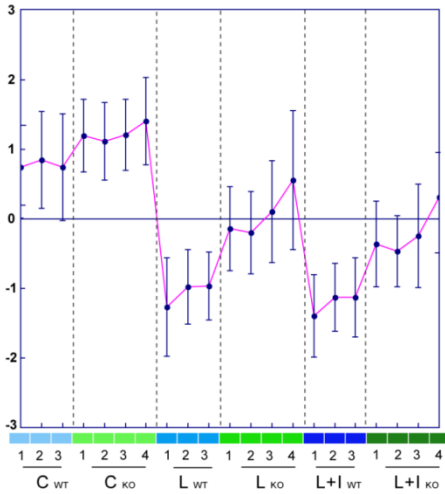
Cluster A



136 Genes

4632427E13Rik, 4632428N05Rik, 4930404N11Rik, 4930506M07Rik, Aars, Acot11, Acss1, Adap1, Ap1g2, Ap1s2, Ap3m2, Arhgap12, Arpc4, Atp6v0a1, Atp6v0b, Atp8a1, Aup1, Batf3, C1qa, C1qc, C2cd3, Calm1, Cd34, Cd48, Cdk5rap2, Cdkn2a, Cep70, Cfl1, Clk1, Coro7, Ctsa, D6Mm5e, D930015E06Rik, Dhx9, Dnase2a, Dock2, Dok1, Eif2c1, Elmo1, Evi2b, F630110N24Rik, Fam102a, Fam117b, Fbxl20, Fcgrt, Fgd2, Fmn11, Gatm, Gm13710, Gm19816, Gng2, Gppb111, Gusb, Heatr5a, Herpud1, Hfe, Inpp4b, Kif13b, Laptm5, Lars, Lime1, Lipt2, Lrrfp1, Lyst, Man2b1, Mbd5, Mbnl1, Med17, Mif4gd, Mycbp, Myo5a, N4bp211, Naga, Ncdn, Nit2, Orai3, Os9, Ostf1, Oxct1, Papd4, Pcmt1, Pex13, Pfn1, Pgap2, Pias1, Pld4, Plxn3, Polb, Ptplb, Ptpn6, Pycard, Rab5b, Rab711, Rbm26, Rbmx, Recql5, Rnase6, Rp2h, Sdf4, Selplg, Sept6, Setd3, Sft2d2, Sh3bgrl3, Siglec5, Sirt7, Skap2, Slc25a19, Slc25a45, Slc39a8, Slc9a7, Speg, Srp14, St8sia6, Sun2, Suv39h1, Tagap1, Tceb3, Tle1, Trpv2, Tsku, Twf2, Txnip, Ube3a, Usp22, Usp8, Vipar, Wdr1, Wdr41, Wdr82, Wrn, Xpo1, Zgpat, Zmiz2, Zmym1, Zscan29

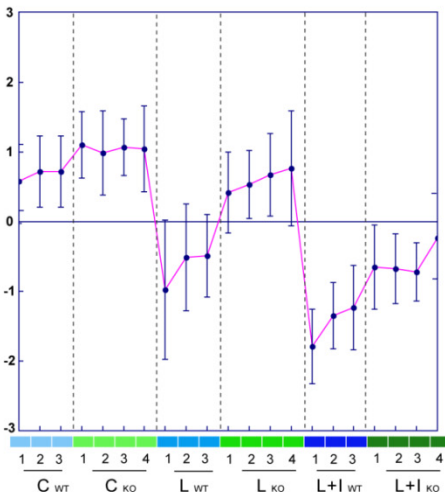
Cluster B



160 Genes

D610012G03Rik, 1110003E01Rik, 1110054O05Rik, 2810008D09Rik, 4930471M23Rik, A2ld1, AA987161, Abcd1, Abhd12, Agpat3, Aif1, Akap10, Amd1, Ankdhd1, Arhgap27, Arhgap30, Arhgap4, Arhgef6, Arsb, Asph, Asxl1, Asxl2, Ate1, Atmin, Atp2b1, B3galnt1, Baz1b, Bbc3, BC003331, Calcoco1, Calm3, Camk1, Camk2d, Camkk1, Cbara1, Cd5l, Cdk19, Celf2, Chek2, Chst7, Ciao1, Clec4a2, Clec4a3, Coil, Cotl1, Ctss, Cx3cr1, Dcxa, Dhx35, Dram2, Ech1, Emr1, Epb4.1, Exoc4, Fam116a, Fam195a, Fcrl1, Fcrl5, Fcrls, Fem1a, Fip111, Foxj3, Gab3, Galnt7, Gcfc1, Glud1, Gm19959, Gmpr2, Gns, Gpcpd1, Gpd1l, Gpr137b, Gpr137b-ps, Gpr157, Gps2, Grn, Hexa, Hexb, Hsd17b4, Ids, Idua, Kdm6a, Kihdc8b, Lactb, Lgmn, Limd2, Lrrc33, Luc71, Ly86, Mfsd11, Mogs, Mrpl45, Ms4a14, Nav1, Nrm, Ogt, Ophn1, Pak1, Pank2, Pgg1b, Phf12, Phka2, Pikfyve, Plbd2, Plcg2, Plin3, Plxnc1, Pnpla8, Ppp3r1, Ppp5c, Prkab2, Prkacb, Prkcb, Ptplad1, Pygb, Rbm14, Rbm45, Rcc2, Rsad1, Sacm1l, Sat1, Scaper, Sec11c, Sec14l1, Serinc3, Sf3b2, Sh3bp1, Slc12a2, Slc12a9, Slc13a3, Slc15a4, Slc25a10, Slc37a2, Specc1l, Spns3, Ssh3, St13, Sumo3, Supt7l, Tal1, Tbc1d9, Tgfb2, Thyn1, Tm9sf2, Tmem176a, Tmem176b, Tnfaip8, Trim33, Trpm2, Trpm7, Tubb2a, U2af114, Ube2g2, Unc93b1, Vav2, Vps33a, Vps41, Ythdf2, Zfml, Zfp619

Cluster C

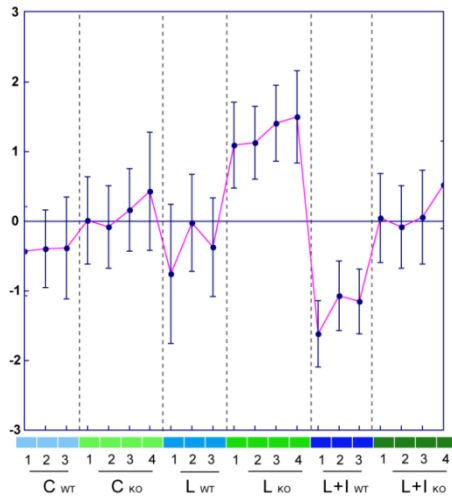


36 Genes

100862024, Acad9, Adrbk1, Ankrd44, Asap1, Asb2, Blnk, Cd72, Clec4a4, Dock8, Fam175b, Fam53b, Foxn3, G3bp1, Gm8894, Herc2, Ints4, Itsn2, Ms4a7, Ndufs2, Necap1, Nocs3, P2ry6, Pes1, Pik3r1, Pspc1, Rhob, Rpl711, Sbf2, Sla, Spns2, Srsf2, Srsf6, Supv311, Tsen54, Wdr81



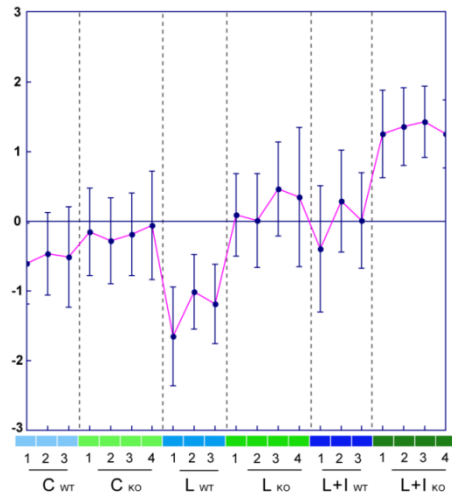
Cluster D



99 Genes

1700099109Rik, A930003A15Rik, Actr3, Ahcy1, Alkbh1, Ap1s1, Appl1, Arhgap26, Arid3b, Arpc5, At13, Atp5a1, Azin1, Bcl3, Bpgm, C3ar1, Cd180, Cdc27, Cdk12, Cdk17, Cep110, Chd6, Clec12a, Clec2g, Cox5a, Cry1, Cspg5, Ctnna1, Dirc2, Dnm1l, Etv3, F9, Fchs2, Frmd4b, Glpr1, Gm11974, Gm15987, Gm20269, Gramd1a, Grif1, Igfbp1, Igfbp4, Ikbkb, Ip6k3, Kctd12, Kdm4a, Keap1, Kif5c, Lcp1, Limd1, Lrrc41, Lst1, Marcks, Mecr, Mfsd7c, Mrpl3, Mtor, Napepld, Nmd3, Nop2, Nup153, Nup54, P2rx1, Pde12, Phf21a, Phospho2, Pigc, Pigz, Pik3r5, Poglut1, Pou6f1, Ppfbp2, Rac2, Rapgef5, Rasal2, Rcsd1, Rgag4, Rtn1, Sel1l, Senp6, Serp1, Sh3bp5, Sik1, Slamf9, Slc38a2, Smap2, Smu1, Snx2, Stard7, Stk4, Tbc1d2b, Tcerg1, Tle4, Tmem123, Tmem127, Tufm, Usp21, Zbtb10, Zdhhc13

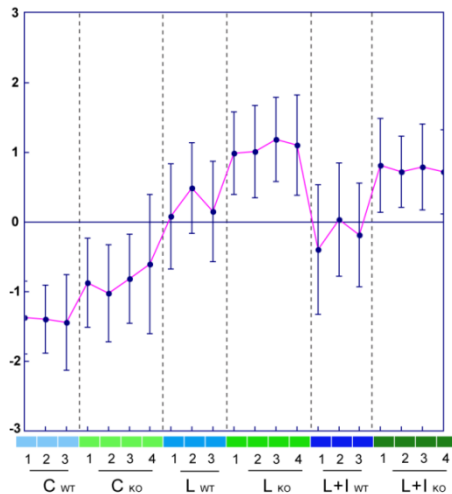
Cluster E



57 Genes

1700020003Rik, Abcg1, Actg1, Ahsa1, Ankrd12, Arfrp1, Arpc2, Atg16l1, Atp6v1d, Atp7a, B4galt3, Baz2b, BC013712, Bcl2, Btla, Cand1, Cdkn2b, Clec9a, Cmtm7, Cpne8, Creb3, Ddx19b, Dip2b, Eno4, Fcgr4, Gfpt1, Igf2bp3, Irf8, Kcnd1, Kdm5c, Mdm4, Mkl1, Ncoa7, Nsun4, Pgm2l1, Pold3, Pusp10, Rab43, Rippl2, Rpgr, Sh3bgrt, Ssb, Tbc1d10b, Tbc1d23, Tgs1, Tlr9, Tmem168, Tmem194, Tmem223, Tmem68, Tmem70, Tnik, Trim35, Trim55, Ube2w, Zfhx2, Zfp617

Cluster F

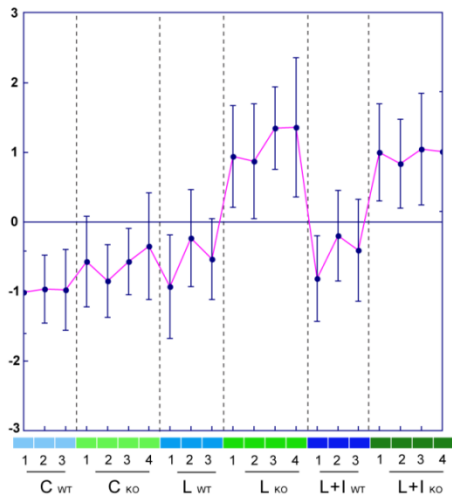


101 Genes

4933437N03Rik, A430093F15Rik, A630001G21Rik, A1504432, A1848100, Akap13, Akna, Astl, Atf3, Batf, BC006779, Bcl2a1a, BE692007, Birc3, Carhsp1, Ccdc41, Ccdc50, Cd52, Cd69, Cept1, Coro2a, D730005E14Rik, Dnajc2, Ebi3, Fam129a, Fbxw11, Fcer1g, Fnbp1l, Gfi1b, Ghitm, Gm15433, Gm16712, Gpr85, H2-T24, Herc6, Hinfp, Icosl, Igsf9, Il2ra, Itga5, Itpr2, Kcna3, Lad1, Lpcat1, Mfsd9, Minpp1, Mllt6., Mobkl2c, Ms4a4c, Ms4a6b, Ms4a6c, Mtdh, Mthfr, Mtmr14, Nfkbiz, Nup98, Nxf1, Otud5, Phf6, Phip, Pigv, Plagl2, Polr2g, Prpf4, Ptk2b, Ptprc, Rab9, Ranbp2, Rapgef2, Rasa4, Rasgef1b, Rassf4, Rftn1, Rin3, Rnf115, Rnf19a, Rnf4, Siah2, Slc25a25, Slc31a2, Snord14e, Sp110, St3gal1, St3gal3, Stk40, Swap70, Synj1, Tagap, Tbc1d1, Tlk2, Tlr1, Tmem39a, Tnip3, Tnni1, Tor1aip2, Tspan3, Tspan33, Uba6, Usp18, Vash1, Zfp811



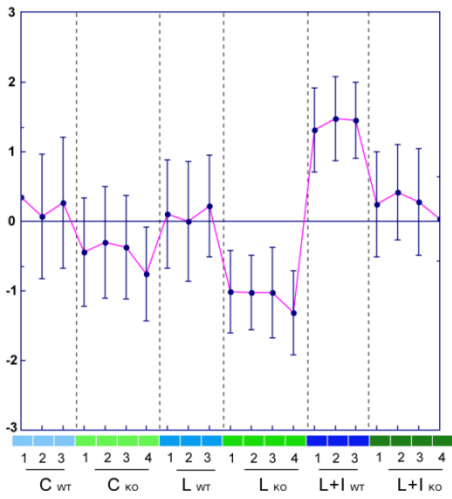
Cluster G



60 Genes

Actb, Apaf1, Arid4a, B630005N14Rik, Bahd1, Bbx, BC035044, Bcl2l1, Birc2, Btaf1, C030046E11Rik, Cmtm6, D830030K20Rik, Dock11, Eif2s1, Evi2a, Fam107b, Fam40a, Fam60a, Fgl2, Gm3002, Gm3558, Golga3, Gpr55, Hspa8, Iqgap1, Kcna2, Kif1b, LOC106740, M6pr, Mbnl2, Mir17hg, Mpp1, Mtmr12, Myo1g, Ncf1, Nck1, Nono, Npsr1, Phf10, Phf15, Pitrm1, Rabep2, Rfwd2, Rhof, Rsl24d1, Rsrc2, Spata5, Synpo2, Tbl1x, Ticam1, Tlr7, Tomm70a, Tpr, Ube2f, Ubtd2, Usp15, Uts2d, Vrk1, Yipf6

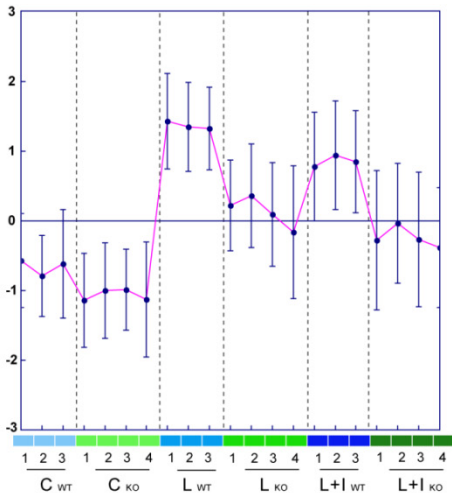
Cluster H



69 Genes

1700071M16Rik, 5330426P16Rik, 5730494M16Rik, 6330403A02Rik, 9930022D16Rik, Acs1, Ak4, Arid5b, Arl5b, Bnip3, Bst1, Btg1, Ccr1, Cd302, Csf2rb, Csf2rb2, Ctsc, D16Ert472e, Dram1, Egln1, Egln3, Emb, Eno1, Epha1, Fam102b, Fbxl5, Flrt3, Furin, Gda, Gm10847, Gm20114, Gm20235, Gm5068, Gnaq, Gpt2, Hif1a, Hk1, Hpse, Hrh2, Il1rn, Lmo4, Mesdc1, Mthfd1l, Nab2, Ninj1, Notch1, Pdk1, Pfk1, Pgm2, Pkm2, Psat1, Pstpip2, Ptch1, Ralgs, Rhoh, Sell, Serpinb8, Sgk1, Slc16a3, Slc37a3, Slc41a2, Snapc1, Tarm1, Tgm2, Tnfrsf1a, Tpi1, Trps1, Wdr20b, Zyx

Cluster I

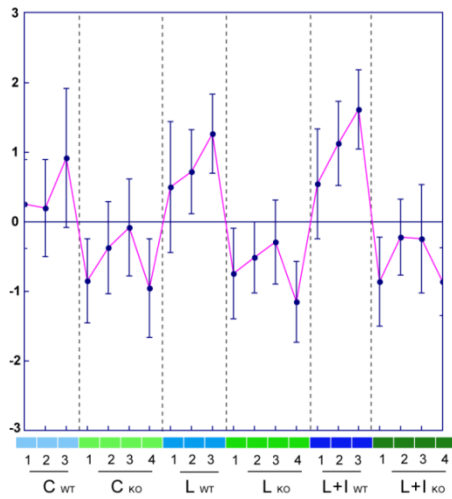


80 Genes

2310016C08Rik, 4930594C11Rik, 6530402F18Rik, Abcc1, Agpat4, Ahr, Aplnr, Arrdc4, Camk2n1, Ccrl2, Clec4e, Clec5a, Creb5, Csf3, Cxcl2, Cxcl3, Cybb, Enpp4, F830208F22Rik, Fam129b, Flt1, Fmn12, Fpr1, Fpr2, Fzd1, Gcnt2, Gm14005, Gpr84, Hmga1, Hmga1-rs1, Ikbke, Il1a, Il23a, Irg1, Lass6, Lirilb4, Lztf1, Malt1, Mapkapk2, Mfsd7a, Mgat4a, Mmp13, Mmp14, Mrpl52, Myo10, N4bp1, Nlrp3, Nod2, Ntng2, Pdk1, Phlda1, Plaur, Plekhn1, Pnp2, Prdx5, Psm10, Ptgs2, Rab11fip1, Rhoc, Rnase10, Rnaset2b, Samsn1, Sele, Sept11, Slc12a4, Slc2a1, Slc39a14, Slc7a2, Slfn4, Smpd13t, Sod2, Tcpl0c, Tmem2, Tnfrsf1b, Ttc39c, U90926, Vnn3, Xkr8, Zcchc2, Zfp800



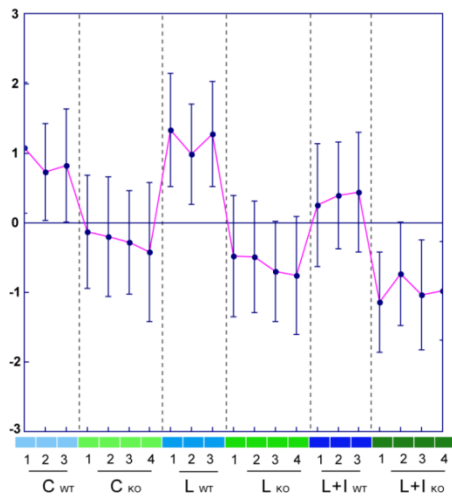
Cluster J



53 Genes

2010002N04Rik, A3galt2, Adora2b, Aif1l, Akr1b8, Alx3, Ccdc88b, Cd38, Cdr2l, Cldn12, Crct1, Cxadr, Cxcl12, Dcn, Dlgap4, Emp1, Fam108c, Fbln5, Flrt2, Fosl1, Frzb, Gjb2, Gm15998, Gm5424, Gpc1, Gpr141, Gpx3, H2-Oa, Itrip1, Ldha, Lpar1, Lrrc8c, Ly6i, Map3k6, Mfge8, Npy, Nradd, Polm, Ptges, Rps6ka4, S100a11, S100a6, Samd4b, Slc31a1, Slc45a3, Slc7a11, Spry2, Steap1, Syne2, Thbs1, Tm4sf1, Trip13, Txnrd1

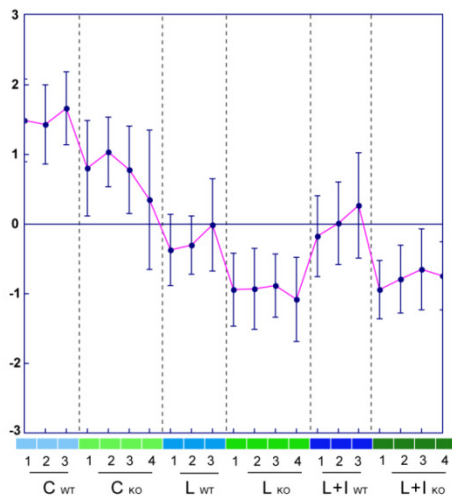
Cluster K



57 Genes

100861753, 100861977, 2010106C02Rik, 2210009G21Rik, Arg2, C230062I16Rik, Cd14, Cebpb, Clec4d, Eci2, Ets1, Ets2, Fabp4, Fam71f2, Gadd45a, Gbgt1, Gm5506, Gm8210, Hivep3, Ier3, Irak3, Layn, LOC633188, Lpcat2, Lrrc8d, Lrrfp2, Lyz2, Man2a1, Met, Mgst1, Mif, Mmp12, Mmp27, Mmp8, Msr1, Mtm1, Orai2, Osbpl3, Osm, Pde2a, Pilra, Pla2g7, Plk3, Rab32, Rbpms, Rnaset2a, Saa3, Sall1, Sema4d, Setd8, Slc7a8, Srebfl2, Tgif1, Tmem26, Trem1, Xdh, Zfp658

Cluster L

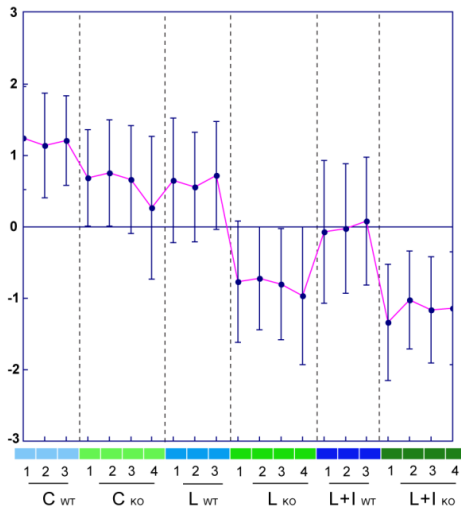


62 Genes

A430107O13Rik, Abca1, Acat2, Acvr1b, Agap1, Angptl4, Arl15, Atp1a3, Atxn1, BC021767, Bdh1, Cbl, Cbr3, Cmkir1, Colec12, Csf1r, Cxcl14, Dab2, Dkk2, Dmxl2, Dna2, Fanca, Fosl2, Gab1, Galk1, Galnt10, Gsto1, Gys1, Hdgfrp3, Hist1h1b, Hist1h2ak, Hist1h2bm, Hist2h2bb, Inf2, Irs2, Kcnj2, Ldlrad3, Mdfi, Mmp19, Nans, Nirc4, Palld, Pkdcc, Ppard, Prkch, Ptgfrn, Rab44, Rbl2, Rbm47, Rhoq, Rnf149, Runx1, Selenbp2, Sfnx3, Sntb2, Sox4, Sqrdl, Trf, Vegfa, Wbp5, Zadh2, Zranb3



Cluster M



98 Genes

5830432E09Rik, 6430527G18Rik, 9130014G24Rik, Abr, Adam17, Agtrap, Apbb3, Apoc1, Arap3, Arhgap24, Arhgap31, Bmpr2, Btd3, Capns2, Casp2, Cd1d1, Cd33, Cfl2, Chst1, Cpt1a, Csf3r, Ctsz, Cyp51, Daam2, Dtx4, Dusp6, F2rl2, Fabb5, Fam20c, Fam63a, Fcgr2b, Filip1l, Fth1, Gbe1, Gdpd1, Ggta1, Gm19773, Ifnar1, Igsf6, Igsf8, Jag1, Kctd7, Klif7, Leng9, Lira5, Lmo2, Lpin2, Mafk, Map4k3, Mapre2, Mocs1, Mthfd2l, Myof, Nfe2l2, Papss1, Pde7b, Pde8a, Pf4, Pid1, Pilrb1, Pilrb2, Plcb3, Plekha3, Plin2, Pon3, Ppt2, Ptger2, Ptpn12, Ptpre, Rffl, Rgs14, Sash1, Sc4mol, Sestd1, Sh2b2, Slc16a10, Slc25a37, Slc27a4, Smox, Snx18, Spata13, Spp1, Stard5, Tec, Tlr8, Tm6sf1, Tmc3, Tmem170b, Tnfrsf26, Tram2, Trib1, Trim13, Tsc22d1, Tshz1, Tuba4a, Unkl, Zfp691, Zfp703

Figura 34. La representació individual dels patrons d'expressió dels gens alterats en absència de C/EBP β permet analitzar i identificar quins són i com canvien els seus nivells tant en resposta als tractaments com en eliminar el factor de transcripció.

Amb l'objectiu d'entendre millor les implicacions biològiques d'aquests canvis observats al patró d'expressió dels gens afectats per la delecció de C/EBP β , aquests es van analitzar per tal d'obtenir els termes GO i les vies KEGG alterades (Figura 35A i B, respectivament).

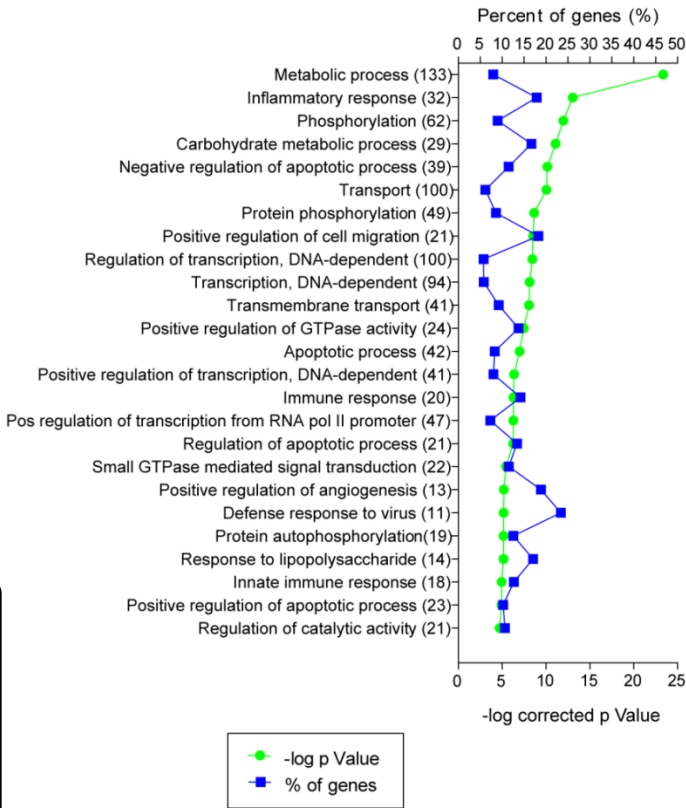
Aquells processos relacionats amb la resposta inflammatòria i immune i la regulació de la transcripció i l'apoptosi es troben dins dels 25 GO més afectats. Atès que C/EBP β és un factor de transcripció l'alteració d'aquest procés en la seva absència no resulta ésser un resultat inesperat. A més, els canvis a nivell d'ARNm d'alguns (pocs) gens relacionats amb la resposta inflammatòria en deleccionar el factor de transcripció, ja havien estat reportats anteriorment emprant animals amb deficiència total de C/EBP β (Cortes-Canteli et al, 2008) (Straccia et al, 2011). No obstant, la seqüenciació de l'ARN és una tècnica més sensible que la PCR en temps real utilitzada al treballs anteriors i permet detectar realitzant un sol anàlisi un gran nombre de gens (32), implicats en aquest procés, alterats significativament.

Finalment, l'ús d'animals genoanul·lats recentment també ha permès descriure un paper antiapoptòtic del factor de transcripció als monòcits perifèrics (Tamura et al, 2015).



A

GO Terms (Biological Process)



Pel que fa a les vies de KEGG més afectades, per la seva relació amb els resultats presentats a la figura 19, en destaquen tres: Lisosoma, Fagocitosi mediada pels receptors Fcγ i Fagosoma. A més, les vies relacionades amb la resposta inflamatòria i l'apoptosi es troben novament entre les més significatives.

No obstant però, aquests resultats no descriuen el tipus d'alteració que es produeix en aquests processos en absència de C/EBPβ. Per això, la representació dels patrons d'expressió dels gens que hi participen mitjançant *heatmaps* permet entendre millor quin efecte funcional tindrà la delecció del factor de transcripció en aquests processos.

B

KEGG Pathway

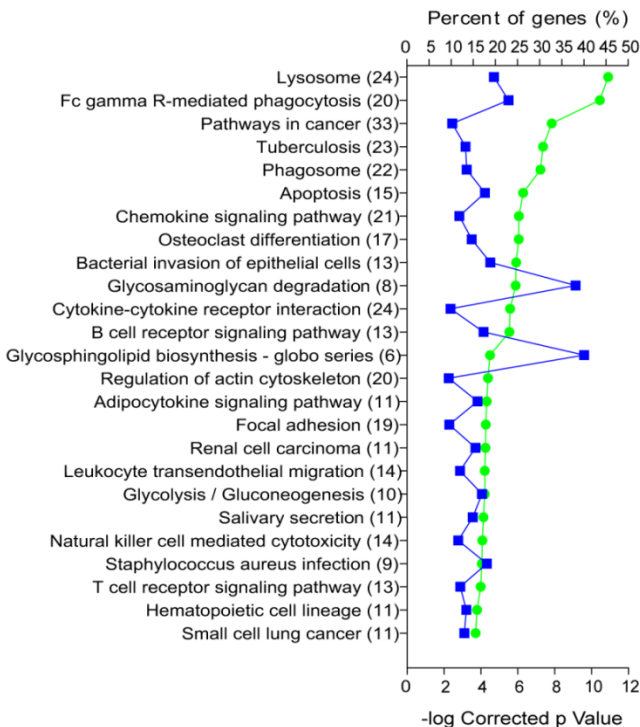
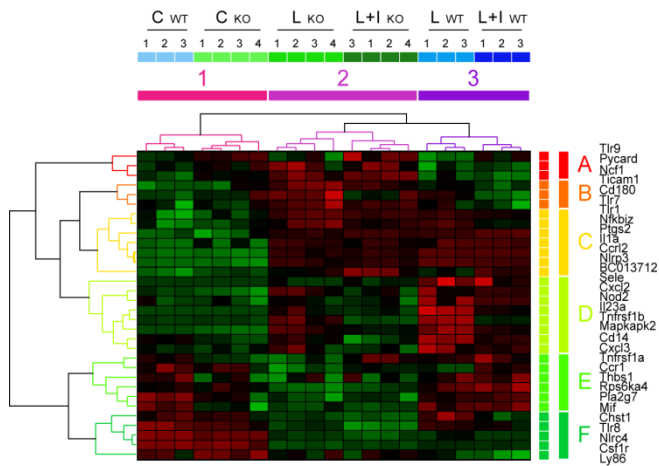


Figura 35. Representació dels 25 termes GO i les 25 vies de KEGG més significatives obtingudes en anotar els 1068 gens afectats per l'absència de C/EBPβ. A l'eix de les abscisses superior s'indica el percentatge que representen els gens detectats al present estudi dins del total de cada procés o via, mentre que l'eix inferior mostra els valors del logaritme negatiu de la p. Finalment, els diferents processos i vies, juntament amb el nombre de gens anotats a cadascuna d'elles, es presenten a l'eix d'ordenades

RESULTATS

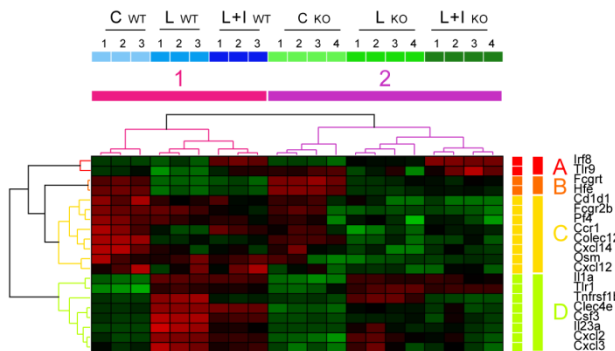
A

Inflammatory response (GO:0006954)



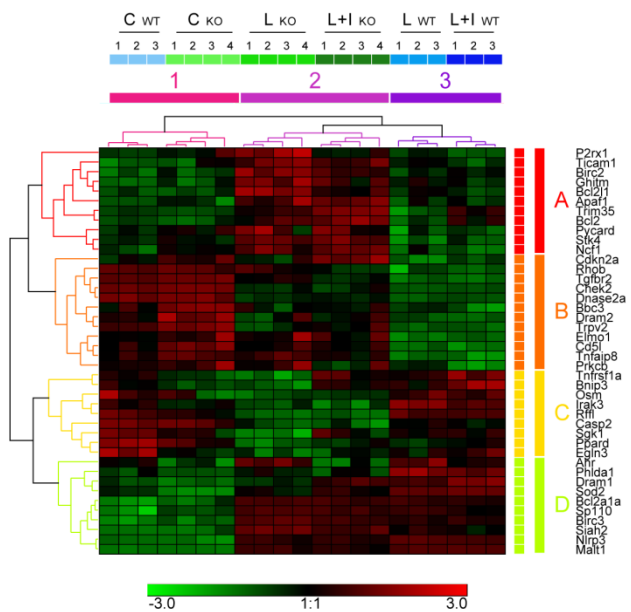
B

Immune response (GO:0006955)



C

Apoptotic process (GO:0006915)



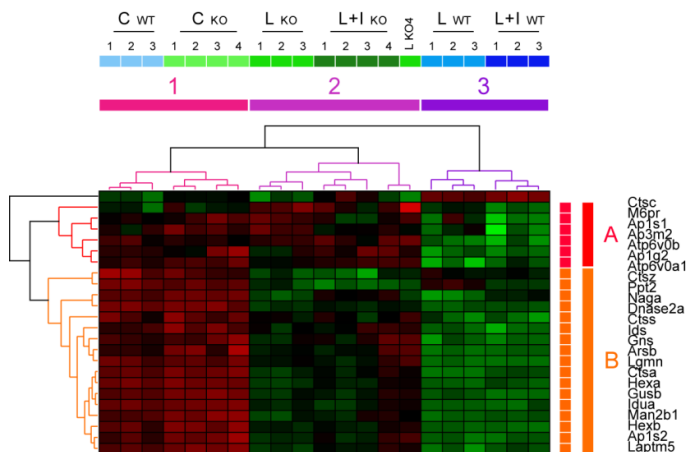
Així, en el cas dels 32 gens implicats en la resposta pro-inflamatòria l'efecte del genotip sobre la seva expressió s'aprecia en resposta als tractaments, però no en condicions basals. A més, en general s'observa que els nivells de gens proinflamatoris com Ptgs2 (COX2), IL-1 α i IL-23a disminueixen a la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ activada. Curiosament però, també s'aprecien altres gens on el tractament indueix, en absència del factor de transcripció, un perfil oposat a aquell observat en condicions basals i a les cèl·lules C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractades.

L'agrupament de les mostres en el cas dels gens que participen a la resposta immune revela que hi ha un marcat efecte del genotip sobre l'expressió d'aquests productes gènics, fins i tot en el cas de la micròglia no estimulada, que majoritàriament es tradueix en una reducció dels nivells en comparació amb la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$.

Figura 36. Es representen les gràfiques *heatmap* on es mostren els patrons d'expressió dels gens anotats als termes de GO resposta inflamatòria (A), resposta immune (B) i processos apoptòtics (C). En verd s'indica la disminució dels nivells respecte la mitjana d'expressió normalitzada de cada gen, mentre que la inducció es mostra en vermell.

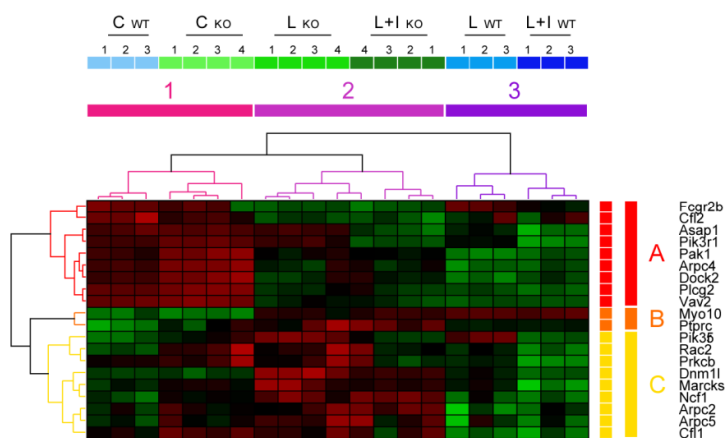
A

Lysosome (Kegg:04142)



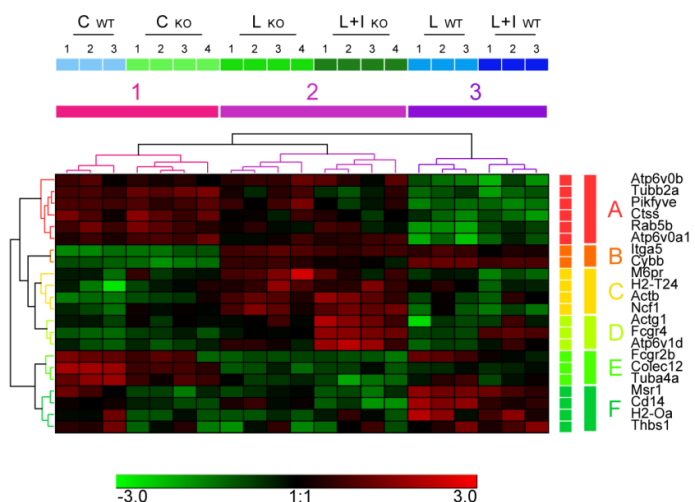
B

Fc gamma R-mediated phagocytosis (Kegg:04666)



C

Phagosome (Kegg:04145)



Dins de la resposta immune però, al clúster D destaquen importants gens implicats en la resposta inflamatòria com Clec4e, Csf3, IL-23a, Cxcl2 i Cxcl3. L'expressió d'aquests gens augmenta clarament en estimular la microglia C/EBPβ^{fl/fl}, sobretot en resposta al LPS. En canvi, els seus nivells es redueixen significativament en absència del factor de transcripció. Clec4e, una lectina que reconeix patrons moleculars bacterians també anomenat Mincle, mereix una menció especial, atès que la seva regulació per C/EBPβ s'ha descrit recentment a macròfags (Schoenen et al, 2014). Aquest resultat doncs, confirma novament la validesa de les dades obtingudes al present estudi.

Figura 37. Es representen les gràfiques *heatmap* on es mostren els patrons d'expressió dels gens anotats a les vies de KEGG lisosoma (A), fagocitosi mediada pels receptors Fcγ (B) i fagosoma (C). En verd s'indica la disminució dels nivells respecte la mitjana d'expressió normalitzada de cada gen, mentre que la inducció es mostra en vermell.

RESULTATS

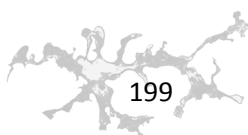
Finalment, C/EBP β també regula directa o indirectament gens relacionats amb l'apoptosi a la micròglia activada. Així, és possible distingir dos grups importants de gens on la deleció del factor de transcripció indueix o redueix clarament la seva expressió (A i C respectivament), un mòdul on la reducció dels nivells en resposta al tractament s'atenuaria a la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ (B) i per últim un clúster de gens on el tractament potencia la seva expressió sobretot a la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ (D).

La funció fagocítica també resulta significativament alterada en delecionar el factor de transcripció, tal i com s'observa en analitzar les vies de KEGG afectades. Així, la via del lisosoma és la que presenta un patró d'expressió més homogeni, ja que mentre els nivells de la majoria de gens de la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ activada disminueixen, en el cas del genotip LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ aquesta reducció resulta atenuada.

El perfil transcriptòmic dels gens implicats en la fagocitosi mitjançant els receptors Fc γ també resulta ésser força homogeni, atès que es distingeixen clarament dos grans grups. D'una banda, el primer d'ells agrupa aquells gens que experimenten una reducció clara de la seva expressió en resposta als tractaments, disminució que es veu atenuada però en absència de C/EBP β . D'altra banda, als gens inclosos al clúster B s'observa un marcat increment dels nivells gènics al genotip LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ en ésser estimulat tant amb LPS com amb LPS+IFN γ .

L'última via, la del fagosoma, és la que presenta més patrons d'expressió. No obstant, s'observa com, tot i algunes excepcions, en absència de C/EBP β gran part dels gens experimenten un augment dels seus nivells en resposta als estímuls proinflamatoris.

Finalment, cal destacar que ens tots tres casos, l'agrupament de les mostres revela novament una major semblança entre l'expressió gènica observada en condicions basals i els nivells detectats a la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ activada.



5. DISCUSSIÓ

5.DISCUSSIÓ.

L'any 1919, Pío del Río-Hortega va caracteritzar per primera vegada la població resident de macròfags al SNC, les cèl·lules de la micròglia (Kierdorf et al, 2013). Entre d'altres funcions, en condicions fisiològiques aquestes cèl·lules participen en la plasticitat neuronal, promouen la neurogènesi i rastregen constantment el seu entorn, amb l'objectiu de detectar qualsevol factor que pugui alterar l'homeòstasi del SNC (Hanisch, 2013). Així, davant qualsevol tipus d'estímul patològic la micròglia, juntament amb els astròcits, respon amb una reacció anomenada activació glial. Aquesta resposta és heterogènia, doncs es produeixen canvis a la morfologia, la proliferació i la fagocitosi, a més de la producció de ROS, NO i citocines pro i antiinflamatòries (Hanisch & Kettenmann, 2007). La finalitat d'aquesta reacció és restaurar l'homeòstasi del SNC. No obstant, quan l'activació microglial esdevé crònica com a conseqüència d'una estimulació incontrolada o bé es malmet la funció microglial, l'acció de la micròglia al SNC resulta neurotòxica (Biber et al, 2007). En els últims anys, aquest potencial neurotòxic ha esdevingut el focus d'una intensa investigació en el camp de la neurociència. L'objectiu és regular la resposta de les cèl·lules de la micròglia per tal de reduir la seva toxicitat, atès que evidències experimentals indiquen que l'activació glial crònica podria jugar un paper important en nombrosos trastorns del SNC.

Els factors de transcripció implicats en la regulació de l'activació glial resulten ésser possibles dianes terapèutiques, atès que possibiliten el gran nombre de canvis que pateix la micròglia durant l'activació. Com que els productes d'aquest procés són molts i variats, la inhibició d'un sol factor de transcripció que els reguli es postula com una estratègia més eficaç que la inhibició individual de cadascun d'ells. Així, la possibilitat de delecionar la seva expressió específicament a la micròglia resulta ésser una nova eina que permet estudiar i modular l'activació microglial.



5.1 Obtenció i caracterització de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Estudi dels efectes funcionals de la deleció de C/EBP β a les cèl·lules de la micròglia *in vitro* i *in vivo*.

5.1.1 Obtenció i caracterització de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$.

El gen de la lisozima M s'expressa específicament a les cèl·lules del llinatge mieloide. L'any 1999 es va descriure el primer ratolí on la recombinasa Cre va ser inserida al primer codó ATG endogen, que en el cas del gen de la lisozima M resulta ésser tant l'inici de transcripció com el de traducció, per tal de localitzar l'expressió de l'enzim a les cèl·lules d'aquest llinatge. Aquesta estratègia resulta en una eficiència de recombinació del gen RFX5 propera al 100% a macròfags i granulòcits (Clausen et al, 1999), mentre que en el cas de la micròglia, el percentatge de cèl·lules recombinades oscil·la entre el 40% *in vitro*/70% *in vivo* observat en delectonar IKK β i el 80% *in vitro* en el cas del gen GR (de l'anglès, *glucocorticoid receptor*) (Cho et al, 2008) (Ros-Bernal et al, 2011).

Per la seva banda, la segona soca emprada per a obtenir els animals deficientes condicionals caracteritzats en aquesta tesi doctoral va ser descrita l'any 2006. Així, els animals C/EBP $\beta^{fl/fl}$ es van generar per a estudiar el paper de C/EBP β en el desenvolupament del càncer de pell. Amb aquest objectiu, es va delectonar selectivament el factor de transcripció als queratinòcits controlant l'expressió de la recombinasa Cre mitjançant el promotor del gen de la queratina 5 (K5). A diferència dels animals genoanul·lats, les femelles C/EBP $\beta^{fl/fl}$ són fèrtils, fet que ha permès generar la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ creuant aquesta soca amb els ratolins LysMCre sense les limitacions de la deleció total de C/EBP β .

Els animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ són viables, fèrtils i no presenten mort perinatal, ja que el nombre de cries, nascudes i posteriorment deslletades, per llograda és comparable al dels animals control. Contràriament, mentre que el percentatge d'embrions genoanul·lats per C/EBP β és quasi idèntic al dels no modificats, tres setmanes després del naixement el nombre d'animals deficientes en el factor de



transcripció és sensiblement inferior (Bai et al, 2006). Aquestes dades indiquen que la supervivència dels animals genoanul·lats durant les primeres etapes del desenvolupament post-natal es veu compromesa, probablement a conseqüència de la hipoglucèmia que els provoca la seva reduïda capacitat de mobilitzar i metabolitzar el glicogen hepàtic (Liu et al, 1999).

No obstant, el fetge no és l'únic teixit alterat per l'absència de C/EBP β , atès que el factor de transcripció també participa en la maduració dels adipòcits. Així, als ratolins amb deficiència total de C/EBP β s'observa una disminució de l'acumulació lipídica al teixit adipós, fet que redueix el percentatge de greix corporal d'aquests animals (Tanaka et al, 1997). Gran part dels estudis publicats indiquen però, que aquesta reducció no altera la massa corporal total del ratolí de manera significativa (Screpanti et al, 1995) (Schroeder-Gloeckler et al, 2007) (Tanaka et al, 1997). Els resultats reportats per (Staiger et al, 2009) però, resulten ésser una excepció, atès que en aquest estudi el pes dels animals genoanul·lats és significativament inferior al dels no modificats. Per tal d'avaluar el cas de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ un dels primers experiments que s'ha dut a terme en aquest projecte de tesi ha estat un control de pes setmanal, emprant femelles C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ des del dia del seu deslletament fins a l'edat de 6 mesos (Figura 15A). Les dades recollides mostren que la deleció condicional de C/EBP β no afecta al desenvolupament d'aquests animals.

Comprovada la capacitat de les femelles LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ de donar a llum cries viables, amb independència del genotip del mascle, sense ésser necessari un trasplantament amb teixit ovàric de femelles control (Sterneck et al, 1997), la glàndula mamària era un altre teixit important a estudiar. Atès el paper clau de la lactància en la supervivència de les cries i els defectes observats a les glàndules mamàries de les femelles genoanul·lades, s'ha estudiat el teixit mamari de femelles C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$, joves i verges, emprant la tinció d'hematoxilina/eosina. En primer lloc, a les preparacions s'observa que al teixit adipós que envolta la glàndula mamària no hi ha diferències entre els dos genotips.



En segon lloc, també a ambdós genotips, s'aprecien els conductes ductals que la formen, l'epiteli dels quals consisteix en una capa interna de cèl·lules secretores luminals envoltada per cèl·lules mioepitelials basals (Figura 15B panell superior). Aquests resultats contrasten amb els reportats en el cas de les femelles amb deficiència de C/EBP β a tots els tipus cel·lulars, atès que al seu teixit mamari s'observen alteracions morfològiques dels conductes ductals (Robinson et al, 1998). Tot i que no s'ha estudiat el desenvolupament de la glàndula mamària durant l'embaràs o la lactància, també alterat en el cas dels animals genoanul·lats, les observacions realitzades a l'estabulari permeten concloure l'absència d'anomalies en aquest teixit a les femelles LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ atesa la seva capacitat per a alletar als nounats.

A causa de l'important paper que desenvolupa C/EBP β als llinatges mieloide i limfoide, la seva absència altera la morfologia de la melsa (Screpanti et al, 1995). Aquest òrgan està format per les polpes vermella, que actua com un magatzem d'eritròcits i macròfags, i blanca, implicada en la resposta immune i reservori de cèl·lules T i B. La deleció de C/EBP β , provoca entre d'altres, una proliferació anòmala de les cèl·lules B a la polpa blanca, així com un augment de megacariòcits i granulòcits a la vermella. L'increment del nombre de cèl·lules resulta en una morfologia hiperplàsica de les dues polpes que comporta un augment de la mida de la melsa (Screpanti et al, 1995). No obstant, aquestes alteracions no s'observen als animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$, atès que la morfologia i composició cel·lular de les polpes vermella i blanca d'aquests ratolins són indistingibles d'aquelles observades al genotip C/EBP $\beta^{fl/fl}$ (Figura 15B panell inferior).

Finalment, els altres òrgans i teixits analitzats: fetge, pulmó, ronyó, cervell, os i cor, tampoc presenten anomalies destacables. En conjunt, aquests resultats validen l'estratègia de la deleció condicional de C/EBP β a la micròglia, amb l'objectiu d'evitar les alteracions fenotípiques dels animals permanentment genoanul·lats, que dificulten el seu ús com a model experimental.



5.1.2 Confirmació de l'absència selectiva de C/EBP β a les cèl·lules microgials *in vitro*:

L'anàlisi de mostres de proteïna obtingudes de la micròglia primària dels ratolins C/EBP $\beta^{fl/fl}$ mostra un clar augment de l'expressió de C/EBP β , concretament de la isoforma de 35 kDa LAP, com a conseqüència del tractament amb LPS+IFN γ a 24h (Figura 16A). Aquests resultats confirmen allò observat en estudis previs del grup (Ejarque-Ortiz et al, 2007a) (Straccia et al, 2011), on la presència del LPS sol o juntament amb l'IFN γ indueix l'expressió del factor de transcripció a les cèl·lules gials.

A més, l'anàlisi de l'expressió proteica de C/EBP β mostra el primer indicatiu de l'alta eficiència de la recombinació d'aquest gen a la micròglia dels animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$, atès que no s'observa expressió del factor de transcripció a aquestes cèl·lules ni en condicions basals ni per efecte del tractament (Figura 16A i B). La tinció d'immunofluorescència permet quantificar el nombre de cèl·lules microgials que expressen C/EBP β als genotips C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Així, mentre al primer s'observa un marcatge clarament nuclear corresponent al factor de transcripció a quasi bé totes les cèl·lules de la micròglia, en el cas dels animals genoanul·lats condicionals el nucli d'aquestes cèl·lules donen resposta negativa a l'anticòs de C/EBP β i només es pot apreciar gràcies a la tinció genèrica dels àcids nucleics amb DAPI. Aquests resultats indiquen que l'eficiència de recombinació del gen de C/EBP β a la micròglia primària dels animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ és del 100%, clarament superior a la reportada en estudis previs on s'ha emprat el promotor de LysM com a element de control de l'activitat de la recombinasa Cre a les cèl·lules microgials (Cho et al, 2008) (Ros-Bernal et al, 2011).

Finalment, les tincions immunocitoquímiques realitzades amb cultius de glia mixta d'ambdós genotips demostren l'especificitat de la deleció controlada pel promotor de la lisozima M, atès que a les preparacions dels animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ només els astròcits, identificats pel marcatge contra la proteïna GFAP, expressen C/EBP β . Aquestes imatges mostren novament que el tractament amb LPS+IFN γ



indueix l'expressió del factor de transcripció. No obstant, tot i que l'augment es produeix tant a les cèl·lules de la micròglia com als astròcits, els nivells de C/EBP β són menors en el cas de l'astròglia. Aquesta diferència ja s'havia descrit en observacions prèvies del grup (Ejarque-Ortiz et al, 2007a).

Així doncs, l'alta eficiència i especificitat observades en la deleció condicional de C/EBP β a les cèl·lules microglijals, validen l'elecció del promotor de LysM com a candidat per a controlar l'expressió de la recombinasa Cre en aquest tipus cel·lular. Per tant, la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ resulta ésser una bona (i nova) eina per a l'estudi del paper de C/EBP β a la micròglia primària.

5.1.3 Anàlisi de l'efecte de la deleció de C/EBP β a les cèl·lules microglijals *in vitro*:

El NO participa activament a la resposta proinflamatòria microglial i estudis previs del grup han demostrat el paper regulador de C/EBP β sobre la seva producció (Straccia et al, 2011). Per aquesta raó la seva quantificació s'ha emprat per a l'estudi dels efectes de la deleció del factor de transcripció a la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. El tractament amb LPS sol o conjuntament amb diferents concentracions d'IFN γ indueix la producció del NO a les cèl·lules primàries microglijals. No obstant, l'absència de C/EBP β redueix significativament aquesta producció. L'anàlisi dels nivells d'ARNm i de proteïna corrobora aquest efecte. A més, la localització de l'expressió de NOS2, l'enzim encarregat de la producció del NO, a les cèl·lules microglijals d'un cultiu mixt confirma el seu paper com a cèl·lules productores de NO (Figura 18). Aquests resultats validen l'ús dels animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ com a eina per a l'estudi de les funcions de C/EBP β microglial, atès que són molt semblants als prèviament descrits emprant ratolins amb deficiència total del factor de transcripció (Straccia et al, 2011).

La mort cel·lular induïda per l'activació regula el nombre de cèl·lules microglijals activades amb l'objectiu de disminuir el dany que l'activació d'aquestes cèl·lules pugui produir al SNC. Estudis previs han demostrat que tant el LPS com l'IFN γ poden induir la mort cel·lular mitjançant la via del NO o de la caspasa 11 (Pan et al, 2013) (Mayo & Stein, 2007). Així, a conseqüència de la seva implicació en la



producció del NO, l'ablació de C/EBP β podria ésser una eina per a modular la mort microglial induïda per l'activació. Amb l'objectiu de comprovar aquesta hipòtesi es varen realitzar uns primers experiments emprant cultius de microglia primària per a establir les concentracions de LPS i IFN γ capaces d'induir la mort microglial. Finalment, s'ha observat que la concentració de LPS 1 μ g/mL provoca una mort cel·lular propera al 40% 3, 5 i 7 dies després del tractament. Per tal de disminuir encara més la viabilitat de les cèl·lules, aquestes s'han cotractat amb LPS i dues concentracions diferents d'IFN γ 1 i 30 ng/mL. En aquestes condicions el percentatge de cèl·lules microglials vives se situa al voltant del 10%, sense que s'observin diferències clares entre ambdues concentracions d'IFN γ . Contràriament a allò esperat, els mateixos resultats s'han obtingut en emprar microglia primària LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ (Figura 18). Aquestes dades indiquen doncs que, tot i el control transcripcional de C/EBP β sobre el gen NOS2, la deleció del factor de transcripció no afecta a la mort cel·lular induïda per activació, ja que probablement la disminució de NO es compensa a través de la via de les caspases. No obstant, atès que la mort induïda per l'activació és un mecanisme protector enfront la sobre activació microglial, la no alteració d'aquest procés en absència de C/EBP β microglial podria resultar beneficiosa en futurs experiments on s'emprin estratègies farmacològiques inhibidores.

Com a macròfags del SNC, les cèl·lules microglials responen a qualsevol tipus d'estímul patogènic que pugui alterar la homeòstasi del cervell. Així, juntament amb la inflamació, la funció fagocítica compon la primera línia de defensa de la resposta microglial. Per tal d'avaluar la capacitat fagocítica de la microglia en absència de C/EBP β s'han exposat cultius microglials, C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$, tractats prèviament amb LPS o LPS+IFN γ a un cultiu de *Salmonella typhimurium*. Els resultats obtinguts indiquen que la capacitat de fagocitar els bacteris, avaluada 30 minuts després de la seva adició als cultius, augmenta en ambdós genotips tractats prèviament amb LPS. No obstant, en el cas del tractament amb LPS+IFN γ aquest augment només s'observa al genotip LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. A més, aquests animals també presenten una major eliminació dels



bacteris fagocitats 4h després de la infecció (Figura 19). Així doncs, aquestes dades semblen indicar una major capacitat per a fagocitar i eliminar bacteris en absència de C/EBP β .

Aquests resultats són sorprenents, atès que estudis previs no han reportat diferències en la capacitat fagocítica a conseqüència de la deleció del factor de transcripció, mentre que han descrit una major susceptibilitat a la infecció bacteriana, a causa d'una eliminació defectuosa dels bacteris (Pizarro-Cerda et al, 1999) (Tanaka et al, 1995) (Screpanti et al, 1995). Cal destacar però, que aquesta contradicció no invalida els resultats aquí obtinguts, ja que els experiments descrits a la bibliografia s'han realitzat emprant macròfags peritoneals o bé per injecció sistèmica dels bacteris i possiblement els models no són comparables.

Un cop observada l'alteració de la fagocitosi bacteriana microglial en absència de C/EBP β , podria ésser interessant avaluar també l'afectació d'aquesta funció enfront altres tipus de dianes, com ara neurones apoptòtiques o agregats proteics (A β , α -sinucleïna...). De fet, tot i que els receptors Tlr4 i Fc γ participen tant en la internalització de la Salmonella com de l' α -sinucleïna i A β (Fu et al, 2014), és necessari estudiar la resposta de la microglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ enfront d'aquests agregats, ja que podria no ésser igual. A més, cal recordar que a la majoria de malalties neurodegeneratives la capacitat fagocítica de la microglia es redueix juntament amb la capacitat de digerir allò internalitzat (Hickman et al, 2008). Així, si es confirmés que l'absència de C/EBP β afavoreix la fagocitosi i la eliminació dels productes fagocitats, la inhibició del factor de transcripció podria resultar una estratègia per a reduir el dany que produeixen aquests dipòsits proteics a les neurones.

5.1.4 Caracterització de la microglia aïllada del cervell de ratolí adult.

Actualment, es disposa d'una gran varietat de tècniques per a estudiar la microglia al SNC adult. No obstant, moltes d'elles presenten importants limitacions que fan necessari el desenvolupament de noves tècniques per a estudiar les funcions fisiològiques i patològiques de la microglia. Així, tot i que la immunohistoquímica



representa una eina potent per a l'estudi de la morfologia i proliferació microglial, l'anàlisi de la producció de citocines durant la resposta inflamatòria de les cèl·lules de la micròglia resulta ésser costós. A més, sovint s'empren homogenats de cervell per a estudiar la neuroinflamació emprant tècniques com PCR en temps real, *Western blot* o *Elisa*. Malauradament, aquests mètodes no permeten identificar el paper dels diferents tipus cel·lulars presents al SNC implicats en la resposta a alteracions de l'homeòstasi. L'aïllament de la micròglia es postula doncs com una eina de gran utilitat per a assolir aquest objectiu.

Durant els últims anys molts han estat els protocols publicats. La gran majoria han aprofitat l'expressió dels diferents receptors de membrana expressats específicament per la micròglia o bé han optat per l'ús de gradients que permeten separar aquestes cèl·lules segons la seva densitat i mida. El protocol emprat en aquesta tesi és una adaptació del mètode prèviament publicat a (Nikodemova & Watters, 2012) i combina les dues opcions. Així després de disgregar el teixit cerebral, es realitza una primera separació emprant un gradient de Percoll al 30%. La micròglia, a diferència de la majoria de les altres cèl·lules del SNC, és capaç de travessar-lo. De fet, s'ha descrit que en presència d'un gradient discontinu, la densitat òptima per a separar les cèl·lules microgials se situa entre el 30 i el 37% de Percoll (Cardona et al, 2006a). Aquest pas permet a més eliminar la mielina, fet que evita possibles interferències d'aquesta proteïna durant la separació magnètica. A continuació s'aprofita l'expressió de CD11b a la membrana de la micròglia per a enriquir-ne la població a les cèl·lules separades prèviament emprant el gradient. Així, el marcatge amb un anticòs conjugat amb nanopartícules magnètiques capaç de reconèixer CD11b permet obtenir 379.415 ± 79.073 cèl·lules microgials per cervell de ratolí adult i com demostren els resultats aquí presentats, la puresa d'aquestes cèl·lules és propera al 90% (Figura 20).



5.1.5 Confirmació de l'absència selectiva de C/EBP β a les cèl·lules microgials *in vivo*:

L'alta puresa d'aquest mètode permet analitzar la micròglia dels animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ amb l'objectiu de quantificar l'eficiència de recombinació de la recombinasa Cre sota el control del promotor LysM al cervell adult. Estudis previs del grup (Ejarque-Ortiz et al, 2007a), han demostrat que per a estudiar l'expressió de C/EBP β al cervell de ratolins adults, cal tractar-los prèviament amb LPS sistèmic, atès que en condicions fisiològiques els nivells del factor de transcripció són quasi nuls. Els resultats aquí obtinguts per *Western blot* i immunocitoquímica confirmen aquestes observacions pel que fa als nivells de proteïna. Així, en presència del tractament, quasi totes les cèl·lules microgials del genotip C/EBP $\beta^{fl/fl}$ expressen C/EBP β , mentre que només un 10% de la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ ho fa (Figura 21). Aquestes dades, tot i que lleugerament inferiors a les obtingudes en el cas de la micròglia primària són superiors a les reportades anteriorment (Cho et al, 2008). A més, validen l'ús del promotor del gen de la lisozima M com a element de control de l'activitat de la recombinasa Cre a les cèl·lules microgials i per tant, a la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ com a eina per a estudiar per primera vegada el paper de C/EBP β microglial *in vivo*.

5.1.6 Reducció de l'expressió de gens proinflamatoris en absència de C/EBP β microglial

Així, s'han escollit les citocines pro-inflamatòries Tnfa, IL-23a i Csf3, i els enzims Ptges i Cybb, implicats en la producció de PGE₂ i l'anió superòxid, respectivament, per tal d'analitzar quin és el paper de C/EBP β a la transcripció de gens microgials al SNC adult. Els nivells d'ARNm dels cinc gens augmenten significativament en resposta a un estímul proinflamatori com el LPS. Aquestes dades no són inesperades, atès el paper d'aquests gens en l'activació microglial. Més interessant resulta ésser la disminució de la inducció provocada pel LPS que s'observa en absència de C/EBP β a les cèl·lules microgials *in vivo*, atès que no s'ha reportat amb anterioritat (Figura 22). No obstant, la regulació de Tnfa per part del factor de



transcripció ja ha estat descrita emprant la línia cel·lular microglial BV2 (Jana et al, 2003). Per la seva banda a les cèl·lules dendrítiques, IL-23a, també anomenada IL23p19, presenta 4 llocs d'unió de C/EBP β al seu promotor (Kocieda et al, 2012), mentre que la deleció del factor de transcripció redueix dràsticament l'expressió de Csf3 (Schoenen et al, 2014). Estudis del grup han demostrat prèviament la regulació *in vitro* de Ptges per part del factor de transcripció emprant cultius de micròglia i glia mixta (Straccia et al, 2013). Finalment, aquest és el primer resultat que mostra el control transcripcional de Cybb per part de C/EBP β , atès que no s'ha trobat cap publicació on es detalli.

Aquests resultats demostren doncs que l'absència de C/EBP β resulta en una disminució de l'expressió de gens proinflamatoris a la micròglia *in vivo* i per primera vegada permeten estudiar el paper regulador de C/EBP β microglial al SNC adult.

5.1.7 Estudi dels efectes de la deleció de C/EBP β microglial al model animal de l'esclerosi múltiple EAE.

L'esclerosi múltiple és una malaltia crònica, inflamatòria i neurodegenerativa que es caracteritza per la desmielinització del SNC. Aquestes lesions s'observen principalment a la substància blanca de la medul·la espinal, del cerebel, del nervi òptic i del tronc cerebral i sovint, la micròglia activada hi és present. D'entre els diferents models animals descrits per a estudiar la malaltia, l'EAE és un dels més usats. En aquest model els ratolins són immunitzats, emprant components de la mielina, per tal de reproduir la desmielinització característica de l'esclerosi múltiple. A més, aquests animals presenten plaques de lesió molt semblants a les que es troben durant les autòpsies de pacients amb esclerosi múltiple.

Diferents treballs on l'activació microglial s'ha inhibit han demostrat una atenuació de la simptomatologia patològica del model (Rawji & Yong, 2013). Per aquesta raó, un cop descrita la inhibició de gens proinflamatoris en eliminar C/EBP β , s'ha considerat d'interès estudiar l'expressió del factor de transcripció al model i analitzar un possible efecte neuroprotector de la seva absència.



Els resultats obtinguts emprant homogenats mostren un clar increment dels nivells d'ARNm i proteïna de C/EBP β 14 dies després de la immunització a les tres regions medul·lars i a les tres regions de l'encèfal estudiades (Figura 23A-D). No obstant, aquestes dades no indiquen el o els tipus cel·lulars on es produeix aquest augment. Atès que les neurones i els astròcits també expressen el factor de transcripció, per a estudiar el paper de C/EBP β microglial al model animal era necessari disposar de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Aquests animals presenten una simptomatologia de la malaltia atenuada en ésser comparats amb els ratolins control LysMCre i C/EBP $\beta^{fl/fl}$. A més, les diferències entre genotips comencen a observar-se al voltant dels 14 dies post-immunització, coincidint amb l'augment del factor de transcripció prèviament descrit (Figura 23E). Aquestes dades suggereixen que en aquest punt C/EBP β microglial pot ésser un factor important per al desenvolupament i progressió de la malaltia. Segurament però, i a conseqüència del seu paper com a regulador transcripcional aquest efecte estarà mediat per gens controlats per C/EBP β .

Tnfa, IL-23a, Csf3, Ptges i Cybb, entre d'altres, podrien ésser possibles candidats, ja que tots cinc desenvolupen un paper patològic al model EAE alhora que la seva inhibició resulta protectora. Així, tot i que en absència de Tnfa els animals desenvolupen la malaltia, l'aparició dels primers símptomes es veu retardada (Korner et al, 1997). En canvi, la deleció de Ptges no afecta l'inici de les primeres manifestacions patològiques, però sí que les atenua sensiblement (Takeuchi et al, 2013) (Kihara et al, 2009). Per la seva banda, tant l'eliminació d'IL-23a com del receptor de Csf3 provoca que els animals siguin quasi resistents al desenvolupament de la malaltia (Thakker et al, 2007) (Rumble et al, 2015). Finalment, el tractament farmacològic emprant Dextromethorphan, un inhibidor de l'expressió i l'activitat de Cybb, atenua la inflamació al SNC, suprimeix la infiltració de cèl·lules perifèriques i redueix la desmielinització i la pèrdua axonal (Chechneva et al, 2011).

Aquests resultats doncs, indiquen que la inhibició del factor de transcripció resulta neuroprotectora en aquest model neurodegeneratiu animal. Això, juntament amb la

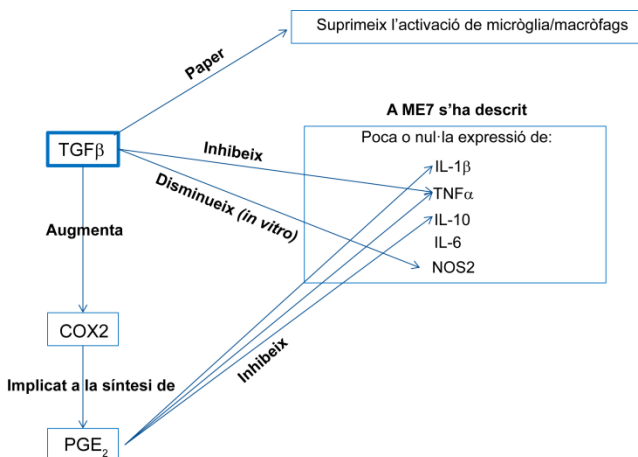


forta expressió del factor de transcripció que s'observa a les mostres de pacients d'esclerosi múltiple (Figura 23F i G), suggereix que la deleció de C/EBP β microglial podria ser una nova estratègia per a tractar la malaltia.

5.1.8. Inducció del model prionic murí, ME7, als animals LysMCre-C/EBP β ^{fl/fl}

Un cop observat l'efecte neuroprotector de la deleció de C/EBP β microglial al model EAE, s'ha plantejat continuar amb l'estudi dels efectes de l'absència del factor de transcripció a d'altres models de neurodegeneració. Pel seu perfil patològic i l'oportunitat de col·laborar amb el grup dels Drs. Hugh Perry i Diego Gómez-Nicola de Southampton, es va escollir el model prionic murí ME7. Aquest data de l'any 1963 i s'originà inoculant melsa provinent d'ovelles amb Scrapie per via intragàstrica a ratolins (Zlotnik & Rennie, 1963). Aquests animals desenvoluparen la simptomatologia i les lesions neuronals clàssiques de la patologia i els seu teixit cerebral s'utilitzà per a infectar altres ratolins amb l'objectiu de continuar estudiant el model.

La inoculació intracranial d'homogenat de ratolins ME7 provoca una resposta inflamatòria atípica per part de la micròglia, caracteritzada per una baixa producció de citocines proinflamatòries, però amb alts nivells de TGF β , COX2 i PGE $_2$.



Aquest perfil de secreció de citocines s'observa a la micròglia primària quan fagocita neurones apoptòtiques (Minghetti et al, 2005), el tipus de mort neuronal que s'observa en aquest model.

Model proposat per (Cunningham et al, 2002) sobre el paper de TGF β al model prionic ME7



A més, la patologia priònica indueix una marcada i progressiva proliferació microglial controlada per l'eix C/EBP α -PU.1-CSFR1. Estudis realitzats emprant GW2580, un inhibidor selectiu de l'activitat tirosina cinasa de CSF-R1, indiquen que la regulació de la proliferació microglial atenua la simptomatologia associada a la patologia, alhora que augmenta l'esperança de vida dels ratolins (Gomez-Nicola et al, 2013). Aquests resultats suggereixen que aquesta podria ésser una possible estratègia, tot i que segurament no l'única, per a modular l'activitat microglial al model ME7.

L'anàlisi de mostres obtingudes del tàlem d'animals ME7 20 setmanes després de la inoculació mostra un augment significatiu dels nivells d'ARNm de C/EBP β a causa de la patologia. No obstant, l'administració de l'inhibidor GW2580 no afecta a l'expressió del factor de transcripció (Figura 24B). Aquestes dades indiquen la no implicació de C/EBP β en la proliferació microglial al model ME7, però el seu augment amb la patologia suggereix un paper al model. De fet, durant la patologia s'ha descirt un augment de COX2 i PGE₂ (Cunningham et al, 2002) que promouien el fenotip inflamatori anòmal microglial, i tots dos gens són regulats positivament per C/EBP β (Straccia et al, 2013). Així, amb l'objectiu d'estudiar el paper del factor de transcripció a d'altres possibles vies reguladores de la funció microglial es varen inocular animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i els genotips control LysMCre, C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i *wild type* emprant homogenats de cervell provinents de ratolins ME7 i NBH.

Els canvis de conducta dels animals s'empren per a detectar els primers símptomes de la patologia. Així, la progressió de la malaltia s'avalua mitjançant diferents tests de comportament. El primer test, l'*open field*, mesura l'activitat locomotora i exploradora dels animals. Aquests davant un entorn desconegut reaccionen recurrent-lo activament. No obstant, el reconeixement de la zona provoca que en posteriors exposicions, l'activitat exploradora disminueixi. Als animals ME7 l'exploració però, no es redueix atès que la neurodegeneració induïda per la proteïna priònica provoca alteracions a l'hipocamp, fet que impossibilita l'adaptació a l'entorn (Chiti et al, 2006).



En segon lloc s'avalua el comportament de *burrowing*. Aquest test es basa en el desplaçament emprant les extremitats (*to burrow*, de l'anglès: fer un forat o túnel) del menjar contingut dins d'un tub. Els animals realitzen aquesta activitat de manera espontània, ja que és un comportament gratificant. A més, el fet de no ésser essencial pel manteniment del ratolí, a diferència de menjar o beure, converteix aquest test en un indicador molt sensible de la simptomatologia. Així, els animals ME7 progressivament disminueixen aquesta activitat possiblement a conseqüència d'un trastorn depressiu, també observat a casos de malalties prioniques humanes, o bé per l'alteració del funcionament òptim del SNC, ja que aquest comportament requereix una gran capacitat d'organització i coordinació (Deacon et al, 2001).

Finalment, el deteriorament de l'activitat motora que s'observa l'última etapa de la patologia s'avalua emprant el test anomenat *inverted screen*, on es mesura el temps que el ratolí roman agafat a una reixa girada cap per avall (Guenther et al, 2001).

Les dades indiquen que la tècnica apresada al laboratori de Southampton s'ha pogut reproduir amb èxit als animals de la colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. No obstant, aquests tres test no mostren diferències entre el comportament dels ratolins ME7 LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i el dels animals ME7 control (Figura 24C-E). Aquest resultat però, no indica forçosament que C/EBP β no jugui cap paper a la patologia, atès que per poder afirmar-ho caldria avaluar a nivell molecular i cel·lular el teixit dels animals. Repetir l'experiment augmentant el nombre d'animals, ja que sovint la variabilitat que s'observa entre els ratolins quan es monitoritza el seu comportament emmascara les diferències entre els grups experimentals, també ajudaria a descartar el paper de C/EBP β al model ME7. Malauradament, la manca de temps no ha permès seguir aquest estudi.

A més, cal no oblidar que tot i compartir una base patogènica, molts dels mecanismes implicats en la mort neuronal poden no ser comuns a les diferents malalties. Per tant és d'esperar que C/EBP β no sigui una diana terapèutica a tots



els trastorns neurodegeneratius. Així, atès que la resposta microglial en situacions patològiques és molt diversa, és necessari considerar altres estratègies per a modular-la. No obstant, per a assolir aquest objectiu cal aprofundir en l'estudi d'aquestes cèl·lules tant en condicions basals com davant d'estímuls proinflamatoris.

Durant els últims anys, els *microarrays* s'han emprat per tal de descriure el perfil transcriptòmic de diferents tipus cel·lulars o teixits. Aquesta tècnica però presenta múltiples limitacions com ara una baixa sensibilitat, la necessitat de validar els resultats posteriorment a causa de l'elevat soroll de fons i la capacitat de detecció condicionada al tipus i nombre de sondes emprades. Amb l'objectiu d'evitar aquests inconvenients s'ha escollit la seqüenciació de l'ARN per a identificar nous gens afectats pels tractaments amb LPS i LPS+IFN γ a la micròglia primària. A més, el perfil transcriptòmic de les cèl·lules microgials LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ també s'ha analitzat per a estudiar més a fons els mecanismes afectats per la deleció del factor de transcripció a aquest tipus cel·lular.

5.2 Anàlisi del perfil transcriptòmic de la micròglia primària activada.

5.2.1 Anàlisi WGCNA (*Weighted Correlation Gene Network Analysis*) de la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractada amb LPS i LPS+IFN γ durant 6h.

Les xarxes de co-expressió gènica s'empenen per a descriure la relació entre els transcrits detectats en una o diferents mostres. L'anàlisi WGCNA permet trobar grups de gens amb patrons d'expressió semblant i agrupar-los dins de mòduls. Aplicat a les mostres obtingudes de micròglia primària C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tractada amb LPS i LPS+IFN γ a 6h identifica 12 perfils d'expressió gènica diferents (Figura 25). D'aquests 12 mòduls, en destaca el de color turquesa pel nombre de gens que agrupa, el 65% dels detectats, i per l'efecte inhibidor dels tractaments sobre la seva l'expressió. Aquestes dades suggereixen que un gran nombre de gens expressats per la micròglia en condicions basals veuen reduïts els seus nivells davant



d'estímuls proinflamatoris i per tant contribueixen a descartar el concepte de la micròglia quiescent en condicions fisiològiques. No obstant, cal emprar altres eines per tal d'identificar els programes cel·lulars que s'alteren durant l'activació microglial.

L'any 2007, la plataforma GeneCodis es va introduir amb l'objectiu d'anotar els gens d'interès mitjançant la integració d'informació provinent de diferents bases de dades (Carmona-Saez et al, 2007). D'entre aquestes destaquen les anotacions per a *MicroRNA*, *InterPro Motifs*, *Transcription Factors*, les tres categories del GO, les vies KEGG i les vies Panther. En aquest treball ens hem centrat en les més emprades, els termes GO i les vies KEGG. L'objectiu dels primers és proporcionar un vocabulari adient per tal de descriure acuradament les funcions dels gens i les proteïnes a les cèl·lules de diferents organismes. Per aquesta raó s'han descrit tres possibles categories (Ashburner et al, 2000):

- Processos biològics (de l'anglès, *Biological process*). Aquest terme descriu una sèrie d'esdeveniments realitzats per un o més conjunts organitzats de funcions moleculars. Exemples en serien: “processos cel·lulars en condicions fisiològiques” o “manteniment i proliferació cel·lular”. En general, la norma per a distingir un procés biològic d'una funció molecular és que un procés ha de constar de més d'un pas diferent. A més, un procés biològic no equival a una via, atès que no representa la dependència que es requereix per a descriure'n una.
- Funció molecular (de l'anglès, *Molecular function*). Es defineix com l'activitat bioquímica d'un producte gènic que es produeix a nivell molecular. “Activitat catalítica” o “activitat de transport” en serien exemples.
- Component cel·lular (de l'anglès, *Cellular component*). Aquesta anotació fa referència a la localització cel·lular a on un producte gènic realitza la seva activitat, com ara “citoplasma” o “ribosoma”. Aquests termes s'empren per tal d'entendre l'estructura de la cèl·lula eucariota.



Atès que la informació necessària per a interpretar els mecanismes biològics que tenen lloc al sistema experimental objecte d'estudi només la proporciona la primera categoria, aquesta va ser l'única escollida per a anotar els gens d'interès en aquest treball, juntament amb les vies de KEGG. Aquestes són un conjunt de vies que representen el coneixement actual sobre les xarxes d'interacció i reacció molecular dins les categories de metabolisme, processament de la informació genètica, processament de la informació ambiental, processos cel·lulars, sistemes d'organismes i malalties humanes (Kanehisa et al, 2008).

Com que l'objectiu principal de la seqüenciació d'ARN de mostres microgials activades és aprofundir en l'estudi dels canvis que es produeixen en estimular la micròglia, l'anotació només s'ha realitzat amb els gens agrupats dins d'aquells mòduls on el patró d'expressió gènica s'altera significativament a causa dels tractaments.

Així, en el cas dels clústers groc i blau s'observa com l'augment dels nivells d'expressió en resposta als estímuls proinflamatoris, correlaciona amb un enriquiment important dels termes relacionats amb la resposta proinflamatòria. No obstant, cal destacar algunes diferències observades entre els dos mòduls. En primer lloc, l'anàlisi del mòdul groc revela que d'entre la totalitat dels gens detectats els 533 agrupats en aquest clúster experimenten un increment dels seus nivells només quan s'empren els dos estímuls per a activar la micròglia. Aquest resultat suggereix un marcat efecte de l'IFN γ sobre l'expressió d'aquests productes gènics, tot i que no permet afirmar que sigui exclusiu, atès que l'augment podria ésser conseqüència d'una sinèrgia entre els dos estímuls. Només una nova anàlisi on s'incloguessin mostres tractades únicament amb IFN γ permetria concloure inequívocament la implicació única d'aquesta citocina. En segon lloc, destaca l'important paper que desenvolupen els gens agrupats dins el mòdul blau en la resposta pro-inflamatòria, atès que 18 dels 25 processos biològics més significatius hi tenen relació. En canvi al clúster groc, els termes més alterats són aquells involucrats en la transcripció i l'apoptosi (Figura 27).



No obstant, en ambdós mòduls destaca una família de gens, les GBP (de l'anglès, *Guanylate-Binding Protein*). Aquestes proteïnes són GTPases, l'expressió de les quals s'indueix en presència d'interferons de tipus I i II, fet que les converteix en un indicador de la resposta cel·lular a aquests estímuls (Vestal, 2005). En macròfags i fibroblastes de ratolí s'han descrit 11 membres de la família que desenvolupen un paper important en la defensa contra virus i bacteris, a més de regular el creixement i la proliferació cel·lular (Vestal & Jeyaratnam, 2011). En canvi, no hi ha cap estudi que reporti la seva expressió a la micròglia. Per aquesta raó, la detecció de Gbp1, Gbp8 i Gbp10 al mòdul groc, juntament amb la presència de Gbp2-7 i Gbp9 al clúster blau permet descriure per primera vegada l'expressió microglial d'aquests gens, alhora que obre nous camins en l'estudi del paper de les cèl·lules microgials en la defensa contra patògens. A més, la detecció d'aquesta família confirma la capacitat de la micròglia per a respondre a la presència de l'IFN γ .

La resposta microglial enfront el tractament amb LPS sol o conjuntament amb l'IFN γ també queda àmpliament demostrada en estudiar els gens agrupats dins del mòdul blau i el seu perfil d'expressió. Així, l'augment dels nivells d' IL-1 β , Ptgs2 (COX2), NOS2, Cybb, IL-6, IL-12a, IL-12b i Tnfa entre d'altres gens proinflamatoris en resposta als tractaments amb LPS i LPS+IFN γ , valida el seu ús per a induir i estudiar l'activació microglial.

Per la seva banda, aquells gens agrupats dins els mòduls negre i turquesa, amb una marcada expressió en condicions fisiològiques però inhibida a conseqüència dels estímuls proinflamatoris, participen majoritàriament en processos de transcripció, transport i metabolisme (Figura 27). Malauradament, tot i que descriure les vies implicades en l'homeòstasi microglial que s'alteren en condicions d'inflamació és de gran interès, la gran quantitat i diversitat de gens que engloben aquests processos en complica la seva definició. No obstant, l'anàlisi de les vies KEGG afectades aporta informació valuosa, ja que mostra la implicació de 121 gens, els nivells dels quals disminueixen tant en el cas de l'estimulació amb LPS



com amb el cotractament, a les malalties de Huntington, Alzheimer i Parkinson (Figura 28).

L'estudi dels 64 gens comuns a les tres patologies revela que gran part dels processos en els quals participen tenen relació amb la funció mitocondrial (Figura 30). De fet, aquest orgàdul juga un important paper en el manteniment de l'homeòstasi del SNC, ja que el cervell és un dels òrgans amb un metabolisme més actiu i el mitocòndri és la principal font d'energia de les neurones. Per tant la disfunció mitocondrial és un dels factors més importants involucrats en la mort neuronal i un factor comú a les malalties neurodegeneratives (Carvalho et al, 2015). No obstant, l'anàlisi dels gens alterats específicament a cadascuna de les patologies revela altres característiques a nivell molecular que les diferencien.

El fenotip de tremolor en repòs, bradicinèsia, rigidesa i inestabilitat observat en malalts de Parkinson és conseqüència directa de la mort massiva de les neurones dopaminèrgiques localitzades a la substància negra. A les neurones que sobreviuen però, s'observa la presència dels cossos de Lewy, formats per agregats de proteïnes, principalment α -sinucleïna. El bon funcionament dels sistemes d'ubiquitinació i d'autofàgia garanteix l'eliminació d'aquests agregats evitant així els seus efectes tòxics. No obstant, l'alteració de gens implicats en aquests mecanismes és una de les característiques observades a la malaltia de Parkinson (De Rosa et al, 2015) (Figura 29). Així, les mutacions del gen Park2 que codifica una proteïna ubiquitina-ligasa E3 són una de les principals causes de l'inici de la forma autosòmica recessiva de la malaltia de Parkinson. El paper de Park2 a les neurones està associat amb la protecció contra l'estrès cel·lular i la regulació del cicle cel·lular i els seus nivells augmenten en estimular les cèl·lules neuronals amb rotenona o àcid kainic. En canvi, l'expressió de Park2 microglial disminueix a nivell d'ARNm i proteïna en resposta al tractament amb LPS (Tran et al, 2011). Aquests resultats concorden amb les dades obtingudes en el present treball, on els nivells d'ARNm de Park2 disminueixen en tractar la micròglia primària amb LPS i LPS+IFN γ . A més, (Tran et al, 2011) demostren que la deleció de Park2 exacerba la resposta proinflamatòria, ja que l'expressió de Tnf α , IL-1 β i NOS2 augmenta.



Aquestes dades suggereixen una interacció entre la neuroinflamació i Park2, que caldrà estudiar més detingudament, ja que encara no es coneixen les implicacions funcionals d'aquests resultats. Per una banda, podria ésser necessària una disminució de l'expressió de Park2 per a que es donés una correcta resposta inflamatòria a qualsevol alteració de l'homeòstasi del SNC. D'altra banda però, la no recuperació dels nivells de Park2 podria resultar en una activació microglial crònica i neurotòxica.

Un cas semblant és el del gen Park7, les mutacions del qual també s'associen al desenvolupament del parkinsonisme autosòmic i recessiu. La funció de Park7 a la micròglia resulta ésser antiinflamatòria, atès que la micròglia genoanul·lada tractada amb IFN γ mostra un increment dels nivells de NOS2, COX2 i Tnfa (Kim et al, 2013). Aquests resultats suggereixen que la disminució de la seva expressió aquí observada en resposta als estímuls proinflamatoris, està relacionada amb l'activació microglial i amb una reducció de la resposta antiinflamatòria. A dia d'avui, però no s'ha reportat cap efecte del LPS o l'IFN γ sobre els nivells de Park7 a les cèl·lules microgials i per tant, caldrà estudiar els efectes funcionals d'aquesta reducció en estudis posteriors per tal de definir un possible potencial d'aquest gen com a diana terapèutica.

Finalment, les mutacions del gen Pink1 s'han identificat també com a responsables de l'inici de la forma autosòmica recessiva de la malaltia de Parkinson. Pink1 participa en el metabolisme mitocondrial, l'estrès oxidatiu i la degradació de proteïnes ubiquitinades, a més de regular la funció de Park2 (Gaki & Papavassiliou, 2014). Estudis realitzats emprant el peix zebra (*Danio rerio*) com a model animal demostren que la deleció de Pink1 resulta en una marcada activació microglial (Flinn et al, 2013). Per tant, no és difícil especular sobre una relació entre la reducció de l'expressió de Pink1 i la resposta microglial als tractaments amb LPS i LPS+IFN γ .

En canvi, els dèficits de memòria juntament amb els dipòsits de proteïna β -amiloide, la hiperfosforilació de Tau i la degeneració sinàptica i neuronal són



característiques distintives de la malaltia d'Alzheimer. La mutació del gen App va ser la primera que es va associar a la patologia i és la responsable de la producció del pèptid neurotòxic A β de 42 aminoàcids. La proteïna d'App és modificada a nivell post-traducciona per les secretases α , β i γ . No obstant, és l'acció dels enzims β (Bace1) i γ la que genera el pèptid A β . Les presenilines (Psen1 i Psen2) són els components catalítics de la secretasa γ que no només participen en l'escissió d'App, si no que juntament amb les secretases α , Adam10/Adam17, actuen sobre Notch alliberant el seu domini intracel·lular (NCID) que transloca al nucli on actua com a modulador de la transcripció (Woo et al, 2009). El processament d'App per part de les secretases α , concretament Adam10, evita la formació del pèptid A β . De fet, la sobreexpressió d'Adam10 en un model animal de la malaltia d'Alzheimer alleuja els dèficits cognitius de la patologia i augmenta la sinaptogènesi cortical, fet que indica un paper neuroprotector de la metalloproteinasa (Prinzen et al, 2009). Tot i la manca d'estudis sobre els efectes funcionals de la reducció d'Adam10 a les cèl·lules microgials en resposta a estímuls proinflamatoris, aquestes dades suggereixen un possible efecte perjudicial de la disminució observada al present anàlisi. Contràriament, l'acció d'ApoE, una proteïna associada als agregats d'A β i important factor de risc genètic a la malaltia d'Alzheimer, sembla afavorir el dipòsit de les plaques alhora que dificulta la seva eliminació per part de les cèl·lules microgials (Mulder et al, 2014). Així, en aquest cas, la disminució de l'expressió del gen a les mostres microgials aquí analitzades podria afavorir la funció fagocítica de la micròglia i per tant contribuir a la disminució de la neurotoxicitat.

La malaltia de Huntington és hereditària i es caracteritza per la disfunció i mort neuronal a l'estriat i a l'escorça cerebral. L'expansió de la repetició del triplet CAG localitzat a prop de l'extrem 5' del primer exó del gen Htt és la principal causa de la neurodegeneració observada. La patologia es manifesta quan el nombre de repeticions és superior a 35, existint una relació inversa entre el nombre de repeticions i l'edat a la que apareixen els primers símptomes i la seva severitat (Perez-Navarro et al, 2006). A més, la proteïna mutada es localitza



predominantment al nucli, mentre que la Htt no modificada es troba al citoplasma. Tant els agregats de la proteïna mutant com la seva forma soluble promouen l'activació de proteases, el plegament incorrecte de les proteïnes, la disfunció sinàptica i l'alteració de la transcripció. De fet, la desregulació de la transcripció és una de les principals característiques observades als malalts de Huntington.

Un dels factors de transcripció que regula positivament l'expressió de Htt és Sp1 (Wang et al, 2012a). Tot i que l'efecte de la relació entre Sp1 i Htt sobre la patologia no és clar, els resultats reportats podrien indicar que la disminució de l'expressió de Sp1 aquí descrita podria resultar en una reducció de l'expressió de Htt, fet que disminuiria la toxicitat dels agregats de la seva proteïna. L'afectació de la transcripció observada a la patologia també pot ésser causada per una acetilació anormal de les histones. De fet, l'administració d'un inhibidor selectiu de Hdac2 resulta en la reducció del fenotip patològic en un model animal de la malaltia (Mielcarek et al, 2011). Aquesta dada novament permet especular sobre l'efecte protector de la reducció de l'expressió del Hdac2 observada a la micròglia activada.

Finalment, s'ha observat un augment de l'expressió de Bax, un gen pro-apoptòtic, en un model animal de la malaltia de Huntington. Aquest fet resulta en un increment de la mort cel·lular per apoptosi que correlaciona amb l'agreujament de la patologia (Teles et al, 2008). Aquestes dades s'obtenen analitzant els nivells d'ARN de Bax a homogenats d'escorça i de cerebel i observant la morfologia dels nuclis cel·lulars en aquestes zones. En aquest estudi però, no s'identifica quin tipus cel·lular del SNC experimenta aquest tipus de mort. Per tant, des d'aquí només es pot especular sobre l'efecte de la disminució de Bax a la micròglia que s'observa en tractar aquestes cèl·lules amb LPS i LPS+IFN γ . Així, si la reducció de Bax microglial comporta un augment de la fagocitosi de neurones apoptòtiques a causa de la presència d'un major nombre de cèl·lules microgials, la inhibició de Bax podria resultar protectora. Tot i això, una proliferació microglial excessiva podria ésser perjudicial si es produís una reacció inflamatòria exacerbada. Així, novament es conclou la necessitat de continuar investigant per tal d'entendre els mecanismes



que condueixen a la mort neuronal en aquesta malaltia i quin paper hi juguen les cèl·lules microglials.

Així doncs, les dades experimentals obtingudes en el nostre treball, mostren que l'activació de la micròglia primària disminueix l'expressió tant de gens comuns com d'específics de les malalties de Parkinson, Alzheimer i Huntington. A més, l'anotació dels gens comuns revela la seva implicació en els processos relacionats amb la producció energètica que té lloc al mitocòndri com una característica patològica comuna a les tres malalties. En canvi, els gens propis distingeixen vies moleculars pròpies de cadascuna d'elles. Exemples en serien l'afectació de les vies dopaminèrgiques, el procés d'ubiquitinació i autofàgia i les alteracions motores a la malaltia de Parkinson, l'alteració de la via de senyalització de Notch, el catabolisme d'App i el metabolisme del pèptid A β en el cas de l'Alzheimer i finalment, la desregulació de la transcripció i l'apoptosi caracteritzarien la patologia de Huntington.

El paper de la micròglia en aquestes malalties neurodegeneratives s'associa principalment a la inflamació, fet que sovint condueix a concloure que la inhibició d'aquesta resposta resultaria ésser neuroprotectora. No obstant, els gens característics de cada patologia aquí analitzats, tot i representar una mostra molt reduïda del conjunt de gens alterats, no permeten atorgar un paper exclusivament patològic a l'activació microglial. Així, mentre que la disminució de gens com ApoE, Sp1, Hdac2 i Bax observada a la micròglia activada podria reduir la mort neuronal, la reducció dels nivells Park2, Park7, Pink1 i Adam10 per contra exacerbaria la neurotoxicitat. Així doncs, és necessari aprofundir en l'estudi de l'expressió i la funció d'aquests gens a les cèl·lules de la micròglia ja que sovint els estudis es realitzen en neurones i el paper dels gens pot variar segons el tipus cel·lular on s'expressin, tal i com s'ha reportat en el cas de Park2 (Tran et al, 2011).



5.2.2 Anàlisi dels gens expressats diferencialment a la micròglia C/EBP β ^{fl/fl} tractada amb LPS i LPS+IFN γ durant 6h.

La seqüenciació de l'ARN permet no només detectar aquells ARNs que seran traduïts a proteïnes, sino que també resulta ser una eina per a descriure totes aquelles espècies no codificants presents a les mostres d'interès. No obstant, el fet que aquests ARNs no codifiquin per a proteïnes no significa que no continguin informació o no desenvolupin una funció. Malauradament, tot i haver-se descrit la seva implicació en el control de la dinàmica dels cromosomes, el procés d'*splicing*, l'edició de l'ARN, la inhibició de la traducció i la degradació de l'ARNm encara es disposa de poca informació sobre el seu paper biològic (Mattick & Makunin, 2006). En conseqüència, les dades aquí presentades només ens permeten concloure el marcat efecte dels estímuls proinflamatoris LPS i LPS+IFN γ sobre la seva expressió, atès que caldrà disposar de més informació per tal d'inferir les conseqüències biològiques d'aquestes alteracions.

L'efecte dels tractaments és també remarcable en el cas dels gens codificants per a proteïnes, ja que una tercera part d'aquestes seqüències detectades veuen alterada la seva expressió tant en tractar la micròglia amb LPS sol com conjuntament amb l'IFN γ . A més, cal destacar que en ambdós casos el percentatge de gens que experimenten un augment dels seus nivells en resposta als estímuls és semblant tot i que lleugerament superior al nombre de gens que veuen reduïda la seva expressió. Aquesta semblança pot resultar sorprenent si es considera que la funció microglial al SNC és únicament la de respondre a qualsevol estimul patològic amb l'objectiu de restaurar l'homeòstasi. Les dades però semblen corroborar un paper actiu de la micròglia no activada, descrit recentment en detriment del cada vegada més qüestionat model de la "micròglia quiescent" (Gomez-Nicola & Perry, 2015). Així, davant dels estímuls proinflamatoris molts dels gens funcionals en condicions fisiològiques veurien reduïda la seva expressió, alhora que augmentaria la d'aquells implicats en l'activació microglial.



Per la seva banda, la quantitat de gens afectats en comparar les dues condicions tractades, LPS+IFN γ respecte LPS, és sensiblement menor que l'observada en estimular la micròglia no activada. Aquestes dades confirmen la hipòtesi que l'alteració del perfil transcriptòmic microglial és major en passar d'un estat quiescent a un d'activat, que en comparar dos fenotips activats.

Pel que fa al l'IFN γ , les dades actuals no permeten definir amb claredat quin tipus de sinèrgia estableix amb el LPS, atès que la comparació entre els canvis que es produeixen en tractar amb LPS+IFN γ amb aquells observats en resposta només al LPS revela que el nombre de gens induïts és quasi idèntic al nombre d'inhibits. Així doncs, sembla que l'IFN γ tant pot actuar com a potenciador de l'efecte del LPS o com a inhibidor.

L'alteració de l'expressió de gran part dels gens en més d'una situació, fa necessari realitzar una anàlisi per a identificar quants són comuns i quins canvien específicament a cadascuna de les comparacions. Així, tot i compartir més de 3000 gens expressats diferencialment, els resultats permeten diferenciar el perfil d'activació induït pel LPS d'aquell observat en resposta al tractament amb LPS+IFN γ . Una primera ullada als termes GO enriquits, en estudiar els 935 gens únics del primer cas i els 644 del segon, revela que les vies relacionades amb la transcripció són les més alterades en ambdues situacions. Aquest resultat no és sorprenent, ja que qualsevol estímul que provoqui un canvi cel·lular afectarà d'alguna manera al patró dels gens expressats per les cèl·lules, provocant canvis transcripcionals. No obstant, els reguladors transcripcionals afectats sí són diferents:

Dins del grup de gens alterats en activar la micròglia amb LPS destaquen els factors de transcripció Atf1, C/EBP δ i Myc. El primer regula gens involucrats en el creixement i la supervivència cel·lular i a macròfags i el LPS indueix la fosforilació del seu residu Ser⁶³ potenciant així la seva activitat transcripcional (Caivano & Cohen, 2000). C/EBP δ , a banda de la resposta inflamatòria, regula entre d'altres els processos de diferenciació d'adipòcits i de cèl·lules mieloides, així com la mort



cel·lular per apoptosi (Gery et al, 2005). A més prèviament, estudis del nostre grup han demostrat l'increment dels seus nivells en resposta al LPS a cultius primaris de glia mixta (Ejarque-Ortiz et al, 2010) Finalment, Myc participa en l'apoptosi, la transformació i la progressió del cycle cel·lular i en presència del LPS la seva expressió disminueix (Ellert-Miklaszewska et al, 2013).

En canvi, Hdac9, Sirt1 i Jmjd6 són exemples de gens afectats en tractar la micròglia no activada amb LPS+IFN γ . L'acetilació/desacetilació de les histones altera l'estructura cromosòmica i afecta l'accés dels factors de transcripció a l'ADN. Hdac9 és membre de la família de les histona deacetilases implicada en el metabolisme, la inflamació i la proliferació cel·lular (Parra, 2015), l'expressió de la qual no s'ha descrit a les cèl·lules de la micròglia. La Sirt1 també és una histona desacetilasa que juga un paper clau en la resposta antiinflamatòria i en presència del LPS la seva expressió a la línia microglial N9 es redueix (Liu et al, 2015). Per últim, l'expressió de la histona desmetilasa Jmjd6 implicada en la fagocitosi de cèl·lules apoptòtiques i la regulació epigenètica entre d'altres funcions biològiques (Bottger et al, 2015) no s'ha descrit a la micròglia.

Així, les funcions d'aquests gens suggereixen que l'apoptosi és un procés relacionat amb l'activació amb LPS, mentre que la modificació epigenètica de la cromatina és característica de la resposta al LPS+IFN γ . Una ullada als GO alterats confirma aquesta hipòtesi (Figura 32).

Entre els processos més afectats pels tractaments, és d'esperar trobar-hi aquells relacionats amb la resposta inflamatòria si es considera el paper de la micròglia com a cèl·lula del sistema immunitari del SNC i l'activació que experimenta en resposta als estímuls proinflamatoris LPS i IFN γ . Efectivament, aquesta alteració queda reflectida en analitzar aquells gens (474) afectats tant en el procés d'activació induït pel LPS i el LPS+IFN γ com en la comparació entre els dos estats d'activació (Figura 32).



La revisió dels 50 gens més afectats, tant per l'augment com per la reducció de la seva expressió, revela però que gran part dels gens relacionats amb la inflamació veuen incrementats els seus nivells en resposta als seus estímuls. Així, gens clàssicament considerats proinflamatoris com NOS2, IL-6, Tnf α , IL-1 α , IL-12b es troben dins d'aquests grup. A més, aquestes taules també aporten informació sobre l'efecte diferencial del LPS i el LPS+IFN γ sobre l'expressió d'aquests gens. Així, mentre que NOS2 és el gen més afectat pel tractament de la micròglia basal amb LPS, els nivells de la interleucina IL-6 són els més alterats per efecte del cotractament. Les diferències entre aquests dos estímuls també són visibles en analitzar l'expressió d'IL-23a, IL-10, Tlr2, Tlr13, Csf2, Csf3, Ccl4, Cxcl2 i Irf8. Novament, tots ells participen en la resposta inflamatòria microglial però mentre que el LPS indueix més fortament l'expressió dels vuit primers, el tractament amb LPS+IFN γ augmenta diferencialment els nivells d'Irf8. El conjunt d'aquests resultats suggereix doncs l'obtenció de dos fenotips activats diferents en emprar aquests estímuls, alhora que confirmen la capacitat del LPS i el LPS+IFN γ d'induir la resposta inflamatòria microglial.

Finalment, l'estudi d'aquells gens inhibits pels estímuls mostra un menor nombre de gens coincidents en comparar els canvis d'expressió que es produeixen en tractar la micròglia amb LPS i LPS+IFN γ . Així doncs, aquests resultats semblen indicar que els patrons d'expressió induïts pels tractaments difereixen més en aquells gens que no participen en la resposta proinflamatòria.

Tots aquests canvis però requereixen d'una acurada regulació de la transcripció gènica. Varis són els factors de transcripció relacionats amb l'activació microglial, entre ells C/EBP β . Tot i que estudis previs del grup (Straccia et al, 2011) (Straccia et al, 2013) han descrit l'efecte del factor de transcripció sobre l'expressió d'alguns dels gens implicats en la resposta de la micròglia enfront d'estímuls proinflamatoris, el paper de C/EBP β en aquest procés és poc conegut. Per aquesta raó, s'ha dut a terme una anàlisi del perfil transcriptòmic de la micròglia primària C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ tant en condicions basals com tractada amb LPS i LPS+IFN γ .



5.2.3 Canvis a l'expressió gènica de la micròglia primària en absència de C/EBPβ

La seqüenciació de l'ARN de la micròglia primària C/EBPβ^{fl/fl} i LysMCre-C/EBPβ^{fl/fl} confirma l'important paper de C/EBPβ a la regulació de l'expressió dels gens alterats durant l'activació microglial. Així, s'observa una clara separació entre les mostres no tractades i aquelles activades pel tractament. No obstant, mentre que en el primer cas no es distingeix cap subgrup, l'absència de C/EBPβ resulta en l'agrupament de les mostres segons el seu genotip en el cas dels tractaments. Aquesta classificació suggereix un marcat efecte de C/EBPβ sobre la transcripció dels gens que s'expressen a la micròglia activada. A més, cal destacar el fet que el comportament de les mostres ha estat l'esperat, fet que valida els resultats obtinguts (Figura 33A).

Una altra manera d'avaluar el paper del factor de transcripció en la resposta inflamatòria microglial és l'anàlisi dels gens expressats diferencialment en les condicions experimentals. Així, dels 15228 gens detectats a les mostres analitzades, 1068 s'alteren en eliminar C/EBPβ. Aquests gens representen el 10% dels 10888 que experimenten canvis significatius en la seva expressió. El fet que la deleció d'un sol factor de transcripció alteri l'expressió de la desena part dels gens implicats en l'activació microglial indica el gran nombre de processos i vies regulades de forma directa o indirecta pel C/EBPβ microglial (Figura 33B). Efectivament, l'alteració del perfil transcriptòmic microglial que es produeix en eliminar el factor de transcripció és heterogènia, podent-se identificar fins a 13 patrons diferents (Figura 33C). Així, la deleció de C/EBPβ tant pot resultar en la disminució com en l'augment de l'expressió de gens en condicions basals com en l'atenuació o l'increment dels nivells gènics en resposta als tractament.

Un d'aquests gens afectats és el receptor de la fractalquina CX3CR1, l'expressió del qual disminueix durant l'activació microglial, però l'absència de C/EBPβ atenua aquesta reducció (Figura centroids mòdul B). L'eix CX3CL1/CX3CR1, juntament amb CD200/CD200R, s'ha estudiat àmpliament per la seva implicació en la reducció de la resposta inflamatòria microglial, d'entre d'altres importants funcions



que desenvolupa al SNC. De fet, en molts paradigmes experimentals implicats amb la neuroinflamació, la deleció de CX3CR1 resulta en un augment de la neurotoxicitat microglial (Limatola & Ransohoff, 2014). Aquestes dades suggereixen que l'ablació de C/EBP β podria contribuir a la disminució de l'efecte tòxic de la micròglia activada.

Varis membres de la família de receptors de tipus *Toll* implicada en el reconeixement de diferents patrons moleculars associats a patògens i amb un paper important en la resposta immune innata també mostren un patró d'expressió alterat en absència del factor de transcripció. En aquest cas però, l'efecte no és homogeni, atès que mentre els nivells de Tlr1, Tlr7 i Tlr9 augmenten en deleccionar C/EBP β , l'expressió de Tlr8 disminueix. Aquesta reducció també s'observa en el cas de gens considerats clàssicament proinflamatoris com Csf3, Cybb, IL-1 α , IL-23a i Ptgs2 (COX2). Així doncs, no resulta estrany trobar aquestes dues respostes entre els 25 processos biològics més afectats en eliminar el factor de transcripció.

La representació dels patrons d'expressió dels gens implicats permet estudiar de manera individual els canvis que es produeixen i atès que no s'han realitzat estudis funcionals, especular sobre els possibles efectes d'aquestes alteracions. Així, la reducció de l'expressió de gens com Ptgs2 (COX2) i IL-23a podria explicar la reducció de la simptomatologia observada en absència de C/EBP β al model animal EAE, ja que la inhibició farmacològica del primer i l'eliminació del segon resulta ésser neuroprotectora (Ni et al, 2007) (Thakker et al, 2007). No obstant, l'increment de l'expressió d'altres gens com Irf8, Tlr7 i Tlr9 podria no resultar ésser beneficiós. Així, l'augment dels nivells del factor de transcripció Irf8 s'ha relacionat amb l'activació de la via de TGF β i l'exacerbació de la neuroinflamació en aquest model (Yoshida et al, 2014), mentre que els dos receptors Tlr7 i Tlr9 potencien la progressió de la malaltia (Gambuzza et al, 2011). Abans d'inferir conclusions però, cal recordar en primer lloc que en cap d'aquests treballs s'ha estudiat el paper d'aquests gens específicament a les cèl·lules de la micròglia. Aquest no és un afer trivial, ja que la funció d'un gen pot variar segons el tipus cel·lular on s'expressi, sent-ne el propi C/EBP β un clar exemple, atès el paper en la resposta inflamatòria



que desenvolupa a les cèl·lules glials mentre que a les neurones participa en la plasticitat sinàptica. A més, també cal considerar els diferents models aquí comparats. Així, mentre l'anàlisi transcriptòmica s'ha realitzat emprant cèl·lules microglials primàries tractades de forma aguda a 6h, el model EAE es realitza en animals adults avaluats durant setmanes, on a més les cèl·lules microglials interaccionen amb aquelles cèl·lules que les envolten. Aquestes diferències poden afectar al perfil transcriptòmic fet que no sigui comparable, atès que els gens que participen en la neurodegeneració al model EAE poden no expressar-se en tractar la micròglia primària a 6h, fet que impediria identificar totes les dianes de C/EBP β implicades a la patologia.

Diferents estudis han relacionat l'expressió de C/EBP β amb la mort cel·lular per apoptosi, reportant diferents resultats segons el tipus cel·lular estudiat i l'expressió de les diferents isoformes del factor de transcripció. Així, mentre en monòcits (Tamura et al, 2015) i neurones (Pena-Altamira et al, 2014) primàries l'expressió de C/EBP β , concretament de les isoformes Full i LAP, resulta ésser antiapoptòtica, a les cèl·lules de neuroblastoma el factor de transcripció indueix la seva mort mitjançant l'activació de p53 (Cortes-Canteli et al, 2002). L'alteració de gens implicats en aquest procés com Bcl2 i Casp2 suggereixen un paper encara no descrit de C/EBP β en la mort microglial per apoptosi. Bcl2 és un gen anti-apoptòtic l'expressió del qual és capaç d'inhibir la mort cel·lular induïda pel tractament amb LPS+IFN γ . En canvi, Casp2 s'activa en resposta a aquests estímuls afavorint l'apoptosi (Mayo & Stein, 2007). Així, l'augment dels nivells de Bcl2 i la reducció de Casp2 en absència del factor de transcripció suggereixen una funció pro-apoptòtica de C/EBP β microglial. Malauradament, al present estudi però no s'ha pogut demostrar aquest paper, atès que els experiments realitzats (Figura 18) no revelen diferències entre la micròglia C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i la LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. Dos factors podrien explicar aquesta discrepància. D'una banda, podria ésser que altres factors no regulats per C/EBP β participessin en aquest procés i per tant la deleció del factor de transcripció no pogués revertir-lo. D'altra banda, potser caldria modificar el



protocol emprat per a avaluar la mort cel·lular, ja que podria no ésser el més adient per a detectar diferències entre els genotips.

La fagocitosi té lloc quan la cèl·lula fagocítica envolta el patogen i l'interioritza en unes vesícules anomenades fagosomes. No obstant, per tal d'eliminar l'agent extern cal que es produeixi la fusió entre el fagosoma i el lisosoma, atès que aquest últim conté els enzims necessaris per a digerir-lo. Un dels mecanismes capaços d'iniciar el procés de fagocitosi és el reconeixement de la regió Fc d'un anticòs unit a un patogen per part dels receptors de tipus Fc localitzats a la membrana cel·lular del fagòcit. Gran part dels gens d'aquesta via afectats per l'absència de C/EBP β estan relacionats amb el procés de remodelació del citoesquelet que es produeix per tal d'internalitzar allò que la cèl·lula ha de fagocitar. El fet que la deleció del factor de transcripció atenuï la reducció que experimenta la seva expressió en resposta als tractaments proinflamatoris o bé n'augmenti els nivells, suggereixen un possible increment de la funció fagocítica en absència de C/EBP β . Per la seva banda, el patró d'expressió observat en el cas dels gens implicats en la via lisosomal també sembla indicar una major capacitat per a eliminar els patògens fagocitats en eliminar el factor de transcripció. Aquestes dades concorden amb allò observat en infectar les cèl·lules microgials C/EBP $\beta^{fl/fl}$ i LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ prèviament tractades amb LPS i LPS+IFN γ amb el bacteri *Salmonella Typhimurium*, ja que tot i les subtils diferències pel que fa a la capacitat d'internalitzar els bacteris, en absència del factor de transcripció la capacitat per a eliminar els patògens augmenta (Figura 19).

Tal i com ja s'ha comentat però, aquestes dades resulten sorprenents, ja que estudis anteriors mostren una major susceptibilitat a la infecció bacteriana en aquelles cèl·lules on s'ha eliminat l'expressió del factor de transcripció (Pizarro-Cerda et al, 1999) (Tanaka et al, 1995) (Screpanti et al, 1995). No obstant, novament la utilització de diferents tipus cel·lulars i l'aplicació de diferents protocols experimentals podria ésser la causa d'aquestes discrepàncies. Tot i això, continuar avaluant la capacitat de C/EBP β microglial per a modular la funció fagocítica, podria ésser d'interès en futurs estudis, atesa la importància d'eliminar tant

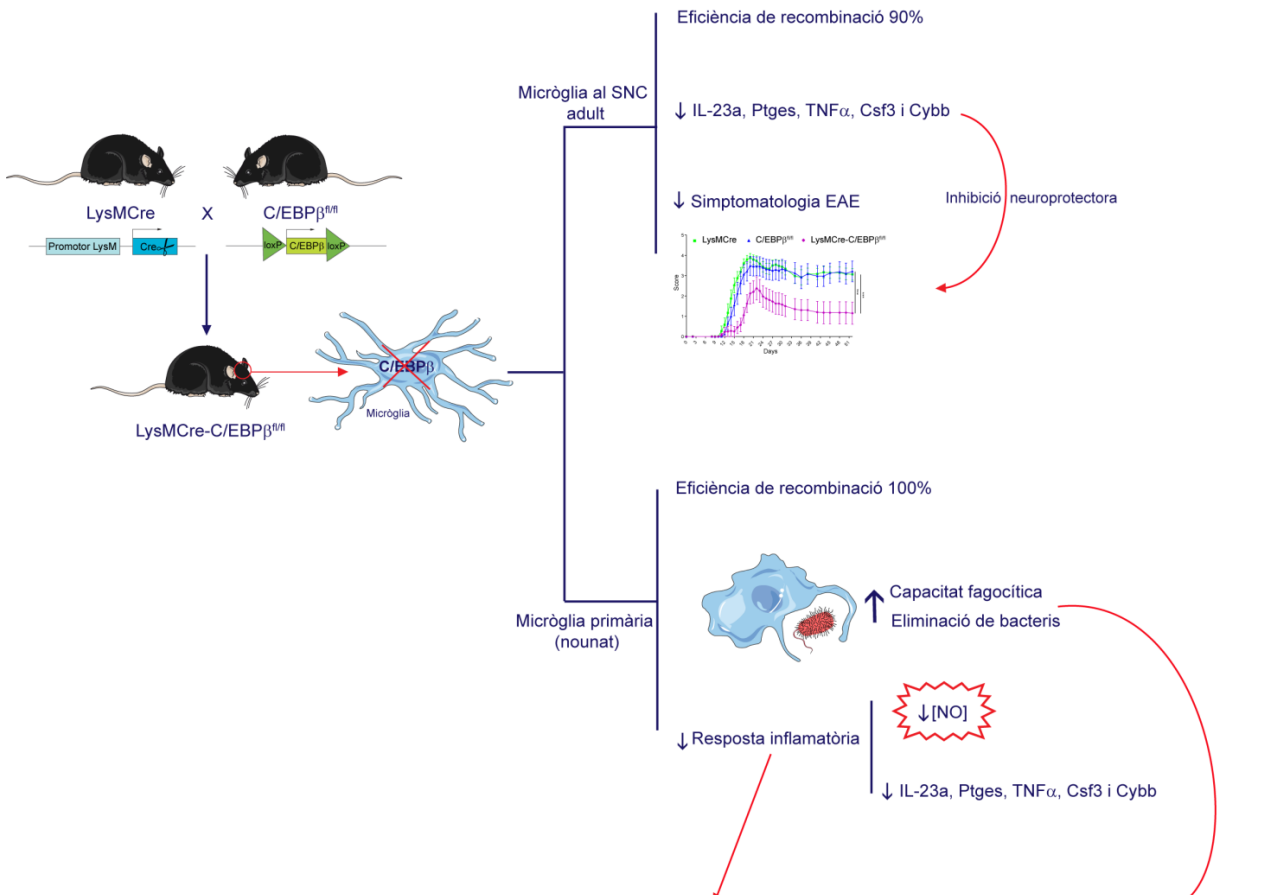


patògens que puguin alterar el SNC com cèl·lules apoptòtiques o agregats proteics neuro tòxics.

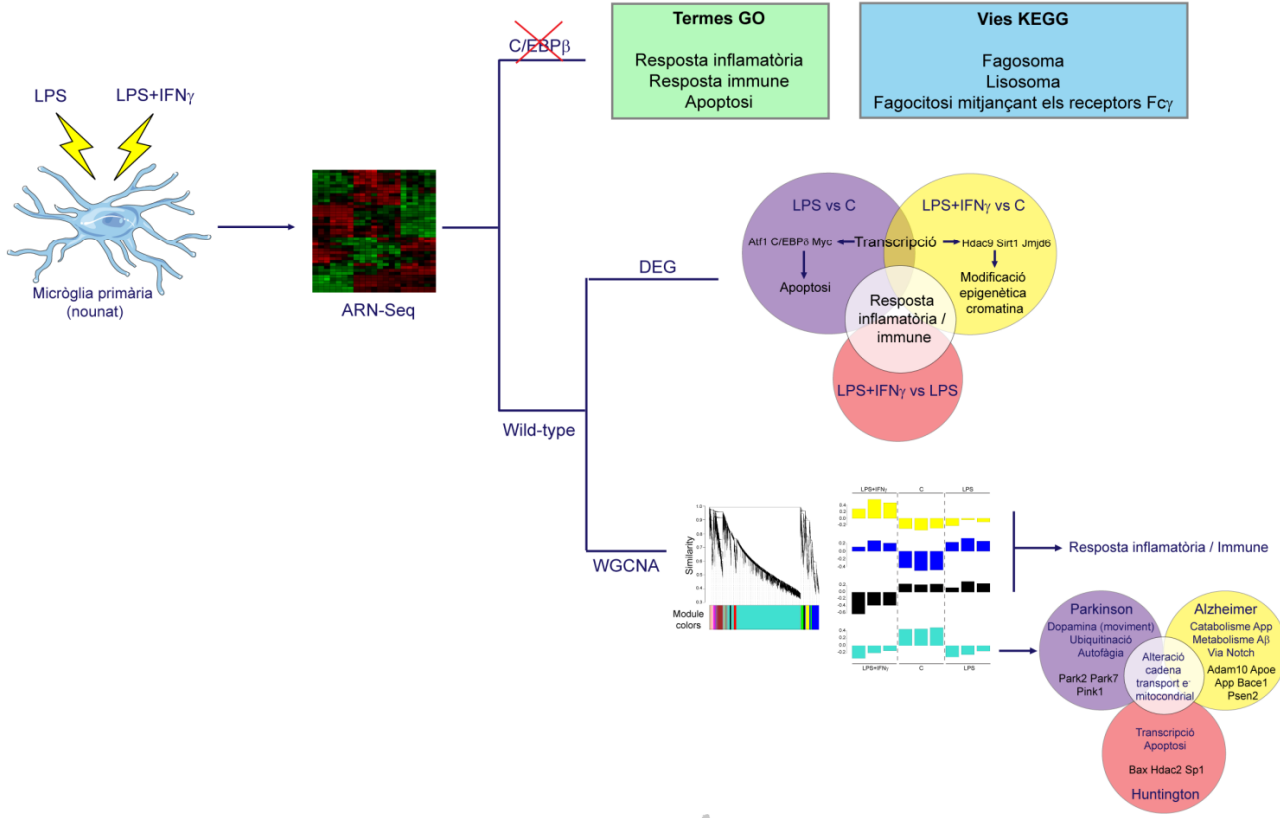
Finalment, a continuació es presenten de forma esquemàtica els resultats més rellevants d'aquesta tesi doctoral:

En primer lloc, s'ha observat que el 100% de la micròglia primària LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ és deficient en C/EBP β , mentre que al SNC adult el factor de transcripció s'ha deletat al 90% d'aquestes cèl·lules. A més, l'absència de C/EBP β resulta en una disminució de la resposta inflamatòria microglial tant *in vitro* com *in vivo*. Molt possiblement aquesta reducció és la responsable de l'atenuació de la simptomatologia pròpia del model d'esclerosi múltiple, EAE, observada als animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. En segon lloc, la seqüenciació de l'ARN de la micròglia primària tractada amb LPS i LPS+IFN γ permet aprofundir en l'estudi dels processos biològics que tenen lloc durant l'activació microglial. Per una banda, l'anàlisi WGCNA mostra l'agrupació dels transcrits detectats en 12 mòduls segons el seu patró d'expressió. No obstant, només l'expressió dels gens continguts als mòduls groc, blau, negre i turquesa correlaciona significativament amb els tractaments. A més, l'anotació d'aquest últim revela la implicació dels gens inhibits pels estímuls proinflamatoris a les malalties de Parkinson, Alzheimer i Huntington. D'altra banda, l'anàlisi dels gens diferencialment expressats (DEG) revela que els canvis d'expressió que es produeixen tant en activar la micròglia amb LPS com amb LPS+IFN γ tenen relació amb la resposta inflamatòria i immune microglial. L'alteració de la transcripció també és comuna, però en el cas del LPS aquests canvis afecten al procés d'apoptosi, mentre que el LPS+IFN γ provoca modificacions epigenètiques a la cromatina. Per últim, la seqüenciació de la micròglia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ mostra que en absència de C/EBP β es modifica la resposta inflamatòria i immune microglial, el procés d'apoptosi i les vies del fagosoma, el lisosoma i la fagocitosi mitjançant els receptors Fc γ .





DISCUSSIO



6. CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. La colònia LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ es deficient en el factor de transcripció C/EBP β selectivament a les cèl·lules microgials, tant *in vitro* com *in vivo*. Per tant, a causa de la seva alta eficiència i especificitat, el promotor de la lisozima M resulta ésser una bona elecció per a controlar l'expressió de la recombinasa Cre a les cèl·lules de la micròglia.
2. A diferència d'allò observat en el cas dels animals on l'expressió de C/EBP β s'ha deletat a tots els tipus cel·lulars, els ratolins LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$ són fèrtils i viables i no presenten alteracions destacables a òrgans i teixits.
3. C/EBP β juga un paper important en la funció fagocítica microglial. La seva deficiència promou tant la fagocitosi com l'eliminació dels bacteris internalitzats i altera l'expressió dels gens implicats en les vies del fagosoma i del lisosoma.
4. C/EBP β participa en la resposta inflamatòria microglial. Així, tant l'expressió de gens considerats clàssicament proinflamatoris com la producció de NO es veuen clarament reduïdes en eliminar el factor de transcripció a les cèl·lules microgials.
5. L'absència de C/EBP β microglial resulta neuroprotectora al model animal d'esclerosi múltiple, EAE, atès que s'observa una disminució de la simptomatologia als animals LysMCre-C/EBP $\beta^{fl/fl}$. A més, l'augment dels nivells del factor de transcripció que s'observa a mostres de pacients amb esclerosi múltiple recolza la inhibició de C/EBP β com a una possible estratègia terapèutica.



6. La seqüenciació de l'ARN de micròglia primària permet detectar prop de 15000 transcrits, codificants i no codificants, dels quals 10888 experimenten canvis d'expressió en tractar amb LPS sol o conjuntament amb l'IFN γ .
7. L'anàlisi WGCNA agrupa els gens detectats en 12 mòduls diferents segons el seu patró d'expressió. D'aquests, només 4 correlacionen significativament amb els tractaments amb LPS i LPS+IFN γ . Així, els 533 gens del mòdul groc i els 1170 del blau augmenten la seva expressió en resposta als estímuls proinflamatoris, mentre que els nivells dels 433 gens del mòdul negre i els 9344 del turquesa disminueixen. Finalment, l'anotació dels gens agrupats dins del mòdul turquesa mostra la seva implicació a les malalties de Parkinson, Alzheimer i Huntington.
8. El tractament amb LPS indueix canvis d'expressió significatius a 4684 gens, mentre que el cotractament amb LPS+IFN γ n'altera 4397. En ambdós casos, el nombre de gens que augmenten és quasi idèntic al nombre que disminueix. De fet, el fenotip microglial que s'obté en estimular la micròglia primària amb LPS presenta característiques comunes amb la micròglia activada en resposta al LPS+IFN γ . No obstant, els dos estat d'activació presenten diferències. Així, el LPS indueix canvis relacionats amb l'apoptosi, mentre que el tractament amb LPS+IFN γ promou la modificació epigenètica de la cromatina.
9. La deleció de C/EBP β microglial afecta l'expressió de 1068 gens i resulta en una alteració important del perfil transcriptòmic de la micròglia primària. Les dades obtingudes confirmen el paper del factor de transcripció en la resposta inflamatòria i immune microglial, alhora que permetran analitzar en un futur els efectes de la seva deleció sobre sobre l'expressió de gens no codificants i els processos d'*splicing* alternatiu.



7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

Aguilar-Morante D, Cortes-Canteli M, Sanz-Sancristobal M, Santos A, Perez-Castillo A (2011) Decreased CCAAT/enhancer binding protein beta expression inhibits the growth of glioblastoma cells. *Neuroscience* **176**: 110-119

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM (2011) Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nature neuroscience* **14**: 1142-1149

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature neuroscience* **10**: 1538-1543

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* **25**: 25-29

Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of comparative neurology* **513**: 532-541

Bai T, Tanaka T, Yukawa K, Umesaki N, Matsumoto M, Akira S (2006) Impaired postnatal development in C/EBPbeta-deficient mice. *The Journal of reproduction and development* **52**: 645-649

Balamurugan K, Sterneck E (2013) The many faces of C/EBPdelta and their relevance for inflammation and cancer. *International journal of biological sciences* **9**: 917-933

Bedard K, Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* **87**: 245-313

Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I (2005) Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* **106**: 3004-3011



Bialas AR, Stevens B (2013) TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nature neuroscience* **16**: 1773-1782

Biber K, de Jong EK, van Weering HR, Boddeke HW (2006) Chemokines and their receptors in central nervous system disease. *Current drug targets* **7**: 29-46

Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW (2007) Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends in neurosciences* **30**: 596-602

Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH (2006) Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *The Journal of biological chemistry* **281**: 11374-11383

Bolin LM, Strycharska-Orczyk I, Murray R, Langston JW, Di Monte D (2002) Increased vulnerability of dopaminergic neurons in MPTP-lesioned interleukin-6 deficient mice. *Journal of neurochemistry* **83**: 167-175

Bottger A, Islam MS, Chowdhury R, Schofield CJ, Wolf A (2015) The oxygenase Jmjd6--a case study in conflicting assignments. *The Biochemical journal* **468**: 191-202

Bright JJ, Kanakasabai S, Chearwae W, Chakraborty S (2008) PPAR Regulation of Inflammatory Signaling in CNS Diseases. *PPAR research* **2008**: 658520

Brown GC, Neher JJ (2010) Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Molecular neurobiology* **41**: 242-247

Buckwalter MS, Yamane M, Coleman BS, Ormerod BK, Chin JT, Palmer T, Wyss-Coray T (2006) Chronically increased transforming growth factor-beta1 strongly inhibits hippocampal neurogenesis in aged mice. *The American journal of pathology* **169**: 154-164

Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M (2005) Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Molecular and cellular neurosciences* **29**: 381-393



Caivano M, Cohen P (2000) Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages. *J Immunol* **164**: 3018-3025

Cardona AE, Huang D, Sasse ME, Ransohoff RM (2006a) Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nature protocols* **1**: 1947-1951

Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM (2006b) Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience* **9**: 917-924

Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A (2007) GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome biology* **8**: R3

Carvalho C, Correia SC, Cardoso S, Placido AI, Candeias E, Duarte AI, Moreira PI (2015) The role of mitochondrial disturbances in Alzheimer, Parkinson and Huntington diseases. *Expert review of neurotherapeutics* **15**: 867-884

Caton ML, Smith-Raska MR, Reizis B (2007) Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8⁺ dendritic cells in the spleen. *The Journal of experimental medicine* **204**: 1653-1664

Ciesielski-Treska J, Grant NJ, Ulrich G, Corrotte M, Bailly Y, Haeberle AM, Chasserot-Golaz S, Bader MF (2004) Fibrillar prion peptide (106-126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia. *Glia* **46**: 101-115

Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic research* **8**: 265-277

Coniglio SJ, Segall JE (2013) Review: molecular mechanism of microglia stimulated glioblastoma invasion. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **32**: 372-380



Cortes-Canteli M, Aguilar-Morante D, Sanz-Sancristobal M, Megias D, Santos A, Perez-Castillo A (2011) Role of C/EBPbeta transcription factor in adult hippocampal neurogenesis. *PLoS one* **6**: e24842

Cortes-Canteli M, Luna-Medina R, Sanz-Sancristobal M, Alvarez-Barrientos A, Santos A, Perez-Castillo A (2008) CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *Journal of cell science* **121**: 1224-1234

Cortes-Canteli M, Pignatelli M, Santos A, Perez-Castillo A (2002) CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* **277**: 5460-5467

Cunningham C, Boche D, Perry VH (2002) Transforming growth factor beta1, the dominant cytokine in murine prion disease: influence on inflammatory cytokine synthesis and alteration of vascular extracellular matrix. *Neuropathology and applied neurobiology* **28**: 107-119

Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A, Ceballos-Diaz C, Levites Y, Verbeeck C, Zubair AC, Dickson D, Golde TE, Das P (2010) Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Aβ deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**: 548-559

Chakrabarty P, Li A, Ceballos-Diaz C, Eddy JA, Funk CC, Moore B, DiNunno N, Rosario AM, Cruz PE, Verbeeck C, Sacino A, Nix S, Janus C, Price ND, Das P, Golde TE (2015) IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior. *Neuron* **85**: 519-533

Chechneva OV, Mayrhofer F, Daugherty DJ, Pleasure DE, Hong JS, Deng W (2011) Low dose dextromethorphan attenuates moderate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting NOX2 and reducing peripheral immune cells infiltration in the spinal cord. *Neurobiology of disease* **44**: 63-72

Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2014a) Are "resting" microglia more "m2"? *Frontiers in immunology* **5**: 594



Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2014b) Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of neuroinflammation* **11**: 98

Chiti Z, Knutsen OM, Betmouni S, Greene JR (2006) An integrated, temporal study of the behavioural, electrophysiological and neuropathological consequences of murine prion disease. *Neurobiology of disease* **22**: 363-373

Cho IH, Hong J, Suh EC, Kim JH, Lee H, Lee JE, Lee S, Kim CH, Kim DW, Jo EK, Lee KE, Karin M, Lee SJ (2008) Role of microglial IKKbeta in kainic acid-induced hippocampal neuronal cell death. *Brain : a journal of neurology* **131**: 3019-3033

Cho SH, Sun B, Zhou Y, Kauppinen TM, Halabisky B, Wes P, Ransohoff RM, Gan L (2011) CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* **286**: 32713-32722

Choi YR, Kang SJ, Kim JM, Lee SJ, Jou I, Joe EH, Park SM (2015) FcgammaRIIB mediates the inhibitory effect of aggregated alpha-synuclein on microglial phagocytosis. *Neurobiology of disease* **83**: 90-99

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience* **8**: 752-758

De Rosa P, Marini ES, Gelmetti V, Valente EM (2015) Candidate genes for Parkinson disease: Lessons from pathogenesis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **449**: 68-76

Deacon RM, Raley JM, Perry VH, Rawlins JN (2001) Burrowing into prion disease. *Neuroreport* **12**: 2053-2057

Deng L, Zhou JF, Sellers RS, Li JF, Nguyen AV, Wang Y, Orlofsky A, Liu Q, Hume DA, Pollard JW, Augenlicht L, Lin EY (2010) A novel mouse model of inflammatory bowel disease links mammalian target of rapamycin-dependent hyperproliferation of colonic epithelium to inflammation-associated tumorigenesis. *The American journal of pathology* **176**: 952-967



Dogan RN, Elhofy A, Karpus WJ (2008) Production of CCL2 by central nervous system cells regulates development of murine experimental autoimmune encephalomyelitis through the recruitment of TNF- and iNOS-expressing macrophages and myeloid dendritic cells. *J Immunol* **180**: 7376-7384

Dolfini D, Gatta R, Mantovani R (2012) NF- κ B and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **47**: 29-49

Ejarque-Ortiz A, Gresa-Arribas N, Straccia M, Mancera P, Sola C, Tusell JM, Serratosa J, Saura J (2010) CCAAT/enhancer binding protein delta in microglial activation. *Journal of neuroscience research* **88**: 1113-1123

Ejarque-Ortiz A, Medina MG, Tusell JM, Perez-Gonzalez AP, Serratosa J, Saura J (2007a) Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. *Glia* **55**: 178-188

Ejarque-Ortiz A, Tusell JM, Serratosa J, Saura J (2007b) CCAAT/enhancer binding protein- α is down-regulated by toll-like receptor agonists in microglial cells. *Journal of neuroscience research* **85**: 985-993

Ellert-Miklaszewska A, Dabrowski M, Lipko M, Sliwa M, Maleszewska M, Kaminska B (2013) Molecular definition of the pro-tumorigenic phenotype of glioma-activated microglia. *Glia* **61**: 1178-1190

Eugster HP, Frei K, Kopf M, Lassmann H, Fontana A (1998) IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology* **28**: 2178-2187

Falcone M, Rajan AJ, Bloom BR, Brosnan CF (1998) A critical role for IL-4 in regulating disease severity in experimental allergic encephalomyelitis as demonstrated in IL-4-deficient C57BL/6 mice and BALB/c mice. *J Immunol* **160**: 4822-4830

Fang KM, Wang YL, Huang MC, Sun SH, Cheng H, Tzeng SF (2011) Expression of macrophage inflammatory protein-1 α and monocyte chemoattractant protein-1 in glioma-infiltrating microglia: involvement of ATP and P2X(7) receptor. *Journal of neuroscience research* **89**: 199-211



Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, Wenning GK, Stefanova N (2013) Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia* **61**: 349-360

Fernandes A, Miller-Fleming L, Pais TF (2014) Microglia and inflammation: conspiracy, controversy or control? *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **71**: 3969-3985

Ferron M, Vacher J (2005) Targeted expression of Cre recombinase in macrophages and osteoclasts in transgenic mice. *Genesis* **41**: 138-145

Fields J, Ghorpade A (2012) C/EBPbeta regulates multiple IL-1beta-induced human astrocyte inflammatory genes. *Journal of neuroinflammation* **9**: 177

Flinn LJ, Keatinge M, Bretaud S, Mortiboys H, Matsui H, De Felice E, Woodroof HI, Brown L, McTighe A, Soellner R, Allen CE, Heath PR, Milo M, Muqit MM, Reichert AS, Koster RW, Ingham PW, Bandmann O (2013) TigarB causes mitochondrial dysfunction and neuronal loss in PINK1 deficiency. *Annals of neurology* **74**: 837-847

Frade JM, Barde YA (1998) Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* **20**: 35-41

Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, Ladner KJ, Bevan AK, Foust KD, Godbout JP, Popovich PG, Guttridge DC, Kaspar BK (2014) Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **81**: 1009-1023

Franco R, Fernandez-Suarez D (2015) Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in neurobiology* **131**: 65-86

Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y (2014) Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Molecular neurobiology* **49**: 1422-1434

Gaki GS, Papavassiliou AG (2014) Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular medicine* **16**: 217-230



Gambuzza M, Licata N, Palella E, Celi D, Foti Cuzzola V, Italiano D, Marino S, Bramanti P (2011) Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics for multiple sclerosis management. *Journal of neuroimmunology* **239**: 1-12

Garcia-Marin V, Garcia-Lopez P, Freire M (2007) Cajal's contributions to glia research. *Trends in neurosciences* **30**: 479-487

Garcia JA, Pino PA, Mizutani M, Cardona SM, Charo IF, Ransohoff RM, Forsthuber TG, Cardona AE (2013) Regulation of adaptive immunity by the fractalkine receptor during autoimmune inflammation. *J Immunol* **191**: 1063-1072

Gery S, Tanosaki S, Hofmann WK, Koppel A, Koeffler HP (2005) C/EBPdelta expression in a BCR-ABL-positive cell line induces growth arrest and myeloid differentiation. *Oncogene* **24**: 1589-1597

Ghosh S, Wu MD, Shafteel SS, Kyrkanides S, LaFerla FM, Olschowka JA, O'Banion MK (2013) Sustained interleukin-1beta overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**: 5053-5064

Gijbels K, Brocke S, Abrams JS, Steinman L (1995) Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Mol Med* **1**: 795-805

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**: 841-845

Ginhoux F, Jung S (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature reviews Immunology* **14**: 392-404

Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience* **7**: 45



Ginhoux F, Prinz M (2015) Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **7**: a020537

Goldmann T, Wieghofer P, Muller PF, Wolf Y, Varol D, Yona S, Brendecke SM, Kierdorf K, Staszewski O, Datta M, Luedde T, Heikenwalder M, Jung S, Prinz M (2013) A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nature neuroscience* **16**: 1618-1626

Gomez-Nicola D, Fransen NL, Suzzi S, Perry VH (2013) Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**: 2481-2493

Gomez-Nicola D, Perry VH (2015) Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **21**: 169-184

Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature reviews Immunology* **9**: 393-407

Graeber MB, Streit WJ (2010) Microglia: biology and pathology. *Acta neuropathologica* **119**: 89-105

Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, Leboeuf M, Kundig TM, Frei K, Ginhoux F, Merad M, Becher B (2012) Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity* **37**: 1050-1060

Guenther K, Deacon RM, Perry VH, Rawlins JN (2001) Early behavioural changes in scrapie-affected mice and the influence of dapsone. *The European journal of neuroscience* **14**: 401-409

Guillot-Sestier MV, Doty KR, Gate D, Rodriguez J, Jr., Leung BP, Rezai-Zadeh K, Town T (2015) Il10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron* **85**: 534-548



Halterman MW, De Jesus C, Rempe DA, Schor NF, Federoff HJ (2008) Loss of c/EBP-beta activity promotes the adaptive to apoptotic switch in hypoxic cortical neurons. *Molecular and cellular neurosciences* **38**: 125-137

Han MH, Lundgren DH, Jaiswal S, Chao M, Graham KL, Garris CS, Axtell RC, Ho PP, Lock CB, Woodard JI, Brownell SE, Zoudilova M, Hunt JF, Baranzini SE, Butcher EC, Raine CS, Sobel RA, Han DK, Weissman I, Steinman L (2012) Janus-like opposing roles of CD47 in autoimmune brain inflammation in humans and mice. *The Journal of experimental medicine* **209**: 1325-1334

Hanisch UK (2013) Functional diversity of microglia - how heterogeneous are they to begin with? *Frontiers in cellular neuroscience* **7**: 65

Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* **10**: 1387-1394

Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA (1989) Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 3803-3807

He Q, Wang Y, Lin W, Zhang Q, Zhao J, Liu FT, Tang YL, Xiao BG, Wang J (2014) Trehalose alleviates PC12 neuronal death mediated by lipopolysaccharide-stimulated BV-2 cells via inhibiting nuclear transcription factor NF-kappaB and AP-1 activation. *Neurotoxicity research* **26**: 430-439

Herculano-Houzel S, Mota B, Lent R (2006) Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 12138-12143

Hernandes MS, Cafe-Mendes CC, Britto LR (2013) NADPH oxidase and the degeneration of dopaminergic neurons in parkinsonian mice. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2013**: 157857

Hernandez-Encinas E, Aguilar-Morante D, Cortes-Canteli M, Morales-Garcia JA, Gine E, Santos A, Perez-Castillo A (2015) CCAAT/enhancer binding protein beta directly regulates



the expression of the complement component 3 gene in neural cells: implications for the pro-inflammatory effects of this transcription factor. *Journal of neuroinflammation* **12**: 14

Hickman SE, Allison EK, El Khoury J (2008) Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 8354-8360

Huggins CJ, Malik R, Lee S, Salotti J, Thomas S, Martin N, Quinones OA, Alvord WG, Olanich ME, Keller JR, Johnson PF (2013) C/EBPgamma suppresses senescence and inflammatory gene expression by heterodimerizing with C/EBPbeta. *Molecular and cellular biology* **33**: 3242-3258

Hughes MM, Field RH, Perry VH, Murray CL, Cunningham C (2010) Microglia in the degenerating brain are capable of phagocytosis of beads and of apoptotic cells, but do not efficiently remove PrPSc, even upon LPS stimulation. *Glia* **58**: 2017-2030

Hulshof S, Montagne L, De Groot CJ, Van Der Valk P (2002) Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia* **38**: 24-35

Hutchinson AJ, Chou CL, Israel DD, Xu W, Regan JW (2009) Activation of EP2 prostanoid receptors in human glial cell lines stimulates the secretion of BDNF. *Neurochemistry international* **54**: 439-446

Innamorato NG, Rojo AI, Garcia-Yague AJ, Yamamoto M, de Ceballos ML, Cuadrado A (2008) The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J Immunol* **181**: 680-689

Jacobs VL, Landry RP, Liu Y, Romero-Sandoval EA, De Leo JA (2012) Propentofylline decreases tumor growth in a rodent model of glioblastoma multiforme by a direct mechanism on microglia. *Neuro-oncology* **14**: 119-131

Jana M, Dasgupta S, Saha RN, Liu X, Pahan K (2003) Induction of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by interleukin-12 p40 monomer and homodimer in microglia and macrophages. *Journal of neurochemistry* **86**: 519-528



Jauhiainen A, Thomsen C, Strombom L, Grundevik P, Andersson C, Danielsson A, Andersson MK, Nerman O, Rorkvist L, Stahlberg A, Aman P (2012) Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. *PLoS one* **7**: e33208

Jayadev S, Nesser NK, Hopkins S, Myers SJ, Case A, Lee RJ, Seaburg LA, Uo T, Murphy SP, Morrison RS, Garden GA (2011) Transcription factor p53 influences microglial activation phenotype. *Glia* **59**: 1402-1413

Jiang T, Tan L, Zhu XC, Zhang QQ, Cao L, Tan MS, Gu LZ, Wang HF, Ding ZZ, Zhang YD, Yu JT (2014) Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **39**: 2949-2962

Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR (2000) Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* **20**: 4106-4114

Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, Katayama T, Kawashima S, Okuda S, Tokimatsu T, Yamanishi Y (2008) KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic acids research* **36**: D480-484

Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, Kalluri H, Johnson PF, Vemuganti R (2006) Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *Journal of neurochemistry* **98**: 1718-1731

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiological reviews* **91**: 461-553

Kfoury N, Kapatos G (2009) Identification of neuronal target genes for CCAAT/enhancer binding proteins. *Molecular and cellular neurosciences* **40**: 313-327

Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Holscher C, Muller DN, Luckow B, Brocker T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M (2013)



Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature neuroscience* **16**: 273-280

Kihara Y, Matsushita T, Kita Y, Uematsu S, Akira S, Kira J, Ishii S, Shimizu T (2009) Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 21807-21812

Kim HW, Rapoport SI, Rao JS (2011) Altered arachidonic acid cascade enzymes in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Molecular psychiatry* **16**: 419-428

Kim JH, Choi DJ, Jeong HK, Kim J, Kim DW, Choi SY, Park SM, Suh YH, Jou I, Joe EH (2013) DJ-1 facilitates the interaction between STAT1 and its phosphatase, SHP-1, in brain microglia and astrocytes: A novel anti-inflammatory function of DJ-1. *Neurobiology of disease* **60**: 1-10

Kiyota T, Okuyama S, Swan RJ, Jacobsen MT, Gendelman HE, Ikezu T (2010) CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**: 3093-3102

Kocieda VP, Adhikary S, Emig F, Yen JH, Toscano MG, Ganea D (2012) Prostaglandin E2-induced IL-23p19 subunit is regulated by cAMP-responsive element-binding protein and C/ATF enhancer-binding protein beta in bone marrow-derived dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* **287**: 36922-36935

Korner H, Riminton DS, Strickland DH, Lemckert FA, Pollard JD, Sedgwick JD (1997) Critical points of tumor necrosis factor action in central nervous system autoimmune inflammation defined by gene targeting. *The Journal of experimental medicine* **186**: 1585-1590

Lamkanfi M, Dixit VM (2012) Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annual review of cell and developmental biology* **28**: 137-161

Langfelder P, Horvath S (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC bioinformatics* **9**: 559



Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK (2014) voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome biology* **15**: R29

Liao Y, Smyth GK, Shi W (2013) The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic acids research* **41**: e108

Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**: 923-930

Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature medicine* **5**: 1403-1409

Limatola C, Ransohoff RM (2014) Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**: 229

Litteljohn D, Mangano E, Shukla N, Hayley S (2009) Interferon-gamma deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat. *Neuroscience* **164**: 1894-1906

Liu G, Liu Y, Jiang Q, Jiang Y, Feng R, Zhang L, Chen Z, Li K, Liu J (2015) Convergent Genetic and Expression Datasets Highlight TREM2 in Parkinson's Disease Susceptibility. *Molecular neurobiology*

Liu S, Croniger C, Arizmendi C, Harada-Shiba M, Ren J, Poli V, Hanson RW, Friedman JE (1999) Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBPbeta gene. *The Journal of clinical investigation* **103**: 207-213

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

Luo J, Elwood F, Britschgi M, Villeda S, Zhang H, Ding Z, Zhu L, Alabsi H, Getachew R, Narasimhan R, Wabl R, Fainberg N, James ML, Wong G, Relton J, Gambhir SS, Pollard JW, Wyss-Coray T (2013) Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured



neurons facilitates protection and survival. *The Journal of experimental medicine* **210**: 157-172

Lyons A, McQuillan K, Deighan BF, O'Reilly JA, Downer EJ, Murphy AC, Watson M, Piazza A, O'Connell F, Griffin R, Mills KH, Lynch MA (2009) Decreased neuronal CD200 expression in IL-4-deficient mice results in increased neuroinflammation in response to lipopolysaccharide. *Brain, behavior, and immunity* **23**: 1020-1027

Major J, Fletcher JE, Hamilton TA (2002) IL-4 pretreatment selectively enhances cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* **168**: 2456-2463

Majumdar A, Cruz D, Asamoah N, Buxbaum A, Sohar I, Lobel P, Maxfield FR (2007) Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Molecular biology of the cell* **18**: 1490-1496

Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* **41**: 535-547

Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S, Synowitz M, Ragué H, Stock K, Sliwa M, Lehmann S, Kalin R, van Rooijen N, Holmbeck K, Heppner FL, Kiwit J, Matyash V, Lehnardt S, Kaminska B, Glass R, Kettenmann H (2009) Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 12530-12535

Martinez-Canabal A (2015) Potential neuroprotective role of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in the brain. *The International journal of neuroscience* **125**: 1-9

Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* **6**: 13

Mattick JS, Makunin IV (2006) Non-coding RNA. *Human molecular genetics* **15 Spec No 1**: R17-29



Mayo L, Stein R (2007) Characterization of LPS and interferon-gamma triggered activation-induced cell death in N9 and primary microglial cells: induction of the mitochondrial gateway by nitric oxide. *Cell death and differentiation* **14**: 183-186

Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 599-609

Memet S (2006) NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochemical pharmacology* **72**: 1180-1195

Mielcarek M, Benn CL, Franklin SA, Smith DL, Woodman B, Marks PA, Bates GP (2011) SAHA decreases HDAC 2 and 4 levels in vivo and improves molecular phenotypes in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS one* **6**: e27746

Milatovic D, Montine TJ, Aschner M (2011) Prostanoid signaling: dual role for prostaglandin E2 in neurotoxicity. *Neurotoxicology* **32**: 312-319

Minghetti L, Ajmone-Cat MA, De Berardinis MA, De Simone R (2005) Microglial activation in chronic neurodegenerative diseases: roles of apoptotic neurons and chronic stimulation. *Brain research Brain research reviews* **48**: 251-256

Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, Creminon C, Maclouf J, Levi G (1997) Prostaglandin E2 downregulates inducible nitric oxide synthase expression in microglia by increasing cAMP levels. *Advances in experimental medicine and biology* **433**: 181-184

Mir M, Tolosa L, Asensio VJ, Llado J, Olmos G (2008) Complementary roles of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in inducible microglial nitric oxide generation. *Journal of neuroimmunology* **204**: 101-109

Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D (2005) Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological reviews* **57**: 217-252

Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, Anisman H, Hayley S, Park DS (2007) Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic



neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**: 3328-3337

Mulder SD, Nielsen HM, Blankenstein MA, Eikelenboom P, Veerhuis R (2014) Apolipoproteins E and J interfere with amyloid-beta uptake by primary human astrocytes and microglia in vitro. *Glia* **62**: 493-503

N'Diaye EN, Branda CS, Branda SS, Nevarez L, Colonna M, Lowell C, Hamerman JA, Seaman WE (2009) TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) is a phagocytic receptor for bacteria. *The Journal of cell biology* **184**: 215-223

Nerlov C (2008) C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Current opinion in cell biology* **20**: 180-185

Nerlov C (2010) Transcriptional and translational control of C/EBPs: the case for "deep" genetics to understand physiological function. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **32**: 680-686

Ni J, Shu YY, Zhu YN, Fu YF, Tang W, Zhong XG, Wang H, Yang YF, Ren J, Wang MW, Zuo JP (2007) COX-2 inhibitors ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis through modulating IFN-gamma and IL-10 production by inhibiting T-bet expression. *Journal of neuroimmunology* **186**: 94-103

Nicolas CS, Amici M, Bortolotto ZA, Doherty A, Csaba Z, Fafouri A, Dournaud P, Gressens P, Collingridge GL, Peineau S (2013) The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *Jak-Stat* **2**: e22925

Nikodemova M, Watters JJ (2012) Efficient isolation of live microglia with preserved phenotypes from adult mouse brain. *Journal of neuroinflammation* **9**: 147

Olmos G, Llado J (2014) Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of inflammation* **2014**: 861231

Painter MM, Atagi Y, Liu CC, Rademakers R, Xu H, Fryer JD, Bu G (2015) TREM2 in CNS homeostasis and neurodegenerative disease. *Molecular neurodegeneration* **10**: 43



Pan HC, Yang CN, Hung YW, Lee WJ, Tien HR, Shen CC, Sheehan J, Chou CT, Sheu ML (2013) Reciprocal modulation of C/EBP-alpha and C/EBP-beta by IL-13 in activated microglia prevents neuronal death. *European journal of immunology* **43**: 2854-2865

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* **333**: 1456-1458

Park JY, Paik SR, Jou I, Park SM (2008a) Microglial phagocytosis is enhanced by monomeric alpha-synuclein, not aggregated alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease. *Glia* **56**: 1215-1223

Park L, Zhou P, Pitstick R, Capone C, Anrather J, Norris EH, Younkin L, Younkin S, Carlson G, McEwen BS, Iadecola C (2008b) Nox2-derived radicals contribute to neurovascular and behavioral dysfunction in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 1347-1352

Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* **155**: 1596-1609

Parra M (2015) Class IIa HDACs - new insights into their functions in physiology and pathology. *The FEBS journal* **282**: 1736-1744

Paz-Priel I, Friedman A (2011) C/EBPalpha dysregulation in AML and ALL. *Critical reviews in oncogenesis* **16**: 93-102

Pena-Altamira E, Polazzi E, Moretto E, Lauriola M, Monti B (2014) The transcription factor CCAAT enhancer-binding protein beta protects rat cerebellar granule neurons from apoptosis through its transcription-activating isoforms. *The European journal of neuroscience* **39**: 176-185

Perez-Asensio FJ, Perpina U, Planas AM, Pozas E (2013) Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain. *Journal of cell science* **126**: 4208-4219



Perez-Navarro E, Canals JM, Gines S, Alberch J (2006) Cellular and molecular mechanisms involved in the selective vulnerability of striatal projection neurons in Huntington's disease. *Histology and histopathology* **21**: 1217-1232

Pizarro-Cerda J, Desjardins M, Moreno E, Akira S, Gorvel JP (1999) Modulation of endocytosis in nuclear factor IL-6(-/-) macrophages is responsible for a high susceptibility to intracellular bacterial infection. *J Immunol* **162**: 3519-3526

Potucek YD, Crain JM, Watters JJ (2006) Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression. *Neurochemistry international* **49**: 204-214

Prinzen C, Trumbach D, Wurst W, Endres K, Postina R, Fahrenholz F (2009) Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice. *BMC genomics* **10**: 66

Pulido-Salgado M, Vidal-Taboada JM, Saura J (2015) C/EBPbeta and C/EBPdelta transcription factors: Basic biology and roles in the CNS. *Progress in neurobiology* **132**: 1-33

Ramji DP, Foka P (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *The Biochemical journal* **365**: 561-575

Rao JS, Kellom M, Kim HW, Rapoport SI, Reese EA (2012) Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochemical research* **37**: 903-910

Rawji KS, Yong VW (2013) The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clinical & developmental immunology* **2013**: 948976

Reaux-Le Goazigo A, Van Steenwinckel J, Rostene W, Melik Parsadaniantz S (2013) Current status of chemokines in the adult CNS. *Progress in neurobiology* **104**: 67-92

Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T (1995) TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol* **154**: 944-953



Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research* **43**: e47

Robinson GW, Johnson PF, Hennighausen L, Sterneck E (1998) The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes & development* **12**: 1907-1916

Ros-Bernal F, Hunot S, Herrero MT, Parnadeau S, Corvol JC, Lu L, Alvarez-Fischer D, Carrillo-de Sauvage MA, Saurini F, Coussieu C, Kinugawa K, Prigent A, Hoglinger G, Hamon M, Tronche F, Hirsch EC, Vyas S (2011) Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 6632-6637

Roumier A, Bechade C, Poncer JC, Smalla KH, Tomasello E, Vivier E, Gundelfinger ED, Triller A, Bessis A (2004) Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 11421-11428

Rumble JM, Huber AK, Krishnamoorthy G, Srinivasan A, Giles DA, Zhang X, Wang L, Segal BM (2015) Neutrophil-related factors as biomarkers in EAE and MS. *The Journal of experimental medicine* **212**: 23-35

Saha RN, Pahan K (2006) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxidants & redox signaling* **8**: 929-947

Sahrbacher UC, Lechner F, Eugster HP, Frei K, Lassmann H, Fontana A (1998) Mice with an inactivation of the inducible nitric oxide synthase gene are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology* **28**: 1332-1338

Samuelsson M, Ramberg V, Iverfeldt K (2008) Alzheimer amyloid-beta peptides block the activation of C/EBPbeta and C/EBPdelta in glial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **370**: 619-622

Sanders P, De Keyser J (2007) Janus faces of microglia in multiple sclerosis. *Brain research reviews* **54**: 274-285



Sauer B (1998) Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* **14**: 381-392

Screpanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D, Sellitto C, Scarpa S, Bellavia D, Lattanzio G, et al. (1995) Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *The EMBO journal* **14**: 1932-1941

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* **74**: 691-705

Schafer DP, Stevens B (2015) Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **7**

Schoenen H, Huber A, Sonda N, Zimmermann S, Jantsch J, Lepenies B, Bronte V, Lang R (2014) Differential control of Mincle-dependent cord factor recognition and macrophage responses by the transcription factors C/EBPbeta and HIF1alpha. *J Immunol* **193**: 3664-3675

Schonrock LM, Kuhlmann T, Adler S, Bitsch A, Bruck W (1998) Identification of glial cell proliferation in early multiple sclerosis lesions. *Neuropathology and applied neurobiology* **24**: 320-330

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* **75**: 163-189

Schroeder-Gloeckler JM, Rahman SM, Janssen RC, Qiao L, Shao J, Roper M, Fischer SJ, Lowe E, Orlicky DJ, McManaman JL, Palmer C, Gitomer WL, Huang W, O'Doherty RM, Becker TC, Klemm DJ, Jensen DR, Pulawa LK, Eckel RH, Friedman JE (2007) CCAAT/enhancer-binding protein beta deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in Lepr(db/db) mice. *The Journal of biological chemistry* **282**: 15717-15729

Si Q, Nakamura Y, Ogata T, Kataoka K, Schubert P (1998) Differential regulation of microglial activation by propentofylline via cAMP signaling. *Brain research* **812**: 97-104



Sierra A, Abiega O, Shahrzad A, Neumann H (2013) Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Frontiers in cellular neuroscience* **7**: 6

Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell* **7**: 483-495

Silva RM, Ries V, Oo TF, Yarygina O, Jackson-Lewis V, Ryu EJ, Lu PD, Marciniak SJ, Ron D, Przedborski S, Kholodilov N, Greene LA, Burke RE (2005) CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism. *Journal of neurochemistry* **95**: 974-986

Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain research bulletin* **87**: 10-20

Song M, Jin J, Lim JE, Kou J, Pattanayak A, Rehman JA, Kim HD, Tahara K, Lalonde R, Fukuchi K (2011) TLR4 mutation reduces microglial activation, increases Abeta deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation* **8**: 92

Sorce S, Krause KH, Jaquet V (2012) Targeting NOX enzymes in the central nervous system: therapeutic opportunities. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**: 2387-2407

Sorce S, Myburgh R, Krause KH (2011) The chemokine receptor CCR5 in the central nervous system. *Progress in neurobiology* **93**: 297-311

Spooren A, Kolmus K, Laureys G, Clinckers R, De Keyser J, Haegeman G, Gerlo S (2011) Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain research reviews* **67**: 157-183

Staiger J, Lueben MJ, Berrigan D, Malik R, Perkins SN, Hursting SD, Johnson PF (2009) C/EBPbeta regulates body composition, energy balance-related hormones and tumor growth. *Carcinogenesis* **30**: 832-840

Stefanova N, Fellner L, Reindl M, Masliah E, Poewe W, Wenning GK (2011) Toll-like receptor 4 promotes alpha-synuclein clearance and survival of nigral dopaminergic neurons. *The American journal of pathology* **179**: 954-963



Sterneck E, Paylor R, Jackson-Lewis V, Libbey M, Przedborski S, Tessarollo L, Crawley JN, Johnson PF (1998) Selectively enhanced contextual fear conditioning in mice lacking the transcriptional regulator CCAAT/enhancer binding protein delta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 10908-10913

Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF (1997) An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes & development* **11**: 2153-2162

Sterneck E, Zhu S, Ramirez A, Jorcano JL, Smart RC (2006) Conditional ablation of C/EBP beta demonstrates its keratinocyte-specific requirement for cell survival and mouse skin tumorigenesis. *Oncogene* **25**: 1272-1276

Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* **131**: 1164-1178

Straccia M, Dentesano G, Valente T, Pulido-Salgado M, Sola C, Saura J (2013) CCAAT/enhancer binding protein beta regulates prostaglandin E synthase expression and prostaglandin E2 production in activated microglial cells. *Glia* **61**: 1607-1619

Straccia M, Gresa-Arribas N, Dentesano G, Ejarque-Ortiz A, Tusell JM, Serratosa J, Sola C, Saura J (2011) Pro-inflammatory gene expression and neurotoxic effects of activated microglia are attenuated by absence of CCAAT/enhancer binding protein beta. *Journal of neuroinflammation* **8**: 156

Strohmeier R, Shelton J, Loughheed C, Breitkopf T (2014) CCAAT-enhancer binding protein-beta expression and elevation in Alzheimer's disease and microglial cell cultures. *PLoS one* **9**: e86617

Takahashi K, Prinz M, Stagi M, Chechneva O, Neumann H (2007) TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS medicine* **4**: e124



Takahashi K, Rochford CD, Neumann H (2005) Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *The Journal of experimental medicine* **201**: 647-657

Takeuchi C, Matsumoto Y, Kohyama K, Uematsu S, Akira S, Yamagata K, Takemiya T (2013) Microsomal prostaglandin E synthase-1 aggravates inflammation and demyelination in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurochemistry international* **62**: 271-280

Takeuchi H, Wang J, Kawanokuchi J, Mitsuma N, Mizuno T, Suzumura A (2006) Interferon-gamma induces microglial-activation-induced cell death: a hypothetical mechanism of relapse and remission in multiple sclerosis. *Neurobiology of disease* **22**: 33-39

Tamura A, Hirai H, Yokota A, Sato A, Shoji T, Kashiwagi T, Iwasa M, Fujishiro A, Miura Y, Maekawa T (2015) Accelerated apoptosis of peripheral blood monocytes in Cebpb-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications* **464**: 654-658

Tanaka T, Akira S, Yoshida K, Umemoto M, Yoneda Y, Shirafuji N, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T (1995) Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* **80**: 353-361

Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *The EMBO journal* **16**: 7432-7443

Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM (2001a) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nature neuroscience* **4**: 813-818

Taubenfeld SM, Wiig KA, Monti B, Dolan B, Pollonini G, Alberini CM (2001b) Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 84-91

Teles AV, Rosenstock TR, Okuno CS, Lopes GS, Bertoncini CR, Smaili SS (2008) Increase in bax expression and apoptosis are associated in Huntington's disease progression. *Neuroscience letters* **438**: 59-63



Thakker P, Leach MW, Kuang W, Benoit SE, Leonard JP, Marusic S (2007) IL-23 is critical in the induction but not in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **178**: 2589-2598

Tran TA, Nguyen AD, Chang J, Goldberg MS, Lee JK, Tansey MG (2011) Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor regulate Parkin expression via nuclear factor-kappa B. *PLoS one* **6**: e23660

Tremblay ME, Lecours C, Samson L, Sanchez-Zafra V, Sierra A (2015) From the Cajal alumni Achúcarro and Rio-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in neuroanatomy* **9**: 45

Tsai VW, Mohammad MG, Tolhurst O, Breit SN, Sawchenko PE, Brown DA (2011) CCAAT/enhancer binding protein-delta expression by dendritic cells regulates CNS autoimmune inflammatory disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 17612-17621

Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature neuroscience* **16**: 543-551

Valente T, Mancera P, Tusell JM, Serratosa J, Saura J (2012) C/EBPbeta expression in activated microglia in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of aging* **33**: 2186-2199

Valente T, Straccia M, Gresa-Arribas N, Dentesano G, Tusell JM, Serratosa J, Mancera P, Sola C, Saura J (2013) CCAAT/enhancer binding protein delta regulates glial proinflammatory gene expression. *Neurobiology of aging* **34**: 2110-2124

Vestal DJ (2005) The guanylate-binding proteins (GBPs): proinflammatory cytokine-induced members of the dynamin superfamily with unique GTPase activity. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **25**: 435-443

Vestal DJ, Jeyaratnam JA (2011) The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **31**: 89-97



Vezzani A, Viviani B (2015) Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology* **96**: 70-82

Vinnakota K, Hu F, Ku MC, Georgieva PB, Szulzewsky F, Pohlmann A, Waiczies S, Waiczies H, Niendorf T, Lehnardt S, Hanisch UK, Synowitz M, Markovic D, Wolf SA, Glass R, Kettenmann H (2013) Toll-like receptor 2 mediates microglia/brain macrophage MT1-MMP expression and glioma expansion. *Neuro-oncology* **15**: 1457-1468

Virarkar M, Alappat L, Bradford PG, Awad AB (2013) L-arginine and nitric oxide in CNS function and neurodegenerative diseases. *Critical reviews in food science and nutrition* **53**: 1157-1167

von Bernhardt R, Eugenin-von Bernhardt L, Eugenin J (2015) Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience* **7**: 124

Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**: 3974-3980

Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A (2008) Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 8138-8143

Walton M, Saura J, Young D, MacGibbon G, Hansen W, Lawlor P, Sirimanne E, Gluckman P, Dragunow M (1998) CCAAT-enhancer binding protein alpha is expressed in activated microglial cells after brain injury. *Brain research Molecular brain research* **61**: 11-22

Wang R, Luo Y, Ly PT, Cai F, Zhou W, Zou H, Song W (2012a) Sp1 regulates human huntingtin gene expression. *Journal of molecular neuroscience : MN* **47**: 311-321

Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L (2015) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of translational medicine* **3**: 136



Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS, Colonna M (2012b) IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature immunology* **13**: 753-760

Wieghofer P, Knobloch KP, Prinz M (2015) Genetic targeting of microglia. *Glia* **63**: 1-22

Willenborg DO, Fordham SA, Cowden WB, Ramshaw IA (1995) Cytokines and murine autoimmune encephalomyelitis: inhibition or enhancement of disease with antibodies to select cytokines, or by delivery of exogenous cytokines using a recombinant vaccinia virus system. *Scandinavian journal of immunology* **41**: 31-41

Wingender E, Schoeps T, Haubrock M, Donitz J (2015) TFClass: a classification of human transcription factors and their rodent orthologs. *Nucleic acids research* **43**: D97-102

Wlodarczyk A, Lobner M, Cedile O, Owens T (2014) Comparison of microglia and infiltrating CD11c(+) cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response. *Journal of neuroinflammation* **11**: 57

Woo HN, Park JS, Gwon AR, Arumugam TV, Jo DG (2009) Alzheimer's disease and Notch signaling. *Biochemical and biophysical research communications* **390**: 1093-1097

Wyss-Coray T, Feng L, Masliah E, Ruppe MD, Lee HS, Toggas SM, Rockenstein EM, Mucke L (1995) Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1. *The American journal of pathology* **147**: 53-67

Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT (2010) The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **17**: 6-10

Ye XZ, Xu SL, Xin YH, Yu SC, Ping YF, Chen L, Xiao HL, Wang B, Yi L, Wang QL, Jiang XF, Yang L, Zhang P, Qian C, Cui YH, Zhang X, Bian XW (2012) Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway. *J Immunol* **189**: 444-453



Yoshida Y, Yoshimi R, Yoshii H, Kim D, Dey A, Xiong H, Munasinghe J, Yazawa I, O'Donovan MJ, Maximova OA, Sharma S, Zhu J, Wang H, Morse HC, 3rd, Ozato K (2014) The transcription factor IRF8 activates integrin-mediated TGF-beta signaling and promotes neuroinflammation. *Immunity* **40**: 187-198

Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F (2015) Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience* **9**: 322

Zhang L, Shirayama Y, Iyo M, Hashimoto K (2007) Minocycline attenuates hyperlocomotion and prepulse inhibition deficits in mice after administration of the NMDA receptor antagonist dizocilpine. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **32**: 2004-2010

Zhong L, Chen XF, Zhang ZL, Wang Z, Shi XZ, Xu K, Zhang YW, Xu H, Bu G (2015) DAP12 Stabilizes the C-terminal Fragment of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 (TREM2) and Protects against LPS-induced Pro-inflammatory Response. *The Journal of biological chemistry* **290**: 15866-15877

Zlotnik I, Rennie JC (1963) Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice. *Journal of comparative pathology* **73**: 150-162



8. ANNEX

8. ANNEX

Article 1:

Pulido-Salgado M, Vidal-Taboada JM, Saura J (2015) C/EBPbeta and C/EBPdelta transcription factors: Basic biology and roles in the CNS. *Progress in neurobiology* **132**: 1-33

Article 2:

Straccia M, Dentesano G, Valente T, Pulido-Salgado M, Sola C, Saura J (2013) CCAAT/enhancer binding protein beta regulates prostaglandin E synthase expression and prostaglandin E2 production in activated microglial cells. *Glia* **61**: 1607-1619







C/EBP β and C/EBP δ transcription factors: Basic biology and roles in the CNS



Marta Pulido-Salgado, Jose M. Vidal-Taboada, Josep Saura*

Biochemistry and Molecular Biology Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Casanova 143, planta 3, 08036 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2015
Received in revised form 8 May 2015
Accepted 16 June 2015
Available online 2 July 2015

cAMP (PubChem CID: 6076)
Dopamine (PubChem CID: 681)
Forskolin (Pubmed CID: 47936)
Glutamate (PubChem CID: 33032)
Kainic acid (PubChem CID: 10255)
Lipopolysaccharide LPS (Pubmed CID: 11970143)
Lysergic acid diethylamide LSD (PubChem CID: 5761)
N-Methyl-D-aspartic acid NMDA (PubChem CID: 22880)
Para-methoxyamphetamine PMA (PubChem CID: 31721)
Prostaglandin E2 PGE2 (PubChem CID: 5280360)

Keywords:

CCAAT/enhancer binding protein
Transcription factor
Neuron
Microglia
Astrocyte
Neuroinflammation

ABSTRACT

CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β and C/EBP δ are transcription factors of the basic-leucine zipper class which share phylogenetic, structural and functional features. In this review we first describe in depth their basic molecular biology which includes fascinating aspects such as the regulated use of alternative initiation codons in the C/EBP β mRNA. The physical interactions with multiple transcription factors which greatly opens the number of potentially regulated genes or the presence of at least five different types of post-translational modifications are also remarkable molecular mechanisms that modulate C/EBP β and C/EBP δ function. In the second part, we review the present knowledge on the localization, expression changes and physiological roles of C/EBP β and C/EBP δ in neurons, astrocytes and microglia. We conclude that C/EBP β and C/EBP δ share two unique features related to their role in the CNS: whereas in neurons they participate in memory formation and synaptic plasticity, in glial cells they regulate the pro-inflammatory program. Because of their role in neuroinflammation, C/EBP β and C/EBP δ in microglia are potential targets for treatment of neurodegenerative disorders. Any strategy to reduce C/EBP β and C/EBP δ activity in neuroinflammation needs to take into account its potential side-effects in neurons. Therefore, cell-specific treatments will be required for the successful application of this strategy.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: A β , amyloid beta peptide; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; AP1, activator protein 1; APRE, acute phase response element; ARE, AU-rich-element; B-ATF, bZIP transcription factor ATF-like; bZIP, basic-leucine zipper; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; CaMK, calcium/calmodulin-dependent protein kinase; CARE, C/EBP-ATF response element; CBP, CREB binding protein; CCL2, C-C motif ligand 2; Cdk, cyclin-dependent kinase; CDS, coding sequence; CHOP, C/EBP-homologous protein; CNV, copy number variations; COX2, cyclooxygenase 2; CR, conserved regulatory domain; CRE, cAMP response element; CREB, cAMP response element-binding protein; CUGBP1, CUG triplet repeat, RNA binding protein 1; DBP, D site albumin promoter binding protein; DDIT3, DNA damage-inducible transcript 3; Egr, early growth response protein; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GR, glucocorticoid receptor; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 beta; HDAC, histone deacetylase; HIV, human immunodeficiency virus; HRE, hypoxia response element; HuR, human antigen R; IFN- γ , interferon gamma; IGF, insulin-like growth factor; IL, interleukin; LAP, liver activation protein; LIP, liver-enriched inhibitory protein; LPS, lipopolysaccharide; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF- κ B, nuclear factor κ B; NGF, nerve growth factor; NLS, nuclear localization signal; NOS2, nitric oxide synthase 2; PGE2, prostaglandin-E2; PIAS, protein inhibitor of activated STAT; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RSK, ribosomal S6 kinase; RunX, run-related transcription factor; SNP, single nucleotide polymorphism; Sp1, specificity protein 1; SRE, sterol regulatory element; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; SUMO, small ubiquitin-like modifier; SWI/SNF, switch/sucrose non fermentable; Tat, transactivator of transcription; TLR, toll-like receptor; TNF α , tumor necrosis factor α ; TSS, transcription start site; TTS, transcription termination site; uORF, upstream open reading frame; UTR, untranslated region.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 1920.
E-mail address: josepsaura@ub.edu (J. Saura).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.06.003>
0301-0082/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents

1. The C/EBP family of transcription factors	2
1.1. Role of other C/EBP members in the CNS	2
1.1.1. C/EBP α	2
1.1.2. C/EBP γ	3
1.1.3. C/EBP ϵ	3
1.1.4. CHOP	3
1.2. The elusive case of C/EBP ζ	4
2. C/EBP β and C/EBP δ structural features	4
2.1. C/EBP β and C/EBP δ genes	4
2.1.1. Gene structure	4
2.1.2. C/EBP β regulatory regions/promoter	4
2.1.3. C/EBP δ regulatory regions/promoter	6
2.1.4. Methylation of C/EBP β and C/EBP δ genes	8
2.1.5. Polymorphisms in the human CEBPB and CEBPD genes	9
2.2. C/EBP β and C/EBP δ mRNAs	9
2.3. C/EBP β and C/EBP δ proteins	10
2.3.1. Isoforms, primary structure and main domains	10
2.3.2. The C/EBP consensus sequence is not a CCAAT box	10
2.3.3. C/EBP β and C/EBP δ translation regulation	11
2.3.4. C/EBP β and δ protein interactions	11
2.3.5. Post-translational modifications	15
2.3.6. C/EBP β and C/EBP δ protein stability and degradation	16
2.3.7. Subcellular and subnuclear localization	17
3. C/EBP β and C/EBP δ function	17
3.1. Physiological roles outside the CNS	17
3.2. C/EBP β and C/EBP δ : More than transcription factors?	18
4. C/EBP β and C/EBP δ in the CNS	18
4.1. Localization of C/EBP β and C/EBP δ in the normal CNS	18
4.2. Changes in C/EBP β and C/EBP δ expression in the CNS	18
4.2.1. In vitro regulation of C/EBP β and C/EBP δ expression	18
4.2.2. Changes in C/EBP β and C/EBP δ expression in vivo in the CNS. Studies in animal models	19
4.2.3. C/EBP β and C/EBP δ expression in the diseased human CNS	20
5. Physiological roles of C/EBP β and C/EBP δ in the CNS	21
5.1. Lessons from knockout mice on the role of C/EBP β and C/EBP δ in the normal CNS	21
5.2. Physiological roles of neuronal C/EBP β / δ	21
5.2.1. Memory formation	21
5.2.2. Neuritogenesis and neuroregeneration	21
5.2.3. Neuroprotection/neuronal death	22
5.2.4. Neurogenesis	22
5.2.5. Neuroendocrinology	22
5.2.6. Regulation of specific/key neuronal genes by C/EBP β and C/EBP δ	22
5.3. Physiological roles of astroglial C/EBP β and C/EBP δ	23
5.3.1. Astroglial pro-inflammatory response	23
5.3.2. Energy metabolism	23
5.3.3. Neurotrophic support	23
5.3.4. Antiapoptotic role	23
5.4. Physiological roles of microglial C/EBP β and C/EBP δ	23
5.4.1. Lessons from macrophage studies	23
5.4.2. Pro-inflammatory role for C/EBP β and C/EBP δ in microglia	24
5.5. Neuroprotective potential of glial C/EBP β and C/EBP δ inhibition: more lessons from knockout mice	24
6. Concluding remarks	24
Acknowledgements	25
References	25

1. The C/EBP family of transcription factors

The CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) are a family of transcription factors of the basic-leucine zipper (bZIP) class. The name was coined by Steven L McNight, “a silly acronym that I continue to wear around my neck like a rotting albatross” (McKnight, 2001), and it refers to the ability of the first identified C/EBP protein to bind to both the CCAAT box of several promoters and to the core homology region of some virus enhancers (Landschulz et al., 1988). Six members of the C/EBP family have been identified in mammals (Table 1). This review will be devoted to C/EBP β and C/EBP δ , two factors that share two unique features

related to their role in the CNS: in neurons they participate in memory formation and synaptic plasticity whereas in glial cells they regulate the pro-inflammatory program.

1.1. Role of other C/EBP members in the CNS

A brief summary on the other C/EBP members with a focus on their role in the CNS follows:

1.1.1. C/EBP α

C/EBP α plays key roles in hepatic lipid and glucose metabolism (Wang et al., 1995), type II pneumocyte proliferation (Flodby et al.,



Table 1
C/EBP family portrait.

	Gene name	Alternative names	Expression pattern (mRNA)	Main physiological roles	Gene location	
					Human	Mouse
C/EBP α	CEBPA	C/EBP	Liver, adipose, intestine, lung, adrenal gland, placenta, ovary	Hepatic lipid and glucose metabolism, granulocyte and monocyte differentiation	19q13.1 Chr19: 33302564-33299934	7B2 Chr7: 35119293-35121928
C/EBP β	CEBPB	NF-IL6, IL-6DBP, LAP, CRP2, AGP/EBP, NF-M, ApC/EBP, SFB	Liver, adipose, intestine, lung	Immune and inflammatory processes, energy metabolism, cell-specific role in cell cycle and differentiation	20q13.1 Chr20: 50190583-50192690	2H3 Chr2: 167688915-167690418
C/EBP γ	CEBPG	Ig/EBP	Ubiquitous	Functional maturation of NK cells	19q13.11 Chr19: 33373669-33382686	7B1 Chr7: 35056590-35046422
C/EBP δ	CEBPD	CELF, CRP3, NF-IL6 β , R α C/EBP2	Liver, adipose, intestine, lung	Immune and inflammatory processes, cell-specific roles in cell cycle, differentiation, survival and cell death	8q11.21 Chr8: 47738164-47736914	16A2 Chr16: 15887286-15889545
C/EBP ϵ	CEBPE	CRP1	Myeloid and lymphoid lineages	Differentiation and functional maturation of granulocytes and macrophages	14q11.2 Chr14: 23119611-23117306	14C1 Chr14: 54712174-54710363
DDIT3	DDIT3	CHOP, GADD153	Ubiquitous	Endoplasmic reticulum stress, apoptosis, adipogenesis, erythropoiesis	12q13.1 Chr12: 57520517-57516588	10D3 Chr10: 127290756-127296288

CEBPZ is not included in the table because it is not, despite its name, a C/EBP family member as indicated in the text. Genome assembly: GRCh38 for human, GRM38.p2 for mouse. Genomic position: TSS-TTS.

Modified and updated from [Lekstrom-Himes and Xanthopoulos \(1998\)](#).

* Note that for the CEBPD gene a cytogenetic location has been reported in 8q11 ([Cleutjens et al., 1993](#)) and in 8p11 ([Wood et al., 1995](#)).

1996) and in granulocyte and monocyte differentiation ([Suh et al., 2006](#)). Impaired C/EBP α function is associated with more than half of acute myeloid leukaemia patients ([Paz-Priel and Friedman, 2011](#)). In the CNS the information about the expression and function of C/EBP α is scant. In the normal CNS C/EBP α expression is low, sometimes undetectable, and it cannot be discarded that in some studies part of C/EBP α mRNA or protein detected in the CNS comes from blood cells. Some studies have reported changes in CNS C/EBP α expression but the C/EBP α -expressing cell types were not identified. Thus, C/EBP α expression is increased in the murine CNS after systemic lipopolysaccharide (LPS) ([Saito et al., 1999](#)) or traumatic brain injury ([Sandhir and Berman, 2010](#)) but it is significantly decreased in aged Tg-ArcSwe mouse brain, an Alzheimer's disease animal model ([Ramberg et al., 2011](#)). Few studies have addressed the question of which cells express C/EBP α in the CNS in vivo. [Walton et al. \(1998\)](#) have reported the expression of C/EBP α in activated microglia after hypoxic-ischemic brain injury in rats whereas [Soga et al. \(2003\)](#) have observed C/EBP α expression in CA1 neurons after transient forebrain ischemia in gerbils. C/EBP α was undetectable in the untreated brain in both studies. Evidence of the key role of C/EBP α in the regulation of microglial proliferation through transcriptional control of the PU.1 promoter has been recently reported in the ME7 mouse model of prion disease ([Gomez-Nicola et al., 2013](#)). In vitro, C/EBP α is easily detected in cultured microglia and its expression is down-regulated by toll-like receptor (TLR) agonists ([Ejarque-Ortiz et al., 2007b](#)) and by amyloid β peptide (A β) ([Walker et al., 2006](#)) in rat and human microglia, respectively. However, in a recent work C/EBP α protein levels were upregulated by LPS in primary and BV2 microglia ([Pan et al., 2013a](#)). Silencing experiments support an antiapoptotic role for C/EBP α in microglia ([Pan et al., 2013a](#)). Cultured mouse or rat astrocytes do not express C/EBP α ([Ejarque-Ortiz et al., 2007b](#); [Yano et al., 1996](#)).

1.1.2. C/EBP γ

C/EBP γ is a ubiquitously expressed transcription factor that lacks known activation domains and is considered a dominant negative form for many C/EBPs. It has often been shown to heterodimerize with C/EBP β with cell- and promoter-specific consequences. Whereas C/EBP γ generally inhibits C/EBP β function ([Huggins et al., 2013](#); [Parkin et al., 2002](#); [Schwartz et al., 2000](#); [Yan et al., 2012a](#)) it can also enhance C/EBP β activity ([Gao et al., 2002](#)). There are to our knowledge no studies on the role of C/EBP γ in the CNS. Given its inhibitory role on C/EBP β function it is tempting to speculate that C/EBP γ could act as a repressor of C/EBP β pro-inflammatory role in neuroinflammation. Surprisingly, C/EBP γ shows the highest levels of mRNA expression among C/EBPs in mouse dorsal root ganglia and its expression is strongly upregulated by nerve injury ([de Heredia and Magoulas, 2013](#)).

1.1.3. C/EBP ϵ

C/EBP ϵ is expressed in cells of hematopoietic origin and it plays key roles in the differentiation and function of neutrophils ([Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1999](#); [Yamanaka et al., 1997](#)) and macrophages ([Akagi et al., 2010](#); [Halene et al., 2010](#); [Tavor et al., 2002](#)). Its expression in macrophages suggests a role also in microglia, but this has not been analysed. C/EBP ϵ mRNA, but not protein, levels increase in murine brain after ischemia ([Ridder et al., 2009](#)) and an immunohistochemical study has reported the presence of C/EBP ϵ in CA1 neurons 72–96 h after transient forebrain ischemia in gerbils ([Soga et al., 2003](#)).

1.1.4. CHOP

CHOP (C/EBP-homologous protein) is a C/EBP member whose official name is DNA damage-inducible transcript 3 (DDIT3). Among other names it has been previously referred as C/EBP ζ but it should not be confused with the gene and protein with the official name C/EBP ζ (CEBPZ) that is described below (see Section 1.2). CHOP is a transcription factor that is expressed ubiquitously at



very low levels. It is a key regulator of the stress response. Prolonged endoplasmic reticulum stress or DNA damage induce the upregulation of CHOP which mediates cell cycle arrest and apoptosis (Oyadomari and Mori, 2004). CHOP acts mainly as a dominant negative regulator of gene expression and it represses antiapoptotic genes. However, CHOP can also activate gene expression of some proapoptotic genes. The main role of CHOP in the CNS is also related to the stress response. CHOP is a key player in the unfolded protein response (Tabas and Ron, 2011) which is postulated to be important in many neurological disorders including brain ischemia (Kumar et al., 2003), neurodegenerative disorders (Hoozemans et al., 2012) and demyelinating diseases (Gow and Wrabetz, 2009). For this reason CHOP has been the focus of much attention from the neuroscience field in the recent years.

1.2. The elusive case of C/EBP ζ

A cautionary note needs to be made regarding C/EBP ζ (CCAAT/enhancer binding protein zeta; gene name CEBPZ; alternative names CBF, CBF-2, NOC1, HSP-CBF). Little is known about this ubiquitous and highly conserved protein (Hoepfner et al., 1996; Lum et al., 1990). CEBPZ is a true CCAAT box binding protein (see Section 2.3.2) that binds to CCAAT boxes in heat-shock protein promoters (Imbriano et al., 2001) but despite its name it should not be considered a C/EBP family member because it lacks significant homology with other C/EBP members and in fact it is not a bZIP protein. To complicate things even more, CHOP was named CCAAT/enhancer binding protein zeta in several publications as it has been mentioned above. The phylogenetic analysis of C/EBPs protein sequences from different organisms shows two different clusters (Fig. 1). One groups C/EBP α , β , γ , δ , ϵ and Ddit3, the latter being the most divergent member of the family. The second cluster comprises only C/EBP ζ sequences suggesting a different origin from the rest of C/EBPs. To study this hypothesis, the urochordate *Ciona intestinalis* and the jawless vertebrate *Petromyzon marinus* have been included in the analysis. Both organisms have one “C/EBP-like” sequence belonging to the first cluster and one “C/EBP ζ -like” sequence belonging to the second cluster. This validates the idea of C/EBP ζ being the outgroup of the tree and reinforces the hypothesis of a different origin for C/EBP ζ .

2. C/EBP β and C/EBP δ structural features

2.1. C/EBP β and C/EBP δ genes

2.1.1. Gene structure

The structure of both C/EBP β and C/EBP δ genes is relatively simple. They lack introns, alternative promoters or alternative polyadenylation sites and therefore a single mRNA is produced from the CEBPB and CEPBD genes. They are among the shortest human protein-coding genes. The size of the C/EBP β mRNA is 2113 nt in humans and 1507 nt in mice and the size of C/EBP δ mRNA is 1269 nt in humans and 1179 nt in mice (see comment on mouse C/EBP δ mRNA length in Table 2 legend). For both C/EBP β and C/EBP δ genes high homology exists between rodent and human sequences in protein coding regions and untranslated regions (UTR) whereas the adjacent non-transcribed regions show much lower homology (Fig. 2).

2.1.2. C/EBP β regulatory regions/promoter

A problem when analyzing published data on transcription factors that regulate C/EBP β or C/EBP δ transcription is that the numerical references of the binding sites cannot be easily compared in different publications because different authors

have considered different positions as the transcription start site (TSS). We have generated Figs. 3 and 4 where human, mouse and rat proximal regulatory sequences are aligned and the functionally demonstrated transcription factor binding sites are indicated. In the following sections the numerical positions of transcription factor binding sites are given using the mouse genome as reference. We invite the reader to use these figures to translate these into the corresponding human or rat genome positions.

2.1.2.1. Proximal region. cAMP response elements (CRE) sites

Although many studies have addressed the question of how C/EBP β transcription is regulated, particularly in human and rodents, the picture is still incomplete. The best characterized regulatory sites in the C/EBP β promoter are two proximal CRE sites located at $-65/-61$ and $-111/-107$ that are important for C/EBP β expression in a neuronal cell line (Niehof et al., 1997), basal and interleukin (IL)-6-induced expression in human hepatocytes (Niehof et al., 1997, 2001b), basal and PMA-induced expression in human monocytes (Berrier et al., 1998), differentiation of mouse adipocytes (Zhang et al., 2004) and granulocytes (Hirai et al., 2013) and prostaglandin-E2 (PGE2)-induced expression in rat osteoblasts (Chang et al., 2004). Mice with deletion in these two sites show normal C/EBP β mRNA levels in all tissues analyzed but markedly reduced LPS + interferon- γ (IFN γ)-induced C/EBP β expression in primary macrophages (Ruffell et al., 2009). Phosphorylated CRE binding protein (CREB) and phosphorylated activating transcription factor (ATF) 1 bind these sites in murine adipocytes (Zhang et al., 2004). Non-canonical CRE binding transcription factors also induce C/EBP β transcription through these sites: Fos-related antigen 2 in PGE2-treated rat osteoblasts through direct binding (Chang et al., 2004) and signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 in IL-6-treated human hepatocytes through tethering (Niehof et al., 2001b).

Various regulatory elements exist in close proximity to these two CRE sites:

C/EBP sites. C/EBP β stimulates its own transcription in human hepatocytes through a canonical C/EBP site ($-115/-109$) which partially overlaps the $-111/-107$ CRE site (Niehof et al., 2001a). Also, regions $-377/-352$ and $-254/-223$ are important for auto-upregulation of C/EBP β hepatic expression in the acute phase response although canonical C/EBP sites are not present in these sequences (Chang et al., 1995).

Specificity protein 1 (Sp1) site ($-81/-74$) is necessary for basal and PMA-induced C/EBP β expression in monocytes (Berrier et al., 1998). Other Sp1 sites important for murine C/EBP β hepatic expression in the acute phase response have been observed in the $-309/-277$ region which contains a canonical Sp1 site $-296/-290$ and in the $-263/-241$ region which contains two putative Sp1 sites $-260/-255$ and $-249/-243$ (Chang et al., 1995). These two Sp1 sites are also present in the $-287/-247$ human region identified as important for Sp1 activation of C/EBP β transcription in activated macrophages (Yang et al., 2002).

AU-rich element (ARE) site ($-65/-57$). This site, which overlaps the $-65/61$ CRE site, is bound by nuclear factor erythroid derived 2 and it is critical for C/EBP β expression in murine adipogenesis (Hou et al., 2012).

Hypoxia response element (HRE) site ($-68/-60$) which also coincides with ARE ($-65/-57$) and CRE sites ($-65/-57$) is bound by hypoxia-inducible factor-2 α and it is important for C/EBP β expression in human chondrocytes (Hirata et al., 2012).

ATF2/c-jun sites. ATF2 and c-Jun cooperatively promote C/EBP β transcription in LPS-treated mouse hepatocytes through binding to regions $-254/-223$ and $123/104$ which contain possible c-jun/ATF2 sites at positions $-241/-234$ (TAGCGTCA) and $-11/-103$ (TGACGCGCA) (Lin et al., 2002).



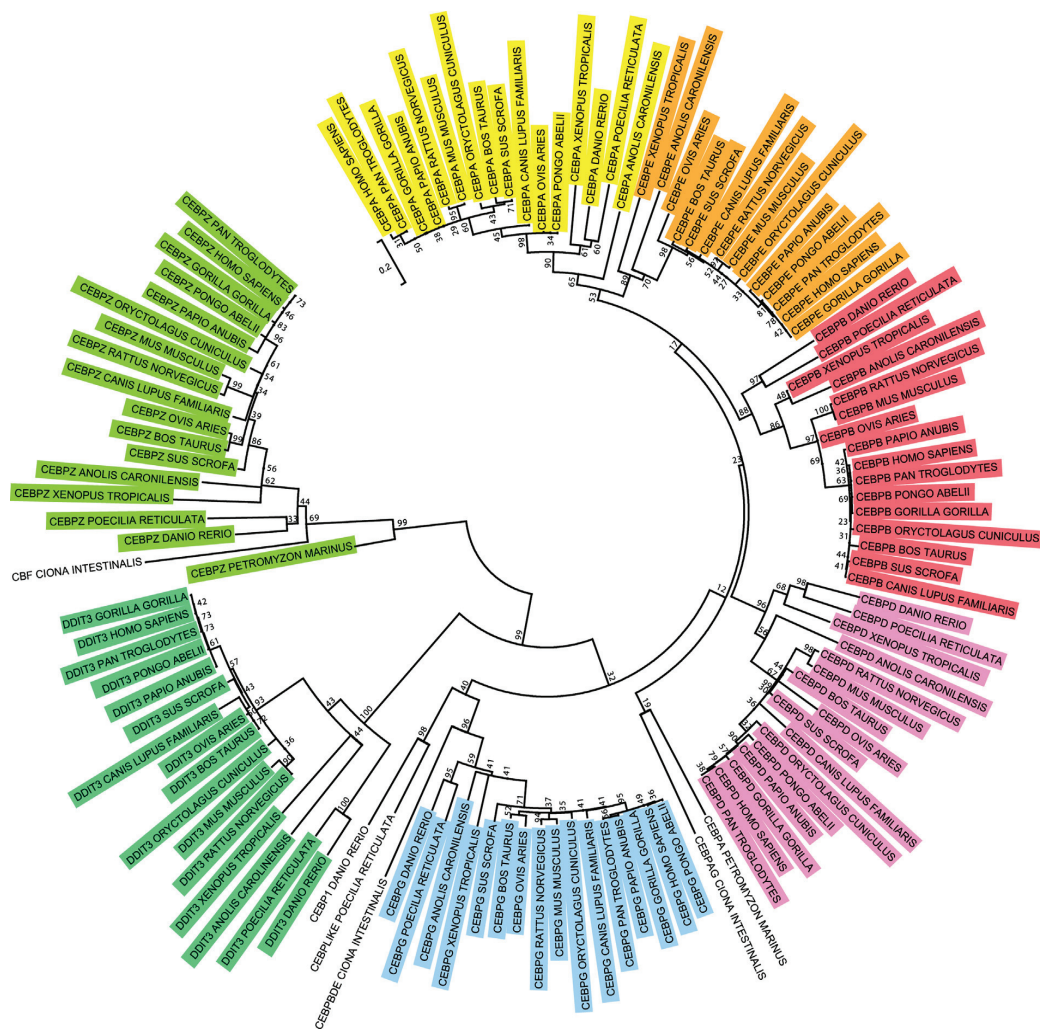


Fig. 1. Phylogenetic analysis of C/EBP proteins. Protein sequences of the six members of the C/EBP family and C/EBP ζ from different species were aligned using MAFFT software (version 7, FFT-NS-I method, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Phylogenetic tree was constructed using MEGA5 (Tamura et al., 2011). The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Poisson correction model (Zuckerkannd and Pauling, 1965). The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed (Felsenstein, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The species studied were *Homo sapiens* (Human species), *Pan troglodytes* (Chimpanzee), *Gorilla gorilla* (Western gorilla), *Pongo abelii* (Sumatran orangutan), *Papio Anubis* (Olive baboon), *Rattus norvegicus* (Rat), *Mus musculus* (Mouse), *Oryctolagus cuniculus* (Rabbit), *Canis lupus familiaris* (Domestic dog), *Sus scrofa* (Pig), *Bos Taurus* (Cattle), *Ovis aries* (sheep), *Xenopus tropicalis* (Western clawed frog), *Anolis carolinensis* (Carolina anole), *Dario rio* (Zebrafish), *Poecilia reticulata* (Guppy fish), *Petromyzon marinus* (Sea lamprey) and *Ciona intestinalis*. This phylogenetic analysis groups CEBP ζ and the *bona-fide* C/EBP family members into two different clusters, thus indicating a different origin for both groups.

2.1.2.2. *Distal sites.* Several distal regulatory sites, probably highly stimulus- and cell type-specific, have been described in the C/EBP β gene.

Sterol regulatory element (SRE) sites (SRE1 –1127/–1121 mouse, –1122/–1116 rat, –1601/–1595 human and SRE2 –1090/–1084 mouse, –1085/–1079 rat, human not conserved). These sites are bound by SRE binding protein 1c and are critical for insulin-induced C/EBP β transcription in rat adipocytes, particularly SRE1 (Le Lay et al., 2002).

Early growth response protein (Egr) 2 and kruppel-like factor 4 cooperatively transactivate C/EBP β during mouse adipogenesis by binding at three distal regions –1365/–1321, –1320/–1275 and –1145/–1100 (Birsoy et al., 2008; Chen et al.,

2005b). A clear consensus sequence for these factors is not found in these sites and only the –1145/–1100 site is conserved in rat (–1140/–1095) and human (–1619/–1574) promoter regions.

STAT3 mediates granulocyte colony-stimulating factor-induced C/EBP β transcription during granulopoiesis by binding to an atypical IL-6 response element II (–1244/–1239 mouse, –1235/–1230 rat and –1717/–1712 human) (Zhang et al., 2010) and it also induces C/EBP β transcription in adipocytes through unidentified distal sites located at –2944/–2919 in mouse (partially conserved in rat, not conserved in human) (Zhang et al., 2011b).

C/EBP β autoregulation. Two tandem C/EBP sites located in the distal promoter region (–2133/–2127 and –2120/–2113 mouse, –2153/–2147 and –2140/–2133 rat, human not conserved)



Table 2
C/EBP β and C/EBP δ mRNA and protein features.

		C/EBP β			C/EBP δ		
		Human	Mouse	Rat	Human	Mouse	Rat
mRNA	NM file	NM_005194.3	NM_009883.4	NM_024125.5	NM_005195.3	NM_007679.4	NM_013154.2
	(nucleotides)	(257/2113)	(59/1518)	(5/1475)	(3/1269)	(-2/+1179)	(-9/+1139)
	mRNA	1857	1460	1471	1267	1181	1148
	5'-UTR	195	49	49	42	41	41
	CDS	1038	891	894	810	807	807
Protein	3'-UTR	624	520	528	415	333	300
	TSS	gagccgcgca	gagccgcgca	gagccgcgca	gtgacagcct	gtgacagccc	gtgacagccc
	NP file	NP_005185	NP_034013	NP_077039	NP_005186	NP_031705	NP_037286
	Aa	345	296	297	269	268	268
	Predicted Mw	36.11 kDa	31.45 kDa	31.55 kDa	28.47 kDa	26.64 kDa	28.6 kDa
	Initial 10 aa's	MQRLVAWDPA	MHRLLAWDAA	MHRLLAWDAA	MSAALFLSDG	MSAALFLSDS	MSAALFLSDS

Lengths of 5'UTR, CDS and protein for C/EBP β correspond to the longest isoform (Full). TSSs have been estimated as in Figs. 3 and 4. These TSS positions coincide with minor variations with the initial nucleotides of the respective NM files for rat C/EBP β and for the three C/EBP δ sequences. For human and mouse C/EBP β the estimated TSS is located 257 and 59 nt downstream of the initial nucleotide of the respective NM file. Blast analysis of expressed sequence tags supports this choice. NM_007679 predicts a size of 2260 nt for mouse C/EBP δ mRNA. There is a polyA site at position 1179. Comparison with rat C/EBP δ and blast analysis of expressed sequence tags supports that this is the functional polyA site and it has been considered so in this table.

activate C/EBP β transcription through C/EBP β and placenta-specific 8 in mouse brown adipocytes (Jimenez-Preitner et al., 2011).

2.1.2.3. Exonic sites. Three exonic regions have been described in the human gene which activate C/EBP β transcription in hepatoma cells in response to stress: +1184/+1191 mouse, +1173/+1180 rat and +1604/+1611 human, bound by X-box binding protein-1 (Chen et al., 2004a) and +1137/+1145 and +1184/+192 mouse, +1126/+1134 and +1173/+1181 rat and +1558/+1566 and +1604/+1612 human, bound by ATF-4, ATF-3 and C/EBP β (Chen et al., 2005a).

Finally, it is interesting to note that although nuclear factor kappa-B (NF- κ B) mediates the upregulation of C/EBP β mRNA levels (Kravchenko et al., 2003; Niehof et al., 2001a), functional NF- κ B sites have not been identified in the C/EBP β gene.

2.1.3. C/EBP δ regulatory regions/promoter

The regulatory elements of C/EBP δ transcription have been best studied in the mouse and most elements described in the rat and human C/EBP δ genes are conserved in the mouse. In the following

section the numerical positions of transcription factor binding sites are given using the mouse genome as reference. Most of the characterized transcription factor binding sites in the C/EBP δ gene are located in the proximal promoter region, between -200 and the TSS. With the present knowledge, the most important transcription factors regulating C/EBP δ transcription are CREB, Sp1 and STAT3 (Fig. 4).

Sp1 regulates transcription through two proximal sites (-56/-50 and -120/-114) that are both conserved in rat, but only the first one in the human C/EBP δ gene. These sites are important for C/EBP δ expression induced by pro-inflammatory stimuli such as IL-6 in human hepatocytes, especially the -120 site (Cantwell et al., 1998), and peptidoglycan (Huang et al., 2007) and LPS (Liu et al., 2007) in mouse macrophages, especially the -56 site. This site is also required for C/EBP δ expression induced by growth arrest in human mammary epithelial cells (Sivko et al., 2004). Interestingly, CpG methylation of this site is associated with reduced C/EBP δ expression in human breast cancer and leukemia cell lines (Ceccarelli et al., 2011; Tang et al., 2006a).

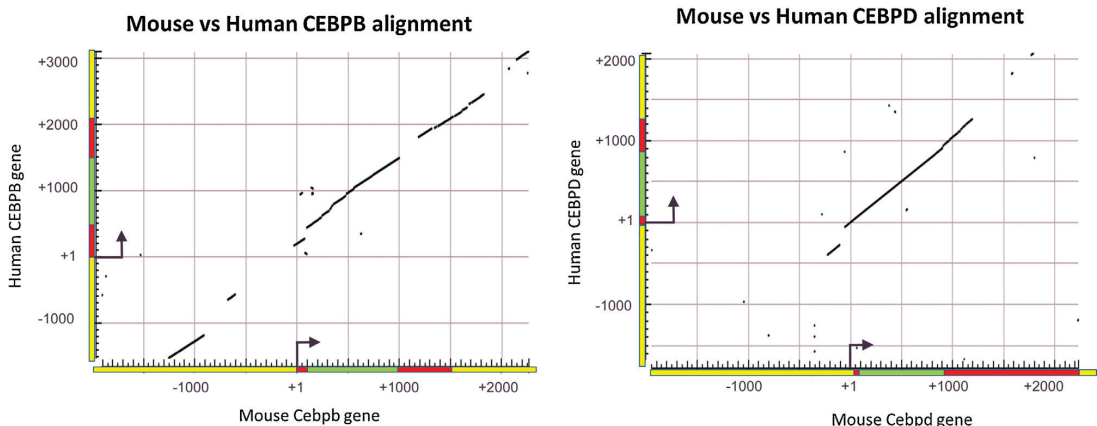


Fig. 2. Gene alignments. The sequences of mouse and human C/EBP β and C/EBP δ genes were aligned using blastn with default parameters (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequences aligned included 2000 bp upstream of TSS, the transcribed region and 1000 bp downstream of TSS. Color codes: yellow: non-transcribed regions; red: 5'UTR and 3'UTR; green: CDS. 5'UTR and CDS shown for C/EBP β correspond to translation of the longest isoform (Full). (A) **C/EBP β** . High homology between mouse and human C/EBP β sequences were observed in the whole CDS, most part of 3'UTR and two regions downstream of TSS. Relatively low homology is observed in the region upstream of TSS suggesting different C/EBP β gene promoter architectures in both species. (B) **C/EBP δ** . High homology between mouse and human C/EBP δ genes is observed throughout the transcribed region. Upstream of TSS, only two short sequence in the proximal promoter region show high homology and no regions of high homology are found downstream of TSS.



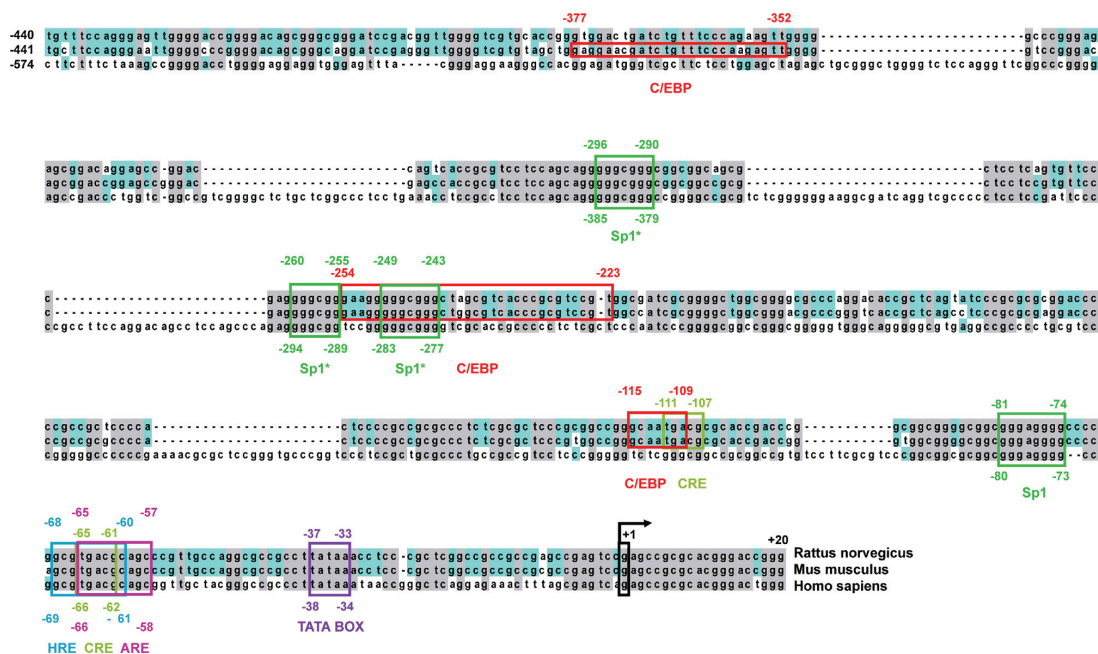


Fig. 3. Alignment of human, mouse and rat *C/EBPβ* promoter regions. *C/EBPβ* sequences from human, mouse and rat genomes including 1000 bp upstream of TSS and complete *C/EBPβ* DNA sequences were aligned using MAFFT software (version 7, L-INS-i method, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Regions from -440 (rat), -441 (mouse) or -574 (human) to +20 were selected and colored with Jalview. Grey coloring indicates >80% base pair conservation whereas turquoise indicates >60% conservation. All positions refer to TSS (+1) as described in (Niehof et al., 1997) for rat, (Berrier et al., 1998) for mouse and (Hirata et al., 2012) for human. Functionally confirmed binding boxes are indicated. Each color refers to one transcription factor. Upper coordinates indicate binding sites in rat and mouse sequences and lower coordinates indicate binding sites in the human sequence if conserved. SP1* boxes denote canonical Sp1 binding sites not functionally demonstrated but found into longer regions described to be functional.

CREB. Various putative CRE sites exist in mouse and human *C/EBPδ* genes (Hallenborg et al., 2012) but to date only the most proximal CRE site (-45/-37) has been demonstrated to be functional. This site, which is conserved in rat and human, is important for basal *C/EBPδ* expression in mouse macrophages (Huang et al., 2007; Liu et al., 2007) and for cAMP-induced *C/EBPδ* expression in mouse embryonic fibroblasts and it plays a possible role in adipogenesis initiation (Hallenborg et al., 2012).

STAT3 regulates *C/EBPδ* transcription through a site located in mouse at -110/-102. STAT3 binding to this site is important for *C/EBPδ* expression induced by IL-6 in human hepatocytes (Cantwell et al., 1998; Yamada et al., 1997) and by growth arrest in mouse mammary epithelial cells and adipocytes (Hutt et al., 2000; Sivko et al., 2004; Zhang et al., 2007). This site is adjacent to the -120 Sp1 site described above. Sp1 and STAT3 interact and function cooperatively to activate *C/EBPδ* transcription in some paradigms (Cantwell et al., 1998; Zhang et al., 2007). In the human *C/EBPδ* gene, this STAT3 binding site exists and it is functional (Sivko et al., 2004) but it is located further upstream (-281/-273), not adjacently to any Sp1 site.

***C/EBPδ* autoregulation** has also been described. Transfected *C/EBPδ* induces *C/EBPδ* reporter expression in rat hepatocytes through two very distal *C/EBP* tandem sites (+3729/+3738 and +3743/+3752). The latter is also conserved in mouse +3709/+3718). This *C/EBPδ* autoregulation has been proposed to mediate sustained *C/EBPδ* expression in the acute phase response (Yamada et al., 1998). On the other hand, *C/EBPδ* binds its own promoter 4 h after LPS in mouse macrophages and induces *C/EBPδ* transcription. A putative *C/EBP* site responsible for this effect has been proposed (-730/-719) but its involvement has not been demonstrated yet (Litvak et al., 2009).

NF-κB. Various authors have shown NF-κB-dependent *C/EBPδ* expression (Ali et al., 2010; Liu et al., 2007) but functional NF-κB binding sites in the *C/EBPδ* promoter have not been unequivocally identified. A non-canonical NF-κB site (-117/-108) overlapping the above described -120/-115 Sp1 and -110/-102 STAT3 binding sites is important for LPS- and peptidoglycan-induced *C/EBPδ* transcription in mouse macrophages. This region is considered by some a composite Sp1/NF-κB/acute-phase response element site (Huang et al., 2007; Liu et al., 2007). Overexpression of c-Rel, an NF-κB-related transcription factor, increases *C/EBPδ* reporter expression in mouse macrophages and this increase is abolished by mutation in the adjacent STAT3 binding site (Liu et al., 2007) and binding of c-Rel to *C/EBPδ* promoter is an early event after LPS treatment of mouse macrophages (Litvak et al., 2009). In summary, NF-κB seems to be able to induce *C/EBPδ* expression but there is not compelling evidence for a direct NF-κB binding to *C/EBPδ* promoter. Alternatively, NF-κB could activate the expression of transcription factors binding directly to the *C/EBPδ* promoter, interact with other transcription factors without direct binding to NF-κB sites or have post-transcriptional effects on *C/EBPδ* (Kravchenko et al., 2003).

Evidence is less robust for other transcription factors. Myc represses *C/EBPδ* promoter activity in mouse mammary epithelial cells. Myc, Miz1 and Max are associated with the *C/EBPδ* promoter in proliferating cells when *C/EBPδ* expression is repressed. Gel shift analysis demonstrate that Miz1 binds to a 30 bp region of the *C/EBPδ* promoter (Si et al., 2010) which contains a site (-96/-89) important for Miz1-induced *C/EBPδ* transcriptional repression in the resolution of LPS-induced inflammation (Do-Umehara et al., 2013). Other transcription factors that regulate *C/EBPδ* transcription are run-related transcription factor (RunX) which activates



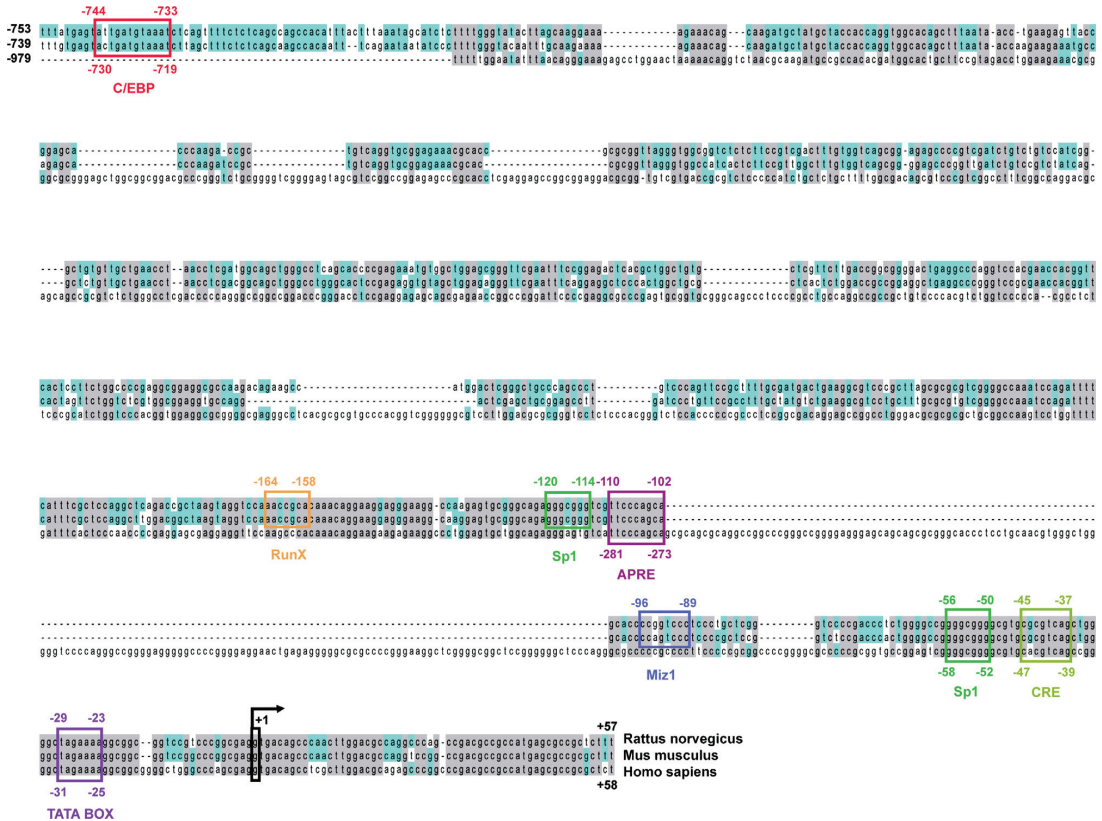


Fig. 4. Alignment of human, mouse and rat *C/EBPδ* promoter regions. *C/EBPδ* sequences from human, mouse and rat genomes were aligned as indicated in Fig. 3. Regions from -753 (rat), -739 (mouse) or -574 (human) to +57 (rat and mouse) and +58 (human) were selected and colored with Jalview as indicated in Fig. 3. All positions refer to TSS (+1) as described in (Cantwell et al., 1998; Huang et al., 2007; Liu et al., 2007) for mouse. It should be noted that there is not a consensus regarding TSS position in rat and human *C/EBPδ* genes. Due to the proximity of the mouse TSS to putative TSS described for human and rat and with the aim to simplify the figure, the mouse TSS has been chosen as the rat and human TSS. Functionally confirmed binding boxes are indicated. Each color refers to one transcription factor. Upper coordinates indicate binding sites in rat and mouse sequences and lower coordinates indicate binding sites in the human sequence, if conserved, with the exception of the *C/EBP* box where the lower coordinates refer to the mouse sequence.

basal *C/EBPδ* transcription in rat osteoblasts through a -164/-158 site (McCarthy et al., 2000), ATF3 which binds the *C/EBPδ* promoter 4 h after LPS and represses *C/EBPδ* transcription in mouse macrophages (Litvak et al., 2009), p63 which binds to a conserved cluster around 1 Kb upstream of the TSS and decreases *C/EBPδ* mRNA levels in human keratinocytes (Borrelli et al., 2007), c-jun which binds the *C/EBPδ* promoter and induces *C/EBPδ* transcription that is abolished by mutations in the Sp1/CRE composite site (Liu et al., 2007) and the activator protein-1 (AP1) factor Jun dimerization protein 2 which binds to two proximal sites in the *C/EBPδ* promoter and represses *C/EBPδ* transcription by recruiting histone deacetylase (HDAC) 3 (Nakade et al., 2007).

2.1.4. Methylation of *C/EBPβ* and *C/EBPδ* genes

DNA methylation is another potentially important mechanism of transcription regulation. Both *C/EBPβ* and *C/EBPδ* genes have a high frequency of CpG and both contain a large CpG island that encompasses the whole transcribed region and 600–1000 bp upstream of the TSS (Fig. 5). In the case of the *C/EBPβ* gene, there is little evidence that CpG methylation regulates its expression in physiological conditions. In adipocyte differentiation demethylation of two CpG sites in the *C/EBPβ* promoter (-533 and -523) coincides with increased *C/EBPβ* expression (Rui et al., 2013).

Also, in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) spinal cord *C/EBPβ* promoter hypomethylation and increased *C/EBPβ* mRNA levels have been observed (Figuroa-Romero et al., 2012) suggesting a regulatory role of CpG methylation on *C/EBPβ* expression in these two paradigms. In contrast, pharmacological demethylation has no effect on *C/EBPβ* levels in U937 human leukaemia cells (Agrawal et al., 2007) and it increases *C/EBPβ* levels in human hepatoma cells, probably through an indirect effect (Dannenberg and Edenberg, 2006) suggesting that gene methylation is not an important regulatory mechanism of *C/EBPβ* expression in human cancer. Recently, methylation analysis of 7 CpG sites located approximately 650 bp upstream of *C/EBPβ* TSS in 27 healthy children has revealed a mean methylation of 4%, 14% and 1% in term placenta, cord blood and 3–6 months saliva, respectively, and no significant intertissue correlation (Armstrong et al., 2014). In the case of *C/EBPδ*, very little is known about changes in methylation status in physiological conditions. In contrast, hypermethylation of the *C/EBPδ* gene, mostly in the proximal promoter region, has been observed to be associated with reduced *C/EBPδ* expression in various human cancers and has even been proposed as an indicator of risk of relapse and metastasis (Agrawal et al., 2007; Ko et al., 2008; Palmieri et al., 2012; Tang et al., 2006a).



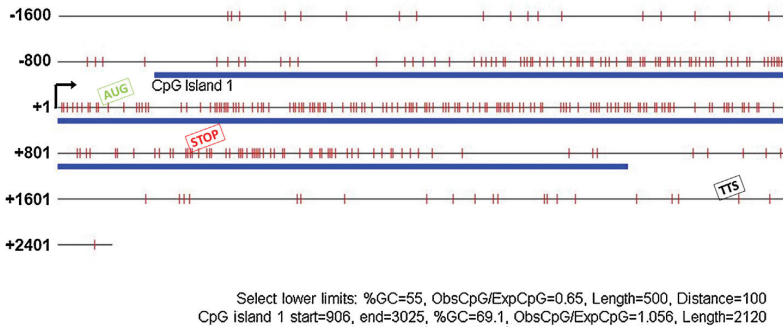


Fig. 5. CpG and CpG islands in *C/EBPβ* and *C/EBPδ* genes. Distribution of CpG and CpG islands in mouse *C/EBPβ* gene in a region covering 1600 bp upstream of TSS, the transcribed region and 1000 bp downstream of the TTS. Bent arrow shows TSS, AUG shows start codon of the longest isoform and STOP shows stop codon. Analyses were performed with CpG island searcher tool (<http://cpgislands.usc.edu>) with default parameters. The pattern observed is common to *C/EBPβ* and *C/EBPδ* mouse and human genes, this is, high density of CpGs defining a large CpG island, marked in blue, which covers 600–1000 bp upstream of TSS and the whole transcribed region.

2.1.5. Polymorphisms in the human *CEBPB* and *CEBPD* genes

250 single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified in the human *C/EBPβ* and *C/EBPδ* loci. The advancement of whole genome sequencing will most likely bring an increase in the number of known polymorphisms as well as an accurate estimation of the allele frequencies, which is at present unknown for most SNPs. As of January 2015 the dbSNP database reports the following variants in the human *CEBPB* locus: 79 SNPs in the 2 kb region upstream of TSS, 11 SNPs in the 5′-UTR, 28 SNPs in the coding sequence (CDS) (9 of them missense mutations), 18 SNPs in the 3′-UTR and 23 SNPs in the 1 kb region downstream of transcription termination site (TTS). In the human *CEBPD* region, the dbSNP database reports 17 SNPs in 2 kb upstream of the TSS, no SNPs in the 5′-UTR, 29 SNPs in the CDS (16 of them missense, 2 frameshift and one nonsense), 15 SNPs in the 3′-UTR and 32 SNPs in the 1 kb region downstream of the TTS.

The effects of *CEBPB* or *CEBPD* polymorphisms on expression or function have not been studied to date. One small size study has found no statistical association between genetic variants in the *CEBPD* gene and Alzheimer's Disease risk (Giedraitis et al., 2009) and no studies of *CEBPB* or *CEBPD* variants are available for other neurological disorders. The few association studies reported have shown significant association with obesity markers of several SNPs in *CEBPB* but not of two SNPs in *CEBPD* (Bennett et al., 2010) and association of one *CEBPD* variant with dyslipidemia (Kaji et al., 2008). Analysis of two *CEBPB* single variants has shown no association with knee osteoarthritis (Hirata et al., 2012).

The chromosome regions containing *CEBPB* or *CEBPD* genes are variable concerning the number of copies in the genome, or copy number variations (CNVs). The dbVAR database reports 30 CNVs for the *CEBPB* gene and 41 CNVs for *CEBPD*. Large CNVs containing *CEBPB* or *CEBPD* and hundreds of genes have been associated as pathogenic for developmental delay phenotypes, but smaller CNVs-containing regions with only the *CEBPB* or *CEBPD* genes and few adjacent genes are not suspected to be pathogenic (Kaminsky et al., 2011). One study has reported frequent loss of one allele (hemizygosity) in the *CEBPD* locus in familiar schizophrenia patients (Lee et al., 2010a). Gene copy amplification of *CEBPD* has been associated with glioblastoma (Chen et al., 2014) and loss of heterozygosity in a region containing the *CEBPD* gene in one patient with atherosclerosis (Sleptsov et al., 2014). Mutational analyses have not been published to detect proprietary gene variation as risk factors to suffer or modify the progression of neurological diseases. Bioinformatic analysis of functional prediction indicates that several SNPs identified in the promoter of *CEBPB* are located in transcription factor binding sites, potentially

affecting the regulation of the gene (Vidal-Taboada et al, unpublished data). More genetic studies analyzing *CEBPB* and *CEBPD* genes are required to evaluate the impact of variations in these genes in the development of CNS diseases.

2.2. *C/EBPβ* and *C/EBPδ* mRNAs

As mentioned above *C/EBPβ* and *C/EBPδ* are intronless genes that are transcribed into a single mRNA species of approximately 1.5–2 kb and 1.2 kb, respectively (see Table 2). Lack of introns implies the impossibility of mRNA nuclear export by the exon-junction complex. In the case of *C/EBPβ* mRNA, nuclear export is mediated by human antigen R (HuR) binding to an ARE (Gantt et al., 2005) and mutation in the HuR binding site results in *C/EBPβ* mRNA nuclear retention (Cherry et al., 2008). To our knowledge, mechanisms of *C/EBPδ* mRNA nuclear export have not been described.

C/EBPβ mRNA is relatively unstable, with a $t_{1/2}$ of 40 min–2 h in most cell types studied (Bergalet et al., 2011; Chen et al., 2004a; Duprez et al., 2003; Li et al., 2008). Stabilization of *C/EBPβ* mRNA by HuR binding to an ARE in the 3′-UTR has been reported after UV radiation in mammary epithelial cells (Li et al., 2008) and after nucleophosmin-induced anaplastic lymphoma kinase expression in anaplastic large cell lymphomas (Bergalet et al., 2011). HuR binding to an ARE in the *C/EBPβ* mRNA has also been reported to enhance translation (Bergalet et al., 2011) and to affect subcellular mRNA localization resulting in exposure of the newly synthesized *C/EBPβ* protein to critical modifying enzymes thus affecting *C/EBPβ* activity. This previously unrecognized function of a 3′-UTR region has been named 3′UTR regulation of protein activity (Basu et al., 2011). Another protein that binds *C/EBPβ* mRNA is CUG triplet repeat, RNA binding protein 1 (CUGBP1) and it is described in Section 2.3.3. *C/EBPβ* mRNA is the target of various miRNAs. The best characterized miRNA acting on *C/EBPβ* mRNA is miR-155 which inhibits *C/EBPβ* translation through interaction with the 3′UTR of *C/EBPβ* mRNA. miR-155-induced *C/EBPβ* repression plays a role in inflammation (He et al., 2009; Worm et al., 2009), adipogenesis (Liu et al., 2011), tumor progression (Johansson et al., 2013) and synaptic dysfunction in Down syndrome (Wang et al., 2013b). The 3′UTR of *C/EBPβ* mRNA is also the target for miR-92b (Qian et al., 2013), miR-191 (Ji et al., 2014) and miR-374b (Pan et al., 2013b).

Regarding *C/EBPδ*, its mRNA is highly unstable with a $t_{1/2}$ of 35–40 min (Dearth and DeWille, 2003; Sivko et al., 2004) and a relatively short poly(A) tail (Dearth and DeWille, 2003). Stabilization of *C/EBPδ* mRNA by HuR binding to its 3′-UTR has been



observed after UV radiation treatment in G0 growth arrested HC11 mouse and MCF-12A human mammary epithelial cells (Li et al., 2008) and after PGE2 treatment in human macrophages (Hsiao et al., 2013). In this latter case, two functional AREs located at 1075/1093 and 1162/1172 were identified. C/EBP δ mRNA is targeted by the miRNA let-7c. Downregulation of C/EBP δ expression is thought to mediate the effects of let-7c on macrophage M2 polarization (Banerjee et al., 2013).

2.3. C/EBP β and C/EBP δ proteins

2.3.1. Isoforms, primary structure and main domains

The single C/EBP β mRNA can be translated into three protein isoforms by use of three alternative in-frame translation initiation codons. The resulting C/EBP β proteins named Full (also known as LAP* or LAP1; 38 kDa), LAP (liver activation protein, also known as LAP2; 35 kDa) and LIP (liver inhibitory protein; 20 kDa) share the C-terminal region containing the bZIP domain and have therefore the same affinity for DNA sequences and dimerization partners. They differ in the N-terminal region in which transactivation and regulatory domains are located. LAP is generally the most abundant isoform. Full and LAP contain the transactivation domains and can act as transcription activators. The shortest isoform LIP can dimerize and bind DNA but it lacks the transactivation domain and it is therefore considered an inhibitory C/EBP β isoform. Although there are examples of LIP-induced transactivation (An et al., 1996; Hu et al., 2000), LIP opposes the transactivation actions of Full and LAP in most models (e.g. Gomis et al., 2006). Accordingly, the LAP/LIP or (Full+LAP)/LIP ratio is a more informative index of C/EBP β function than total mRNA or protein levels (reviewed by Zahnov, 2009). Interestingly, in vivo expression of LIP in the absence of Full and LAP predisposes to oncogenesis in many tissues (Begay et al., 2015). Care must be taken when studying or interpreting reports of LIP expression since a LIP-like isoform can be generated artifactually by proteolysis during extract preparation (Baer and Johnson, 2000).

C/EBP δ mRNA gives rise to a single C/EBP δ protein of approximately 28 kDa. The overall identity between C/EBP β and C/EBP δ is 30% (human or mouse), but whereas the C-terminal bZIP

domain shows >90% identity, the identity in the N-terminal region is <20%. The 17 aa sequence RRERNNIIVRKS RDKAK in the basic DNA binding domain stands out in the alignment of C/EBP sequences because it is fully conserved in C/EBP α , β , δ and ϵ (human and mouse) (Fig. 6A). This suggests that no differences in binding affinity to a given DNA sequence exist among these C/EBPs and supports the existence of a unique C/EBP consensus sequence (Wingender et al., 2015; Fig. 6B). Certainly, a given C/EBP site within a promoter may be bound by different C/EBP proteins with different affinities in physiological conditions because of interactions between the C/EBP and other proteins through less conserved domains (N-terminal region or Leu-zipper). But considering the primary sequences of their basic DNA binding domains, the existence of specific C/EBP β or C/EBP δ consensus sequences is not supported. The regulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ transcription by C/EBPs in preadipocytes is an illustrative example of this: C/EBP α and C/EBP δ , but not C/EBP β , activate PPAR γ transcription in mouse preadipocytes. C/EBP β does not bind PPAR γ promoter, but C/EBP β mutants lacking the N-terminal part of the molecule are able to bind to this promoter, showing that the lack of C/EBP binding to the C/EBP site in this particular promoter does not reflect different affinities between C/EBPs for this C/EBP site but it is instead caused by specific interactions with other proteins (Elberg et al., 2000). The presence of binding sites for transcription factors such as PU.1 and (sex determining region Y)-box 5 in close proximity to C/EBP sites in functionally validated C/EBP β target genes supports the hypothesis of the importance of interactions with adjacent transcription factors for the stabilization of C/EBP binding to DNA (Kfoury and Kapatos, 2009). Despite that, the possibility of slight differential DNA-binding preferences among different C/EBPs remains open (Osada et al., 1996). For a detailed discussion on C/EBP protein-DNA interactions, see Tsukada et al. (2011).

2.3.2. The C/EBP consensus sequence is not a CCAAT box

The CCAAT box was one of the first DNA elements shown to control eukaryotic gene expression (Dolfini et al., 2009). It was initially thought that various transcription factors including C/EBPs could bind CCAAT boxes and this can still be read in recent

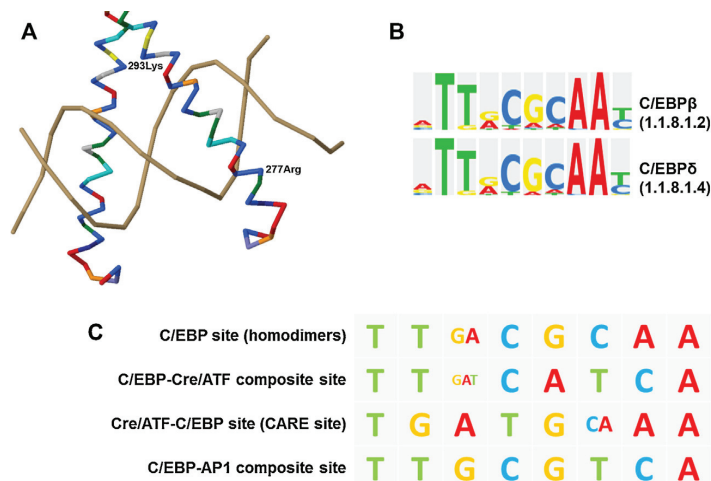


Fig. 6. (A) Crystal structure of human C/EBP β binding to DNA (from PDB 1GU4; www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1GU4). The first (Arg277) and last (Lys293) residues from the 17 aa region conserved in C/EBP α , β , δ and ϵ are indicated. Note that this conserved region covers the whole DNA binding domain. (B) Sequence logos of C/EBP β and C/EBP δ DNA binding sequences taken from http://www.edgar-wingender.de/huTF_classification.html. As expected from an identical primary structure on their DNA binding domain, both DNA sequences are identical. (C) Simplified DNA consensus sequences for the binding sites of C/EBP homodimers or C/EBP heterodimers with Cre/ATF or AP1. For a more precise sequence of the C/EBP canonical site, see Wingender et al. (2015) and for C/EBP-Cre/ATF sites, see Tsukada et al. (2011).



articles. However, it is now accepted that the major CCAAT box binding factor is nuclear transcription factor Y (Dolfini et al., 2012) and that C/EBPs do not recognize CCAAT boxes (Kfoury and Kapatos, 2009). The CCAAT box comprises the pentanucleotide CCAAT and some flanking nucleotides, GGCCAATCT in its simplified form, which clearly differs from the C/EBP consensus sequence TT(G/A)CGCAA (Fig. 6B and C).

2.3.3. C/EBP β and C/EBP δ translation regulation

Translation of C/EBP β mRNA is a regulated event. There are mechanisms that globally affect this process. Thus, C/EBP β mRNA translation can be inhibited by calreticulin through binding to mRNA stem-loop structures in the region between Full and LAP initiation codons (Timchenko et al., 2002), by miR-155 through interaction with the 3'UTR (He et al., 2009) or by thalidomide derivatives through down regulation of eukaryotic translation initiation factor 4E (Li et al., 2011b). C/EBP β mRNA translation can be enhanced by HuR binding to an ARE in the 3'UTR (Bergalet et al., 2011; Hyvonen et al., 2013). Apart from these global mechanisms, cells are equipped with tools that allow differential translation of the three C/EBP β isoforms. Since the biological properties of the three C/EBP β isoforms are very different as mentioned above, regulation of the relative levels of these isoforms has important physiological consequences. There are numerous examples of changes in isoform ratios, particularly in the LAP/LIP ratio. Marked changes have been reported after endoplasmic reticulum stress (Li et al., 2008; Meir et al., 2010), osteoclast differentiation (Smink et al., 2012), aging in adipose tissue (Karagiannides et al., 2001), lactation and involution in mammary gland (Dearth et al., 2001), cancer (Smink et al., 2012) or by various pharmacological treatments (Bae and Kim, 2005; Li et al., 2011a; Smink et al., 2009). Although regulated degradation of C/EBP β isoforms has been described (Li et al., 2008), the main mechanism to generate changes in C/EBP β isoform ratios is the selective use of translation initiation codons. In eukaryotes, alternative translation initiation codons are probably more common than previously recognized and C/EBP β is one of the best studied examples (Lee et al., 2012b). An upstream open reading frame (uORF) located in the 5'-UTR of C/EBP β mRNA plays a key role at determining which AUG will be used for translation initiation. In most conditions ribosomes scan the C/EBP β mRNA from the 5'-cap and start translating at the Full AUG or, most often, at the LAP AUG. Yet, if translation of the uORF occurs, the LAP AUG is skipped and translation starts at the downstream LIP AUG (Calkhoven et al., 2000). The importance of

this mechanism *in vivo* is demonstrated by studies in mice deficient for the C/EBP β uORF initiation codon which fail to initiate LIP translation and show phenotypic alterations related to the absence of LIP (Wethmar et al., 2010). An important question is which factors regulate uORF translation. A candidate is the RNA binding protein CUGBP1. Phosphorylated CUGBP1 interacts with eukaryotic translation initiation factor 2 and binds to the 5' region of C/EBP β mRNA leading to uORF translation. Interaction of CUGBP1 with C/EBP β mRNA and functional effects on C/EBP β mRNA translation has been confirmed in various conditions (Bae and Kim, 2005; Dudaronek et al., 2007; Guerzoni et al., 2006; Karagiannides et al., 2006; Timchenko et al., 2006). There are to our knowledge no reports on C/EBP δ mRNA translation regulation other than the abovementioned effects of the miRNA let-7c on C/EBP δ expression in macrophages (Banerjee et al., 2013).

2.3.4. C/EBP β and δ protein interactions

Like all C/EBPs, C/EBP β and C/EBP δ require dimerization for DNA binding. Dimerization may affect both the DNA binding affinity and the transactivating potential and it is therefore a new layer of regulation of C/EBP β and C/EBP δ function. Dimerization occurs through the conserved Leu-zipper domain in the C-terminal region. The main feature of a Leu-zipper is the presence of 5–6 leucine residues at 7-residue intervals that allow dimerization by hydrophobic interactions. Unlike the DNA binding domain, the Leu-zipper domains of the various C/EBPs are not identical, although highly homologous, and therefore the affinity for dimerization partners may differ among C/EBPs (Tsukada et al. (2011) for review).

2.3.4.1. C/EBP β and δ dimerization with C/EBPs. C/EBP β and C/EBP δ can form dimers with all C/EBP proteins (Grigoryan et al., 2009; Newman and Keating, 2003). Heterodimerization between C/EBPs does not affect DNA binding affinity (Tsukada et al., 2011) but it may impact transactivating potential. The functional effect of heterodimerization is difficult to study. It is generally assumed that heterodimerization of C/EBP β (Full or LAP) or C/EBP δ with LIP (Descombes and Schibler, 1991), C/EBP γ (Parkin et al., 2002), CHOP (Ron and Habener, 1992) and probably also C/EBP α -p30 is inhibitory. Heterodimerization with C/EBP α -p42, Full, LAP, C/EBP δ or C/EBP ϵ modulates function and the effects differ among heterodimers but the specific roles of heterodimeric interactions in C/EBP β or C/EBP δ physiological functions are completely unknown.

Table 3
C/EBP β and C/EBP δ heterodimerization partners within bZIP proteins.

	C/EBP β	C/EBP δ	C/EBP α	C/EBP γ	C/EBP ϵ	DDIT3/CHOP10
c-Jun	+		+			
ATF-7/a (isof 3)	+		+			+
CREB-5/CREBPA	+		+		+	+
c-Fos	+					+
B-ATF-1	+	+	+	+	+	+
B-ATF-3	+	+	+	+	+	+
ATF-4	+	+	+	+	+	+
ATF-5	+	+	+	+		
C/EBP α	+	+	+	+	+	+
C/EBP β	+	+	+	+	+	+
C/EBP γ	+	+	+	+	+	+
C/EBP δ	+	+	+	+	+	+
C/EBP ϵ	+	+	+	+		+
DDIT3/CHOP10	+	+	+	+	+	
DBP	+			+		

The dimerization matrix shows the known dimerization partners between human C/EBP β and C/EBP δ and other bZIP family members. The table shows the 15 out of 47 bZIP transcription factors, known to dimerize with human C/EBP β or C/EBP δ . The ability of these 15 factors to dimerize with the other C/EBP proteins is also shown. Data is from <http://www.edgar-wingender.de/Class%201.1.html>; September 22, 2014 version (Wingender et al., 2015). Note that according to this source, CHOP or C/EBP ϵ cannot form homodimers whereas data by Newman and Keating (2003) suggest otherwise.



2.3.4.2. C/EBP β and C/EBP δ dimerization with other bZIP proteins. C/EBP β and C/EBP δ can form heterodimers with other members of the bZIP class of transcription factors, besides C/EBPs (Grigoryan et al., 2009; Newman and Keating, 2003; Table 3). The bZIP class contains more than 100 members including c-fos, c-jun, CREBs, ATFs or Maf (Wingender et al., 2015). All these factors contain a bZIP domain in which the DNA binding domain that allows recognition of specific DNA sequences differs from that of C/EBPs. The Leu zipper allows some, but not all possible heterodimerization among bZIP factors. Human C/EBP β heterodimerizes with c-fos, c-jun, CREB5, D site albumin promoter binding protein (DBP) and various ATFs and bZIP transcription factors ATF-like (B-ATFs) whereas the list of human C/EBP δ partners is limited at present to ATFs and B-ATFs (Grigoryan et al., 2009; Newman and Keating, 2003; Table 3). When C/EBPs heterodimerize with CREB or ATF members they recognize a composite site composed of half a C/EBP site and half a CREB/ATF site (see Fig. 6C and excellent discussion by Tsukada et al. (2011)). There are various examples of such functional heterodimers and in the case of the C/EBP β /ATF4 heterodimer its crystal structure in the absence of DNA has been reported (Podust et al., 2001). In LPS activated monocytes C/EBP β -CREB and C/EBP β -ATF4 recognize the same composite site in the human prointerleukin 1 β gene. The two heterodimers have different transcriptional effects (Tsukada et al., 1994, 2011). A composite site formed by C/EBP and Cre/ATF halves has been shown to correspond to the amino acid response element located in various gene promoters (Lopez et al., 2007) and has recently been named C/EBP-ATF response element (CARE) (Fu and Kilberg, 2013). C/EBPs can also dimerize with AP-1 proteins, like c-fos or c-jun, and bind to composite DNA binding sites (Fig. 6C) that are conserved in more than 40 human and mouse promoter regions. As an example, FosB transcription is regulated by C/EBP β -AP1 heterodimers (Hong et al., 2011).

2.3.4.3. C/EBP β and C/EBP δ physical interactions with non-bZIP transcription factors. Synergies and antagonisms exist between C/EBP β or C/EBP δ and many non-bZIP transcription factors. Such functional interactions may be caused by adjacent DNA binding sites and/or they may occur through a third element such as a coactivator, a general transcription factor or a mediator complex. The enumeration of the non-bZIP transcription factors that functionally interact with C/EBP β or C/EBP δ is beyond the scope of this review. We will here non-exhaustively list some of the best characterized examples of physical interactions between C/EBP β or C/EBP δ and non-bZIP transcription factors. Most such interactions have been described for C/EBP β .

Functional interaction, often synergistic, between C/EBPs and NF- κ B has been observed for many genes (e.g. Plevy et al., 1997). This is not unexpected since NF- κ B, mainly p65, and C/EBPs (C/EBP β and C/EBP δ) are key regulators of cellular programs such as the acute-phase response and the pro-inflammatory gene expression program. In some, probably most, cases this effect is obtained by synergistic recruiting of coactivators or basal transcription machinery components or by cooperative binding (e.g. Stein et al., 1993). This includes the examples of genes with overlapped or juxtaposed C/EBP and NF- κ B sites (Agrawal et al., 2001; Romagnoli et al., 2009). However, there are reports that suggest a direct physical interaction between NF- κ B and C/EBP proteins at the DNA (see below). Leu-zipper heterodimerization as that reported between C/EBPs and other bZIP factors is not possible between C/EBPs and NF- κ B proteins since NF- κ B proteins lack a Leu-zipper or any similar domain. Dimerization of NF- κ B proteins occurs through a ~100 aa dimerization domain within the Rel homology region by juxtaposition of two β -sheets (Vu et al., 2013). As a result, no proper C/EBP-NF- κ B heterodimer and composite C/EBP-NF- κ B sites exist in a strict sense. The domains

involved in C/EBP-NF- κ B-DNA interactions are not well defined. There are reports of C/EBP-NF- κ B complexes binding to DNA at C/EBP sites (Diehl and Hannink, 1994) and at NF- κ B sites (Dooher et al., 2011; Faggioli et al., 2004; Ruocco et al., 1996). This suggests a model in which one partner, C/EBP or NF- κ B, binds to DNA as a dimer, and recruits the other partner which does not directly bind DNA but it is able to transactivate. Under this model, C/EBP could transactivate genes lacking C/EBP sites in their regulatory genes and the same would be true for NF- κ B. Interaction between C/EBP α or C/EBP β and p50 at the NF- κ B site of the Bcl2 promoter has been studied in detail. Mutagenesis experiments have revealed that this interaction occurs between the basic DNA binding domain of C/EBPs and the so-called p50 insert region of p50 (Dooher et al., 2011). Further research is needed to confirm this mechanism and to determine how widespread it is. A major implication of this is that the set of functional target genes for C/EBPs would be expanded to include genes without C/EBP sites in their regulatory regions.

The **glucocorticoid receptor** (GR) is another transcription factor playing a key role in the regulation of gene expression in inflammation which also interacts with C/EBP β . The main outcome of GR activation by ligand binding is anti-inflammatory. Functional and physical interactions between GR and C/EBPs occur at various levels (see the excellent review by Roos and Nord, 2012). Many acute phase genes promoters show adjacent GR elements and C/EBP sites (Roos and Nord, 2012). For GR binding to most liver genes the previous binding of C/EBP β is necessary, making chromatin accessible to GR (Grontved et al., 2013). GR can inhibit pro-inflammatory gene expression by preventing C/EBP β binding to C/EBP sites (Waterman et al., 2006). Finally, experimental data suggest that some actions of GR are mediated by tethering of GR to DNA-bound C/EBP β providing an explanation for the observed GR actions on non GR element-containing genes (Johansson-Haque et al., 2008).

C/EBP β and C/EBP δ physically interact with **Smad3** and **Smad4**. Smad3/4 do not reduce the ability of C/EBPs to bind to its cognate DNA sequence, but repress transcription by inhibiting the transactivation function of C/EBPs (Choy and Derynck, 2003; Nerlov, 2008). Important hematopoietic transcription factors such as **c-Myb** (Tahirov et al., 2002) and **PU.1** (Listman et al., 2005) physically interact with C/EBP β at the level of the C-terminal end of the Leu zipper, sometimes called the Tail region. Binding of **PPAR α** to the C-terminal region of C/EBP β prevents C/EBP β binding to DNA. The physical interaction of PPAR α with C/EBP β provides an example of the molecular mechanism of negative regulation of acute-phase protein gene expression by blocking C/EBP β (Mouthiers et al., 2005). C/EBP β functions synergistically with the transcription factor **Runx1** by binding to the DNA binding element of only one of the two factors, suggesting tethering. Runx1-C/EBP β cooperatively activate transcription of important neuronal genes such as the purinergic receptor P2X3 (Ugarte et al., 2012) or the cation channel TRPV1 (Ugarte et al., 2013). C/EBP δ -**Runx2** physically interact, bind to osteoblast-specific cis-acting elements and regulate transcription of osteoblast genes (Shin et al., 2006). C/EBP δ binds to **Sp1** via its bZIP domain. Sp1 and C/EBP δ bind as a complex to the Sp1 binding site on the promoter of IL-10 and synergistically activate the transcriptional activity of IL-10 gene in mouse macrophages (Chiang et al., 2006). The various modes of interaction between C/EBPs, DNA and other transcription factors are graphically summarized in Fig. 7A.

2.3.4.4. Transactivation mechanisms: Association with co-activators/co-repressors. Transcription factors ultimately operate by regulating the presence and activity of RNA pol II at specific transcription start sites. This is accomplished by the action of co-activators or co-repressors that may directly interact with general transcription



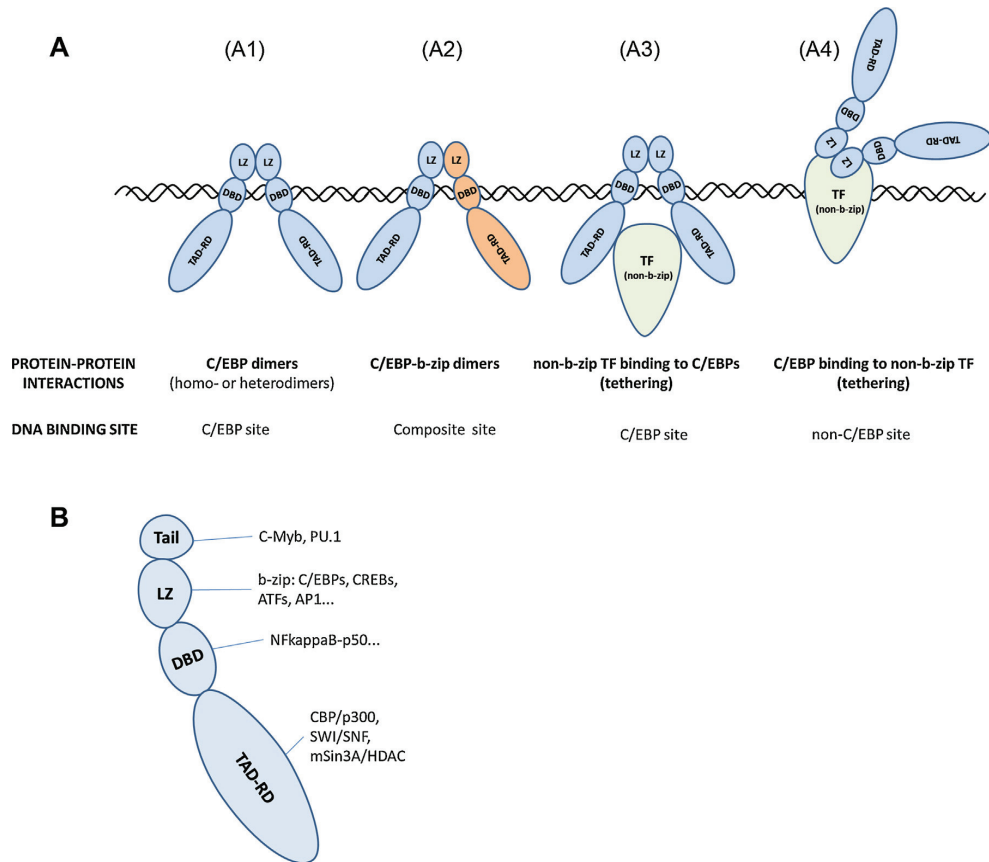


Fig. 7. (A) Modes of physical interaction between C/EBPs, DNA and other transcription factors. C/EBPs (blue) can regulate gene transcription by binding to C/EBP sites in the DNA as homo- or heterodimers (A1). C/EBPs can also form heterodimers with other bZIP proteins (orange) and bind composite sites in the DNA (A2). C/EBP function can be modulated by physical interaction with non-bZIP transcription factors (green). In this case the most common mechanism involves the interaction between the non-bZIP transcription factor and a C/EBP dimer bound to DNA (A3). However, the binding of C/EBPs to a transcription factor bound to DNA in the absence of direct C/EBP-DNA binding has also been described (A4). LZ: Leucine-zipper; DBD: DNA-binding domain; TAD-RD: transactivation domains and regulatory domains; TF: transcription factor. B) This figure summarizes the domains in C/EBP β and δ proteins harboring known sites of physical interactions between C/EBPs and other transcription factors, co-activators and co-repressors. LZ: Leucine-zipper; DBD: DNA-binding domain; TAD-RD: transactivation domains and regulatory domains. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

factors or RNA pol II or may act indirectly by regulating chromatin accessibility. Co-regulators of this second class include histone modifiers and ATP-dependent chromatin remodelers (Shandilya and Roberts, 2012). Co-regulators interact with C/EBP β or C/EBP δ by their transactivation and regulatory domains that are located in the C/EBPs N-terminal region (Fig. 7B). In the transactivation and regulatory domains, seven conserved regions (CR), conserved in all the C/EBP proteins of the same species, have been described (Leutz et al., 2011; see also Fig. 8). Unfortunately, the 3D structure of C/EBP β or C/EBP δ N-terminal region has not been experimentally obtained. The homology among C/EBPs is much lower in the N-terminal region than in the bZIP C-terminal region and the homology in this region between C/EBP β and C/EBP δ is highest than with the rest of C/EBP members (see Leutz et al., 2011, for alignment). As for most aspects of their biology, C/EBP β transactivation mechanisms are better studied than for C/EBP δ .

One of the best characterized interactions between C/EBP β and a coactivator takes place between the CR1 domain and switch/sucrose non fermentable (SWI/SNF), an ATP-dependent chromatin remodeler, and Mediator complexes. This interaction is specific of Full and C/EBP δ since CR1 is absent in LAP, LIP and the other

C/EBPs. Interaction of the CR1 domain of Full with SWI/SNF and Mediator complexes activates transcription (Kowenz-Leutz and Leutz, 1999; Kowenz-Leutz et al., 2010; Mo et al., 2004; Pedersen et al., 2001). Although CR1 is also present in C/EBP δ an equivalent biological function in C/EBP δ has not yet been described. Methylation of a conserved Arg3 in CR1 impairs recruitment of SWI/SNF and Mediator complexes to C/EBP β and results in attenuated activation of myeloid and adipogenic genes. Interestingly, Arg3 methylation is linked to Thr-188 phosphorylation by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Kowenz-Leutz et al., 2010; Leutz et al., 2011).

C/EBP β is also able to recruit the histone acetyltransferases CREB binding protein (CBP)/p300 to specific promoters and this leads to transcription activation (Cui et al., 2005; Christakos et al., 2007; Wang et al., 2007). C/EBP β interacts with p300 through the hydrophobic domains ϕ XX ϕ -like motifs 1 and 2 located in CR4 and CR7, respectively, and through the autoinhibitory domain located in CR5 (Lee et al., 2010b). C/EBP β -p300 interaction induces p300 phosphorylation and it enhances p300 coactivator activity (Schwartz et al., 2003; Steinmann et al., 2009). C/EBP β -recruited p300 has been observed to acetylate histones (Lu et al., 2005) or



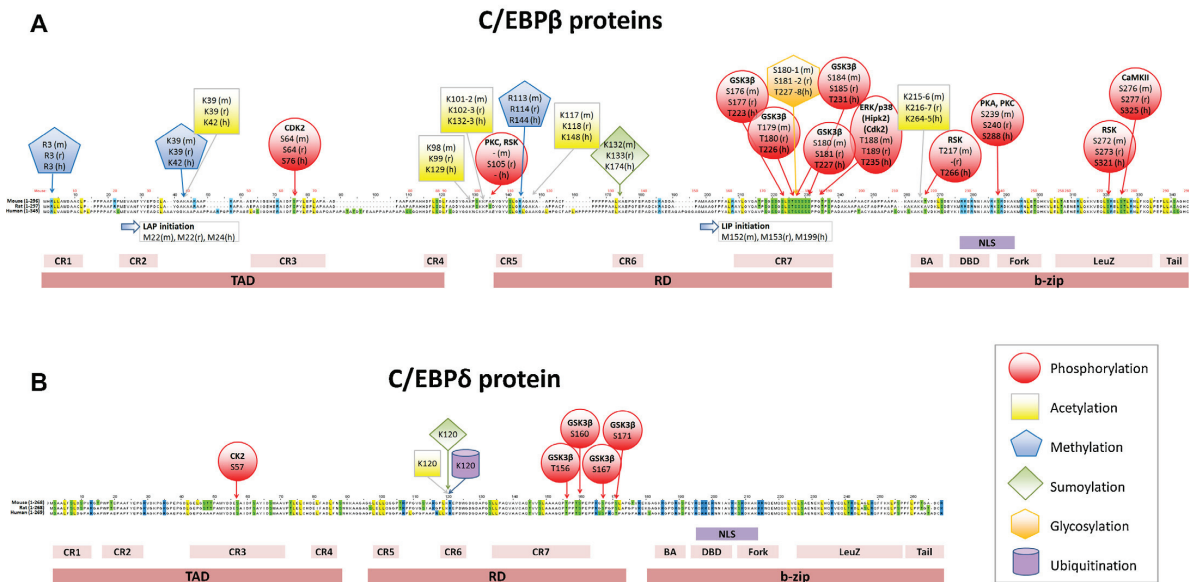


Fig. 8. Amino acid sequence alignment, post-translational modifications, main domains and conserved regions for C/EBPβ (A) and C/EBPδ (B) proteins. In the amino acid alignments some aminoacids are highlighted in color: Ser and Thr in green; Leu in yellow and Arg in blue. The sites of phosphorylation, sumoylation, acetylation, methylation and glycosylations are shown as indicated in the right-bottom box. In (A) black and red numbers refer to positions in human and mouse sequences, respectively. Legends inside boxes indicate the position of the post-translational modification site in the three species and the kinase involved in the case of phosphorylation sites. In (B) the positions of phosphorylation, sumoylation, acetylation and ubiquitination sites are shown. No methylation or glycosylation has been reported for C/EBPδ to our knowledge. Legends inside boxes indicate the position of post-translational modification site and the kinase involved in the case of sites of phosphorylation. Abbreviations: BA: basic/acidic region; CR: conserved region; DBD: DNA-binding domain; h: human; LeuZ: leucine zipper; m: mouse; NLS: nuclear localization signal; r: rat; RD: regulatory domain; TAD: transactivation domain. This figure is inspired by Fig. 1 and Supplementary Fig. 1 in *Leutz et al. (2011)* and by Fig. 1 in *Tsukada et al. (2011)*. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

C/EBPβ itself (*Cesena et al., 2007; Lu et al., 2005*) and both actions can result in transcription activation. C/EBPδ has also been able to recruit and transactivate through CBP/p300 (*Chamberlain et al., 2012; Wang et al., 2006*), residues Leu81 and Phe82 of C/EBPδ being critical for this interaction (*Kovacs et al., 2003*).

C/EBPβ also interacts with the complex formed by the co-repressor mSin3a and the histone deacetylase HDAC. This interaction, particularly with HDAC1, leads to repressed transcription of many genes, including C/EBPα (*Abdou et al., 2011; Wiper-Bergeron et al., 2003*), p53, sirtuin 1 and glycogen synthase kinase 3β GSK3β (*Jin et al., 2009, 2011, 2013*), PPARβ (*Di-Poi et al., 2005*) or microglial CD200R1 (*Dentesano et al., 2012*). Interaction of C/EBPδ with mSin3a/HDAC also inhibits transcription (*Turgeon et al., 2008*). C/EBPβ interacts with mSin3a/HDAC through a small AAGF motif between CR6 and CR7. This motif is located in the N-terminal extreme of LIP and mSin3a/HDAC recruitment is in fact an important mechanism of transcription inhibition by LIP (*Abdou et al., 2011*). The association between C/EBPβ and mSin3a/HDAC1 can be decreased by C/EBPβ acetylation at lysines K98, K101 and K102 (*Wiper-Bergeron et al., 2007*). As mentioned for p300, the C/EBPβ-induced actions of HDAC on transcription can be caused by acetylation of histones or of C/EBPβ itself. Whereas HDAC histone acetylation generally represses transcription, HDAC1-mediated acetylation of C/EBPβ can activate transcription (*Xu et al., 2003*).

Functional interaction between C/EBPβ and other coregulators has been demonstrated but evidence is limited to one or few promoters and no details about the physical interaction have been revealed. Thus, C/EBPβ interacts with the transcription repressors deleted in esophageal cancer 1 (*Park and Park, 2012*) and death domain associated protein (*Wethkamp and Klemmner, 2009*)

and with the histone demethylases Jmjd3 (*Lee et al., 2012a*) and Kdm4b (*Guo et al., 2012*).

2.3.4.5. Relative transactivation potential of C/EBPβ and C/EBPδ. The three C/EBPβ isoforms show different transactivation potential, Full and LAP being generally transcription activators and LIP a transcription inhibitor. LAP is generally a stronger transactivator than Full (see, *Zahnov, 2009* for review), but there are genes for which Full is the primary C/EBPβ isoform that regulates their transcription (*Hu et al., 2000; Qiu et al., 2008*). Several studies have addressed the question of the relative transactivation potential of the different C/EBP family members. These studies have generally analysed the effect of transfecting equivalent amounts of different C/EBP expression vectors on the reporter expression under a given promoter or on mRNA or protein levels of a particular gene. Very often, C/EBPδ shows greater transactivation potential than C/EBPβ (or C/EBPα). This has been observed for alpha 1-acid glycoprotein (*Ray and Ray, 1994b*), T1 kininogen (*Chen and Liao, 1993*), serum amyloid A (*Huang and Liao, 1994; Ray and Ray, 1994a*), platelet-derived growth factor-alpha receptor (*Kitami et al., 1999*), TLR8 (*Zannetti et al., 2010*), NO synthase 2 (*Kolyada and Madias, 2001*) or a reporter under the control of C/EBP sites (*Kovacs et al., 2003*). This can be caused by the fact that C/EBPβ (and C/EBPα) are a mixture of activating and inhibiting isoforms whereas C/EBPδ mRNA codes for a single activating C/EBPδ protein. There are, however, genes for which C/EBPβ and C/EBPδ show similar transactivating potential such as IL-6, C-C motif ligand 2 (CCL2) (*Hu et al., 1998*), human T cell leukemia virus type 1 long terminal repeat (*Grant et al., 2006*), manganese superoxide dismutase (*Qiu et al., 2008*) and genes for which the transactivation potential of C/EBPβ is higher than C/EBPδ (5-lipoxygenase, *Reddy et al.,*



2003; herpes simplex virus thymidine kinase, Grant et al., 2006). This variability comes as no surprise. The transactivation potential of a given C/EBP is affected by many factors including post-translational modifications, promoter structure, cell type and cell status. Therefore on a given situation (cell type, stimulation paradigm, gene) one C/EBP may have higher transactivation potential than another but this cannot be stated in general terms.

2.3.5. Post-translational modifications

After protein synthesis, C/EBP β and C/EBP δ quickly translocate to the nucleus (see Section 2.3.7 for cellular compartmentalization of C/EBPs). In contrast to other functionally related transcription factors such as NF- κ B, CREB or AP1, C/EBPs do not exist in an inactive form in the cytoplasm that translocates to the nucleus in response to a signal. This led to the idea that C/EBPs are basically regulated at the synthesis level. However, it is increasingly clear that this is an oversimplification and that C/EBP β or C/EBP δ activities are finely regulated by post-translational modifications. C/EBPs can be found within the nucleus in multiple forms which has prompted the concept of a transcription factor code (Kowenz-Leutz et al., 2010) analogous to the histone code. Such modifications in C/EBPs can be activating or inhibitory and they can affect protein stability, DNA binding or interaction with transcription factors and coactivators. The main post-translational modifications described for C/EBP β or C/EBP δ are phosphorylation and sumoylation but acetylation, methylation, glycosylation and ubiquitination have also been observed. The following sections provide a descriptive overview on the nature and functional consequences of C/EBP β and C/EBP δ post-translational modifications. This topic has been partially covered in several excellent reviews (Balamurugan and Sterneck, 2013; Leutz et al., 2011; Nerlov, 2008; Tsukada et al., 2011). Aminoacid positions correspond to the mouse sequence unless otherwise indicated.

2.3.5.1. C/EBP β phosphorylation. The best characterized C/EBP β phosphorylation occurs at Thr188 (Thr235 in human) that lies within the CR7 region. Although this is mostly caused by the MAPKs extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Hanlon et al., 2001; Nakajima et al., 1993) and p38 (Zhang et al., 2011a), kinases such as homeodomain-interacting protein kinase 2 (Steinmann et al., 2013) and cyclin-dependent kinase (Cdk)-2 (Atwood and Sealy, 2010) can also phosphorylate this site. This generally results in increased or even activated transactivation capacity, for example in inflammation (Cloutier et al., 2009) and adipocyte differentiation (Steinmann et al., 2013), and it also prevents C/EBP β degradation by calpain (Zhang et al., 2012b). In adipogenesis, Thr188 phosphorylation is followed by Ser184 or Thr179 phosphorylation by GSK3 β and this dual phosphorylation is critical for C/EBP β DNA binding activity (Kim et al., 2007; Tang et al., 2005). Thr188 phosphorylation has also an activating effect on myeloid gene transcription by preventing C/EBP β methylation on Lys39 and Arg3 (Leutz et al., 2011).

In contrast, phosphorylation by GSK3 β at various sites (Ser176, Ser180, Ser184, Thr188) on resting osteoblasts has an inhibitory effect on DNA binding and transactivation (Zhao et al., 2005) and also the dual ERK (Thr188) and GSK3 β (Thr179) phosphorylation results in transactivation inhibition in IL17-treated ST2 cells (Shen et al., 2009). C/EBP β can also be phosphorylated at Ser64 (Ser76 in human) in the CR3 region by homeodomain-interacting protein kinase 2 (Steinmann et al., 2013) or Cdk2 (Shuman et al., 2004). This post-translational modification has been shown to be relevant in adipocyte differentiation and in C/EBP β pro-oncogenic function by enhancing RasV12-induced loss of density-dependent inhibition of growth in mouse fibroblasts (Shuman et al., 2004). Particularly interesting is the ribosomal S6 kinase (RSK) phosphorylation of C/EBP β Thr217 which is not conserved in

rat and it corresponds to Thr266 in human. Thr217 phosphorylation has an apoptotic effect in hepatic stellate cells (Buck et al., 2001a) and macrophages (Buck and Chojkier, 2007) which is unrelated to their transcription factor role since it creates a functional XEXD caspase substrate inhibitor. Ser105 is thought to be the rat functional homologous of Thr217 and it can be phosphorylated by RSK (Buck et al., 1999) and protein kinase C (PKC) (Trautwein et al., 1993).

Finally, several less characterized phosphorylation sites have been described in the C-terminal region of C/EBP β . Thus, phosphorylation at Ser239 by protein kinase A (PKA) or PKC within the DNA binding domain results in inhibition of DNA binding (Trautwein et al., 1994) and it affects nuclear translocation (Chinery et al., 1997) and nuclear export (Buck et al., 2001b). Phosphorylation at Ser272 within the Leu-zipper is produced by RSK and promotes homodimerization (Lee et al., 2010c). Phosphorylation at Ser276, also within the Leu-zipper, is produced by calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) II and it enhances transactivation, probably by promoting dimerization (Wegner et al., 1992). However, phosphorylation of the same residue by PKC was found to reduce DNA binding (Mahoney et al., 1992).

2.3.5.2. C/EBP β sumoylation. C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , and C/EBP ϵ share a conserved motif which is subjected to sumoylation. In C/EBP β this conserved motif is LKAEP, Lys (132 in mouse) being the likely site for attachment of small ubiquitin-like modifier (SUMO) 1 (Kim et al., 2002) or SUMO2/3 (Eaton and Sealy, 2003). Sumoylation of C/EBP β is generally considered to inhibit C/EBP β activity since Lys132 mutation prevents sumoylation and increases C/EBP β activity (Berberich-Siebelt et al., 2006; Eaton and Sealy, 2003; Kim et al., 2002). Interestingly, even though SUMO attachment at Lys132 is located in a domain shared by all C/EBP β isoforms, there is a preferential Full vs LAP sumoylation (Eaton and Sealy, 2003) and Full sumoylation is enhanced by prior ERK phosphorylation of Thr235 (human) (Atwood et al., 2011). Sumoylation of C/EBP β leads to ubiquitination and degradation and this plays a role in adipogenesis regulation. C/EBP β is desumoylated by the SUMO protease sentrin-specific protease 2 which is required for adipogenesis (Chung et al., 2010). In fitting with this, inhibition of protein inhibitor of activated STAT (PIAS) 1, the SUMO E3 Ligase responsible for C/EBP β sumoylation, promotes adipogenesis (Liu et al., 2013b). There is little information on C/EBP β sumoylation in neural cells. SUMO1-C/EBP β has been observed in cultured astrocytes (Akar and Feinstein, 2009) whereas in cultured cerebellar granular neurons the predominant form of Full was sumoylated by SUMO2/3 (Pena-Altamira et al., 2014).

2.3.5.3. C/EBP β non-degradative ubiquitination. Polyubiquitination of C/EBP β is a regulated step that leads to protein degradation and which is discussed below in Section 2.3.6 on Protein stability and degradation. One study has shown non-degradative C/EBP β ubiquitination: in macrophages the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 ubiquitinates C/EBP β resulting in enhanced C/EBP β transactivation of an arginase 1 reporter gene in the presence of IL-4 (Ye et al., 2012).

2.3.5.4. C/EBP β acetylation. Several acetylation sites have been described in C/EBP β , the best characterized being Lys39 and Lys215–216 (Fig. 8A). The first description of C/EBP β acetylation was at Lys215–216, in the basic/acidic region upstream of the DNA-binding domain (Xu et al., 2003). This is produced by CBP (Cesena et al., 2007; Gaub et al., 2011; Lu et al., 2005; Xu et al., 2003) and p300/CBP-associated factor (Xu et al., 2003) and it results in decreased DNA binding (Serrat et al., 2012; Xu et al., 2003). In agreement with the repressor role of this acetylation, mutation of the rat equivalent Lys216–217 enhances C/EBP β -mediated



transactivation of IL-6 and transforming growth factor β 1 (Zhang et al., 2014). However, in another study, mutation of Lys215–216 decreases C/EBP β activation of C/EBP α transcription suggesting the opposite consequence of this acetylation (Cesena et al., 2007). In macrophages, the M1 polarization inducer LPS rapidly acetylates C/EBP β at a not yet identified site (Joo et al., 2004) whereas the M2 polarization inducer IL-4 requires Lys215–216C/EBP β deacetylation for arginase 1 expression (Serrat et al., 2012). This finding suggests that the acetylation status of C/EBP β determines its functional role in the activation profile of macrophages and probably also, though not yet reported, of microglia.

C/EBP β can be acetylated by p300/CBP and deacetylated by HDAC at Lys39. This acetylation, located in a transactivation domain between CR2 and CR3, is necessary for C/EBP β -induced activation of genes such as c-fos, C/EBP α (Cesena et al., 2007), IL-6 or transforming growth factor β 1 (Zhang et al., 2014). The acetylation status of Lys39 is an important regulatory element in the ability of C/EBP β to activate transcription of genes associated with adipogenesis (Cesena et al., 2008). During adipose differentiation of 3T3L1 cells induced by glucocorticoid stimulation, C/EBP β undergoes acetylation also at Lys98, Lys101 and Lys102. Interestingly, these acetylations are not produced by p300/CBP but by GCN5 and p300/CBP-associated factor and lead to increased C/EBP β transactivation and preadipocyte differentiation (Wipberberger et al., 2007). Recently, several acetylation sites have been described by mass spectrometry in chicken C/EBP β which have a distinct pattern of Lys acetylation with unique acetylated Lys sites that are nonetheless conserved in mammals, many of them in the bZIP region (Leutz et al., 2011).

2.3.5.5. C/EBP β methylation. The best characterized C/EBP β methylations are located at Arg3, Lys39 and Arg114. The protein arginine methyltransferase 4 dimethylates C/EBP β at the conserved Arg3 in the N-terminal transactivation domain only found in the isoform Full. Methylation of Arg3 constrains interaction with SWI/SNF and Mediator complexes. Mutation of the Arg3 methylation site alters endogenous myeloid gene expression and adipogenic differentiation (Kowenz-Leutz et al., 2010). As mentioned above, Arg3 methylation is dependent on the Thr188 phosphorylation status (Leutz et al., 2011). C/EBP β can also be methylated at Lys-39 by the histone-lysine N-methyltransferase G9a and this has an inhibitory effect on C/EBP β function (Pless et al., 2008). Finally, monomethylation of C/EBP β in Arg114 (rat) is necessary for Ras-induced C/EBP β derepression (Lee et al., 2010c). A comprehensive mass spectrometry study of rat and chicken C/EBP β has revealed many undescribed methylated Arg and Lys. In rat C/EBP β Lysines 39, 99, 102, 134, 145 and 212 and Arginines 114, 146, 162, 264, 266, 280 and 284 were found to be methylated. Mutagenesis analysis showed that all Arg \rightarrow Ala mutations resulted in enhanced reporter activation indicating a general inhibitory effect of Arg methylation in C/EBP β and showing that the methylation pattern governs C/EBP β functionality (Leutz et al., 2011).

2.3.5.6. C/EBP β glycosylation. C/EBP β shows covalent attachment of O-linked N-acetylglucosamine at Ser180 and Ser181. This O-GlcNAcylation prevents phosphorylation of the nearby residues Thr188, Ser184, and Thr179 and decreases C/EBP β DNA binding and transactivation activities, resulting in a delayed adipocyte differentiation program (Li et al., 2009).

2.3.5.7. C/EBP δ post-translational modifications. Compared with C/EBP β , relatively few post-translational modifications have been described in C/EBP δ and accordingly it has been claimed that C/EBP δ activity is mainly regulated by de novo synthesis (Ramji et al., 1993). Although there are probably many post-translational modifications to be revealed in C/EBP δ , it is probably also true

that post-translational regulation is more complex for C/EBP δ than for C/EBP β . The first indication of a regulatory role of post-translational modifications on C/EBP δ function came from studies showing that C/EBP δ DNA binding and transactivating potential were inhibited by dephosphorylation and increased by phosphatase inhibitors, but the phosphorylation sites or the kinases involved were not identified (Ray and Ray, 1994a,b). Since then the activating effect of phosphorylation on C/EBP δ function has been confirmed and extended to show that phosphorylation increases C/EBP δ DNA binding activity, Tyr phosphorylation of C/EBP δ has been reported and kinases such as casein kinase 1 and p38 have been shown to phosphorylate C/EBP δ at yet unidentified sites (Lacorte et al., 1997; Osada et al., 1996; Svtolis et al., 2005). Potential C/EBP δ phosphorylation sites have been listed (Ji et al., 2003; Ko et al., 2014) but identification of functional phosphosites has only recently been reported. The first such report revealed C/EBP δ phosphorylation by GSK3 β kinase on Thr156 and possibly Ser160 in macrophages. GSK3 β -induced C/EBP δ phosphorylation accelerates C/EBP δ turnover (Balamurugan et al., 2013). GSK3 β has also been found to phosphorylate C/EBP δ on Ser167 and Thr171 in astrocytes. Thr171 phosphorylation is constitutive whereas Ser167 is induced by IL-1 β and it plays a role in C/EBP δ regulation of astroglial migration and astroglial-induced microglial activation (Ko et al., 2014). Casein kinase 2 has recently been shown to phosphorylate C/EBP δ on Ser57 resulting in enhanced transcriptional activity (Schwind et al., 2015). C/EBP δ can also be sumoylated by attachment of SUMO1 (Kim et al., 2002) or SUMO2 and SUMO3 (Zhou et al., 2008) to Lys120, within a conserved sumoylation site. C/EBP δ sumoylation attenuates C/EBP δ transactivation by preventing interaction with p300 (Wang et al., 2006) and allowing recruitment of various HDACs (Lai et al., 2008; Wang et al., 2008). Finally, C/EBP δ can be acetylated, also at Lys120, resulting in enhanced cyclooxygenase 2 (COX2) transactivation (Wang et al., 2006). Lys120 is also required for C/EBP δ polyubiquitination which makes Lys120 an important residue for three different types of modification in C/EBP δ (Sarkar et al., 2012).

2.3.6. C/EBP β and C/EBP δ protein stability and degradation

C/EBP β shows greater protein stability (Hattori et al., 2003) than other C/EBPs that are constitutively polyubiquitinated and show very short $t_{1/2}$. Most C/EBP β $t_{1/2}$ estimates range between 4 and 20 h. C/EBP β stability can be regulated and, interestingly, differences exist in the regulation of protein stability among C/EBP β isoforms. Thus, Ras causes selective degradation of Full without affecting LAP or LIP turnover in an immortalized mammary epithelial cell line (Atwood and Sealy, 2010) whereas in the course of adipogenesis both LAP and LIP show increased degradation that is more marked for LIP (Lechner et al., 2013). These changes in C/EBP β protein stability are the result of post-translational modifications. Thus, sumoylation of C/EBP β promotes C/EBP β protein degradation and this effect can be reversed by the desumoylating enzyme SENP2 (Chung et al., 2010). On the other hand, phosphorylation at Ser184, Thr179 and particularly Thr188 increases C/EBP β stability in 3T3-L1 preadipocytes (Zhang et al., 2012b) whereas Cdk2 phosphorylation of Full on Thr235, the human analog of Thr188, promotes C/EBP β Full degradation in Ras transformed cells (Atwood and Sealy, 2010). C/EBP β turnover can be mediated by polyubiquitination and proteasome degradation (Chung et al., 2010; Hattori et al., 2003; Lechner et al., 2013) but also by the action of calpain (Zhang et al., 2012b).

C/EBP δ shows a shorter biological half-life than C/EBP β , with $t_{1/2}$ estimates ranging between 2 and 4 h in epithelial cells and macrophages (Balamurugan et al., 2013; Dearth and DeWille, 2003; Sivko et al., 2004). Although C/EBP δ degradation has been reported to be proteasome-mediated but ubiquitin-independent



(Zhou and Dewille, 2007), a recent report has shown that in breast tumor cell lines, C/EBP δ polyubiquitination at Lys120 by the SIAH2 E3 ubiquitin ligase leads to C/EBP δ proteasomal degradation (Sarkar et al., 2012) and in macrophages, phosphorylation of C/EBP δ by GSK3 β and ubiquitination by the ubiquitin ligase FBXW7 α are required for C/EBP δ degradation. Interestingly, in LPS-activated macrophages C/EBP δ stability is enhanced, at least in part by inhibition of the GSK3 β /FBXW7 α pathway (Balamurugan et al., 2013).

2.3.7. Subcellular and subnuclear localization

As mentioned above the main mechanisms of regulation of C/EBP β and C/EBP δ activities are increased protein levels, usually achieved by increased transcription, although regulation of translation and protein degradation play also a role, and post-translational modifications, particularly for C/EBP β . In contrast to many transcription factors, regulation of C/EBP β or C/EBP δ nuclear translocation plays a minor role in this respect and they are predominantly nuclear proteins.

2.3.7.1. C/EBP β . C/EBP β contains one functional nuclear localization signal (NLS) in its bZIP region (Williams et al., 1997) (Fig. 8A) and after being synthesized it is rapidly sent to the nucleus where it resides in a more or less active form in most cells and physiological conditions. There are reports showing significant levels of cytoplasmic C/EBP β in hepatocyte cell lines (Ki and Kim, 2008; Lee et al., 2007; Yin et al., 1996), in a colorectal cancer cell line (Chinery et al., 1997) and in thyroid papillary carcinoma cells (Akagi et al., 2008; Pomerance et al., 2005). Phosphorylation of Ser239 in mouse (Ser288 human), which is part of the NLS, regulates C/EBP β nuclear transport. Thus, in hepatocytes tumor necrosis factor α (TNF α)-induced C/EBP β phosphorylation on Ser239 leads to rapid nuclear export (Buck et al., 2001b). Somewhat surprisingly, the same post-translational modification is essential for C/EBP β nuclear import induced by pyrrolidine dithiocarbamate in a colorectal cancer cell line with an unusual C/EBP β cytoplasmic localization (Chinery et al., 1997). In cerebellar granular neurons, insulin-like growth factor (IGF)-1 induces a rapid C/EBP β nuclear export that is dependent upon CaMKIV and chromosome region maintenance 1. After export, C/EBP β localizes in large perinuclear puncta and whether the fate of this C/EBP β is retranslocation or degradation remains unknown (Marshall et al., 2003). The opposite situation is again observed in cells with basal cytoplasmic C/EBP β , H4IIE hepatoma cells, where IGF-1 induces C/EBP β translocation that is here dependent upon phosphoinositide 3 kinase (Lee et al., 2007). Transfected p27S J , a Hypericum perforatum (St John's Wort) protein, associates with C/EBP β and sequesters it in the cytoplasm (Darbinian-Sarkissian et al., 2006). Little is known regarding isoform specific regulation of nuclear translocation. Differential LAP vs LIP nuclear translocation has been reported in HL-60 human acute myeloid leukaemic cells induced to differentiate into monocytes with 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Marcinkowska et al., 2006) and in cultured cerebellar granular neurons (Pena-Altamira et al., 2014).

Various reports have analyzed the subnuclear localization of C/EBP β , particularly in adipogenesis. During adipocyte differentiation, C/EBP β distribution in the nucleus changes from a diffuse to a punctate pattern which corresponds to pericentromeric heterochromatin (Tang and Lane, 1999). This nuclear relocalization is blocked by MAPK inhibitors (Piwien Pilipuk et al., 2003) and by carnosine (Gaya et al., 2013). Using bimolecular fluorescence complementation in living cells, it was observed that LAP homodimers localize in euchromatin and heterochromatin whereas LIP homodimers localize exclusively in heterochromatin (Susperreguy et al., 2011). Subnuclear relocalization of C/EBP β has also been reported in macrophages (Baer et al., 1998) and

endothelial cells (Fukuoka et al., 1999) but it has been much less characterized.

2.3.7.2. C/EBP δ . C/EBP δ contains one NLS within its basic DNA-binding domain (Williams et al., 1997) (Fig. 8B). Removal of either the basic or the Leu-zipper domain prevents nuclear translocation suggesting that the Leu-zipper contains determinants required for nuclear translocation (Billiard et al., 2001b). Despite its predominant nuclear localization significant cytosolic levels of C/EBP δ have been reported in some cell types including the rat hepatocyte cell line RALA255-10G cultured at a permissive temperature (Yin et al., 1996) and rat osteoblasts (Billiard et al., 2001b) but not human osteoblasts (Billiard et al., 2001a). Examples of cytosolic C/EBP δ are particularly frequent in CNS cells. Thus, astrocytes in Alzheimer's disease brain (Li et al., 2004), neurons in spinocerebellar ataxia type 3 brain regions that showed neuronal cell loss (Evert et al., 2006) and rat brain neurons both in culture and in vivo (Arguello et al., 2013) display cytosolic C/EBP δ immunoreactivity. There are not many clues yet as to what the role of non-nuclear C/EBP δ might be. To our knowledge, the best described role for non-nuclear C/EBP δ is as a facilitator of the nuclear import of the fanconi anemia group D2 protein (Wang et al., 2010). Little is known also about mechanisms that regulate C/EBP δ nuclear transport. Importin 4 has been identified as one of the nuclear importers of C/EBP δ (Wang et al., 2010). Although C/EBP δ is not a PKA substrate, PKA inhibition causes C/EBP δ cytosolic accumulation (Billiard et al., 2001a,b).

Although less studied than C/EBP β , there is also evidence for C/EBP δ subnuclear relocalization. As with C/EBP β , the pattern of C/EBP δ nuclear localization shifts from diffuse to punctate in adipocyte differentiation and the punctate distribution corresponds to pericentromeric heterochromatin and coincides with the acquisition of DNA-binding activity (Tang and Lane, 1999). In contrast, treatment of quiescent preadipocytes with growth hormone does not change C/EBP δ subnuclear localization, as it does for C/EBP β , and C/EBP β and C/EBP δ are generally excluded in this experimental model (Piwien Pilipuk et al., 2003). In HC-11 non-transformed mammary epithelial cells, C/EBP δ localizes in transcriptionally active discrete nuclear foci. Expression of PIASy promotes the physical interaction between PIASy and C/EBP δ leading to the sequestration of C/EBP δ to the nuclear periphery and to decreased C/EBP δ target genes expression (Zhou et al., 2008).

In summary, subcellular and subnuclear relocalization are additional potential modes of regulation of C/EBP β and C/EBP δ function by determining their accessibility to DNA. Further research is needed to establish the functional importance of this mechanism, but with the available data this seems to be minor in most cells.

3. C/EBP β and C/EBP δ function

3.1. Physiological roles outside the CNS

C/EBP β and C/EBP δ play multiple physiological roles. By regulating transcription of specific sets of genes, they participate in a cell-specific manner in cellular programs such as cell differentiation, proliferation, cell death and survival, energy metabolism as well as in more global responses such as inflammation. The description of the role of C/EBP β and C/EBP δ in these processes is out of the scope of this review and it has been dealt with in excellent reviews. In most such reviews the focus is on C/EBP β (Nerlov, 2007; Ramji and Foka, 2002; Schrem et al., 2004; Zahnnow, 2009). For a detailed discussion on the physiological roles of C/EBP δ the reader is referred to the recent review by Balamurugan and Sterneck (2013).



3.2. C/EBP β and C/EBP δ : More than transcription factors?

When considering the physiological roles of C/EBP β and C/EBP δ it is important to keep in mind the possibility that they act as moonlighting or multitasking proteins, this is, that they have acquired functions in addition to their role as transcription factors. This has been demonstrated for C/EBP α which can directly interact and inhibit Cdk5 (Wang et al., 2001) or E2F (Porse et al., 2001) independently of the DNA binding domain. C/EBP β can also be considered a moonlighting protein since it can act as a caspase inhibitor in a manner that is totally independent from its actions as transcription factor. As it has been mentioned before, phosphorylation of Thr217 in C/EBP β creates a functional XEXD caspase substrate inhibitor resulting in an acquired antiapoptotic role for C/EBP β (Buck and Chojkier, 2007; Buck et al., 2001a). C/EBP δ plays also a moonlighting role as a facilitator of the nuclear import of DNA repair proteins (Wang et al., 2010).

4. C/EBP β and C/EBP δ in the CNS

4.1. Localization of C/EBP β and C/EBP δ in the normal CNS

C/EBP β and C/EBP δ play important roles also in the CNS, both in neuronal and non-neuronal cells. There is ample evidence for the *in vitro* expression of C/EBP β and C/EBP δ in neural cells and for changes in their *in vivo* expression in the CNS in response to a variety of physiological or pathological changes. In spite of this, a detailed description of the cellular and subcellular localization of C/EBP β and C/EBP δ in the normal/healthy CNS is missing. This is probably caused to a great extent by the inconsistency of some of the most popular C/EBP β or C/EBP δ antibodies when used in immunohistochemistry. At the mRNA level, both C/EBP β (Nadeau et al., 2005; Sterneck and Johnson, 1998) and C/EBP δ (Sterneck et al., 1998) have been mapped in the mouse brain by *in situ* hybridization histochemistry. Although no double labelling was done to unequivocally identify the nature of the positive cells, the pattern of distribution suggest the presence of C/EBP β and C/EBP δ mRNA in specific neuronal populations. At the protein level, very weak C/EBP β immunoreactivity has been reported in most rat brain structures. Significant staining, nuclear in all cases, has been observed in the hippocampus and to a lesser extent in the pituitary and ventricle linings (Damm et al., 2011). A defined C/EBP β staining is also seen in CA1 in mouse brain. Again, no double labelling has been performed, but the images suggest a neuronal C/EBP β localization that is predominantly cytosolic in this case (Rininger et al., 2012). Finally, marked C/EBP β immunoreactivity has also been reported in rat cerebellar Purkinje neurons (Alvarez et al., 2005). As regards C/EBP δ there is very little information on its CNS distribution at the protein level. Weak C/EBP δ immunoreactivity has been observed in the rat CA3 and in some amygdala nuclei (Arguello et al., 2013) and in the murine dentate gyrus (Valente et al., 2013), but the cell type and subcellular localization have not been resolved. In summary, although much remains to be clarified in this field, the actual reports point to a weak basal level of expression of both C/EBP β and C/EBP δ in the normal adult CNS that is predominantly neuronal and nuclear.

4.2. Changes in C/EBP β and C/EBP δ expression in the CNS

In contrast to the paucity of studies regarding the expression of C/EBP β and δ in the normal/healthy CNS, numerous studies have reported that the expression of these transcription factors in the CNS can be altered in many experimental and pathological situations. We will review these studies in three separate sections: *in vitro* (Section 4.2.1), *in vivo* animal models (Section 4.2.2) and human brain studies (Section 4.2.3).

4.2.1. *In vitro* regulation of C/EBP β and C/EBP δ expression

4.2.1.1. Studies on neurons. C/EBP β expression has been observed in a variety of primary neuronal cultures and neuronal cell lines. Neuronal C/EBP β expression increases *in vitro* in response to cAMP or Ca²⁺ (Yukawa et al., 1998), dopamine (Kovacs et al., 2006) or depolarization (Sun et al., 2007). These data suggest that C/EBP β is a neuronal activity-dependent gene. As it will be discussed later, C/EBP β is pleiotropic in neurons and the observations that neuronal C/EBP β levels increase upon aminoacid deprivation (Grewal et al., 2009) or growth factor removal (Marshall et al., 2003) point to a role for C/EBP β also in neuronal death. Potassium deprivation in cultured cerebellar granular neurons induces isoform specific changes in C/EBP β proteins with decreases in Full and LAP and increase in LIP (Pena-Altamira et al., 2014). Few studies have addressed the issue of neuronal C/EBP δ expression *in vitro*. As reported for C/EBP β , rat neuronal C/EBP δ expression is upregulated by cAMP or Ca²⁺ *in vitro* (Yukawa et al., 1998). A recent study in rat hippocampal cultures has shown the presence of C/EBP δ protein and mRNA in dendrites which may imply a role for C/EBP δ in the relay of signals between the synapse and the nucleus (Arguello et al., 2013). Finally, the complement components C5a and C1q upregulate C/EBP β (Gong et al., 2013) and C/EBP δ (Benito and Tenner, 2011), respectively, in rodent neuronal cultures. Regarding transcription regulation of C/EBPs in neurons, *in vitro* data clearly shows the control of neuronal C/EBP β and C/EBP δ expression by CREB (Gong et al., 2013; Yukawa et al., 1998).

4.2.1.2. *In vitro* regulation of C/EBP β and C/EBP δ expression: Studies on astrocytes. A great number of studies have reported C/EBP β and C/EBP δ expression in cultured astrocytes and changes in their expression induced by a variety of stimuli. Due to the high number of studies, we will limit this discussion to studies on primary astroglial cultures although rat C6 and human U373MG astroglial cell lines have also been used, generally with coincident results.

The most widely used stimulus to induce C/EBP β and C/EBP δ expression in cultured astrocytes is LPS which robustly upregulates C/EBP β and C/EBP δ at the level of mRNA, protein, DNA binding and reporter activation (Akar and Feinstein, 2009; Cardinaux et al., 2000; Ejarque-Ortiz et al., 2010; Ejarque-Ortiz et al., 2007a; Giri et al., 2004; Lamirand et al., 2011; Samuelsson et al., 2008) and these effects are also induced by other TLR agonists (Ejarque-Ortiz et al., 2010). The LPS-induced increase in C/EBP β and C/EBP δ mRNA levels in astrocytes is rapid (1–3 h) and C/EBP β increase precedes that of C/EBP δ . Both upregulations are unaffected by cycloheximide and accordingly C/EBP β and C/EBP δ can be considered immediate-early genes in LPS-induced astroglial activation (Cardinaux et al., 2000). In murine primary cultures, LPS-induced upregulation of C/EBP β is less marked in astrocytes than in microglia (Ejarque-Ortiz et al., 2007a) whereas for C/EBP δ the effect is similar in both cell types (Ejarque-Ortiz et al., 2010).

It may be questioned whether LPS-induced changes on C/EBP β or C/EBP δ expression are direct effects of LPS on astrocytes since there are doubts about the presence of functional TLR4 in astrocytes (Holm et al., 2012) and primary astroglial cultures are always contaminated to a certain extent with microglial cells (Saura, 2007) which express high levels of TLR4 and could indirectly activate astrocytes. Data on astroglial cell lines support a direct effect. Directly or indirectly, there is no doubt that activated astrocytes upregulate C/EBP β and C/EBP δ nuclear levels. **Pro-inflammatory cytokines** released by microglia are candidates to mediate microglia-induced upregulation of C/EBP β and C/EBP δ levels in astrocytes. Various pro-inflammatory cytokines upregulate C/EBP β and C/EBP δ in astrocytes which, together with the effects of LPS, points to a role of C/EBP β and C/EBP δ in astroglial activation. IL-1 β is the most often reported cytokine to upregulate



C/EBP β or C/EBP δ in astrocytes (Fields et al., 2011, 2013; Kim et al., 2004; Li et al., 2004; Samuelsson et al., 2008). IL-6, TNF α or IFN γ can also upregulate astroglial C/EBP β or C/EBP δ but, when properly compared, IL-1 β is consistently more potent at inducing this effect than any of these cytokines (Cardinaux et al., 2000; Fields et al., 2011; Jana et al., 2005; Ko et al., 2014).

Some studies have reported modulation of C/EBP β or C/EBP δ expression in astrocytes by **neurotransmitters**. The most detailed study showed that in mouse primary astrocytes noradrenaline (via β receptors) and the neuropeptides vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide induce rapid and marked increases in both C/EBP β and C/EBP δ mRNA and protein. Time-course analysis revealed that C/EBP β upregulation occurs at 1–2 h and is transient whereas C/EBP δ upregulation occurs even earlier (30 min–1 h) and is sustained up to 24 h. The effects of these neurotransmitters are probably mediated by cAMP signaling since a cAMP analog and the adenylate cyclase activator forskolin also upregulate astroglial C/EBP β and C/EBP δ expression (Cardinaux and Magistretti, 1996). Noradrenaline also modulates C/EBP β sumoylation in rat cultured astrocytes (Akar and Feinstein, 2009). C/EBP δ induction by cAMP or by β -adrenergic agonists has been confirmed in other studies (Colangelo et al., 1998; Schwaninger et al., 2000). Glutamate is another neurotransmitter that regulates astroglial C/EBP β and C/EBP δ expression. It induces a rapid and transient (10 min–2 h) upregulation of C/EBP β mRNA that is also observed at the level of protein, DNA binding and C/EBP β phosphorylation. The glutamate receptors involved were not identified but the increase is PKC and calcium-dependent. Surprisingly, glutamate causes a marked reduction of C/EBP δ mRNA levels that is transient and delayed relative to C/EBP β (Yano et al., 1996). This constitutes one of the clearest examples of differential C/EBP β vs C/EBP δ response.

The effects of A β on astroglial C/EBP β and C/EBP δ have been studied often under the expectation that A β would upregulate their astroglial expression. The findings that C/EBP δ is upregulated in Alzheimer's disease astrocytes (Li et al., 2004) and in an amyloid precursor protein transgenic Alzheimer's disease mouse model (Ko et al., 2012) supports this hypothesis. In contrast, C/EBP δ levels are decreased in the brain of another Alzheimer's disease transgenic mouse model (Ramberg et al., 2011). Since the cell types were not resolved, it is possible that neuronal C/EBP δ is involved in this decrease. Unexpectedly, IL-1 β - or LPS-induced upregulation in C/EBP β and C/EBP δ levels in rat astroglial-enriched cultures are reversed by A β suggesting more complex than thought effects of A β on astroglial activation (Samuelsson et al., 2008; Ramberg et al., 2011). C/EBP β expression is also upregulated in astrocytes by human immunodeficiency virus (HIV) proteins such as the regulatory protein Tat (Liu et al., 2002) and the envelope glycoprotein JR-FL HIV (Fields et al., 2011).

4.2.1.3. In vitro regulation of C/EBP β and C/EBP δ expression: Studies on microglia. Studies reporting changes in C/EBP β or C/EBP δ expression in cultured microglia are less abundant than in cultured astrocytes. In our opinion this is caused by the difficulty to obtain high numbers of primary microglial cells rather than to a lower intrinsic potential of microglia to express these transcription factors in response to stimuli. In fact, when properly compared in murine primary cultures, LPS-induced upregulation of C/EBP β is stronger in microglia than in astrocytes (Ejarque-Ortiz et al., 2007a) and similar in both cell types for C/EBP δ (Ejarque-Ortiz et al., 2010). In studies with primary microglial cultures, most reports have analyzed changes in microglial C/EBP β and C/EBP δ expression caused by stimuli that could be defined as pro-inflammatory, and in all cases this resulted in the upregulation of microglial C/EBP β and/or C/EBP δ expression. Thus, LPS (Ejarque-Ortiz et al., 2007a, 2010) or TNF α +IFN γ (Paglinawan et al., 2003)

upregulate both C/EBP β and C/EBP δ mouse microglial expression, and macrophage migration inhibitory factor, a pro-inflammatory cytokine, increases mouse microglial C/EBP β expression (Cox et al., 2013). C/EBP β microglial expression is also upregulated by excitotoxic neuronal death in rat neuronal-microglial co-cultures (Perez-Capote et al., 2006). Recent studies in adult human microglial cultures have shown that C/EBP β expression is upregulated by macrophage colony-stimulating factor, a microglial mitogen, (Smith et al., 2013) and by the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL6 or TNF α (Strohmeier et al., 2014). The upregulation of microglial C/EBP β and C/EBP δ upon pro-inflammatory stimulation has also been observed in experiments with the microglial cell lines BV2 (Dasgupta et al., 2003; Ejarque-Ortiz et al., 2007a, 2010; Gresa-Arribas et al., 2010; Jana et al., 2002, 2003) and N9 (Chang et al., 2008).

4.2.2. Changes in C/EBP β and C/EBP δ expression in vivo in the CNS. Studies in animal models

4.2.2.1. Learning paradigms. Changes in C/EBP β and C/EBP δ expression in rodent CNS have been observed after various **learning paradigms**. Inhibitory avoidance training in rats resulted in a time-dependent increase in hippocampal C/EBP β expression in mRNA and protein between 9 and 28 h. Immunohistochemistry revealed an increase in C/EBP β in CA1 24 h after training with the same pattern as pCREB and C/EBP δ . The signal had a neuronal appearance but no double labelling experiments were performed and the images shown were of not enough resolution to determine the subcellular localization of the signal (Taubenfeld et al., 2001b). After this seminal study increases in C/EBP β mRNA and protein levels in the rat or mouse hippocampus have been observed 18–24 h after inhibitory avoidance training (Garcia-Osta et al., 2006), contextual fear conditioning (Athos et al., 2002; Monti et al., 2005) and novel taste learning (Yefet et al., 2006) which resulted in increased C/EBP β protein levels also in the insular cortex (Merhav et al., 2006; Yefet et al., 2006). Learning-induced increases in mouse hippocampal C/EBP β expression are CREB-dependent (Athos et al., 2002). In all these studies, the changes in C/EBP β levels are assumed to be neuronal, but no direct demonstration has been provided to our knowledge. Less studied than C/EBP β , C/EBP δ expression also increases in the rat hippocampus after inhibitory avoidance training (Taubenfeld et al., 2001b). C/EBP δ upregulation in the hippocampus is preceded by upregulation in the basolateral amygdala. Immunohistochemistry and in situ hybridization revealed the localization of learning-induced C/EBP δ protein in neuronal nuclei, soma and dendrites and C/EBP δ mRNA in neuronal soma and dendrites, respectively (Arguello et al., 2013). As it will be discussed later, experiments with antisense and RNAi have revealed a key role for C/EBP β and C/EBP δ in memory formation and consolidation.

4.2.2.2. Neuroinflammation by systemic LPS infusion. Systemic infusion of LPS induces in rodents a rapid neuroinflammatory response throughout the CNS in the absence of short-term overt neuronal damage. A single systemic LPS injection induces a marked increase in CNS C/EBP δ mRNA levels and to a lesser extent of C/EBP β . This upregulation is rapid (3–4 h), transient, occurs concomitantly in many peripheral tissues and is not observed for C/EBP α (Alam et al., 1992; Saito et al., 1999). Gel shift and western blot studies have revealed that these increases also occur at the protein level (Damm et al., 2011; Ejarque-Ortiz et al., 2007a; Saito et al., 1999; Valente et al., 2013). Systemic inflammation induces a rapid increase of C/EBP β immunoreactivity throughout the rat brain, being particularly strong in circumventricular organs, meninges and around blood vessels. Approximately 20–30% of all neural cells show C/EBP β immunoreactivity 4–8 h after systemic



LPS and the C/EBP β signal co-localizes with markers of endothelial cells, neurons, astrocytes and microglia to various degrees depending on the brain area (Damm et al., 2011; Fuchs et al., 2013). A similar pattern is observed by systemic infusion of the TLR9 agonist ODN 1668 (Damm et al., 2014). At later time-points (16–24 h) after systemic LPS injection in mice, approximately 50% of C/EBP β positive cells correspond to astrocytes and microglia, whereas the remaining 50% of cells have not been identified (Ejarque-Ortiz et al., 2007a; Valente et al., 2012). Microglial C/EBP β expression has also been observed after intrahippocampal LPS infusion which is a fundamentally different experimental model because it induces rapid neuronal damage (Pan et al., 2013a). The only study of cellular localization of C/EBP β in the CNS after systemic LPS has revealed an increase in C/EBP δ protein levels at 16–48 h, not at earlier time points, and the presence of this signal primarily in astrocytes and microglia and marginally in neurons (Valente et al., 2013). In summary, these data show that in the neuroinflammatory response in vivo, activated astrocytes and microglia can upregulate their C/EBP β and C/EBP δ protein levels.

4.2.2.3. Ischemic, traumatic or excitotoxic injury. In many animal models of ischemic, traumatic or excitotoxic injury C/EBP β and C/EBP δ levels increase in the CNS lesioned area. Time-course analyses show a peak in C/EBP β and C/EBP δ mRNA upregulation 24 h after focal cerebral ischemia (Kapadia et al., 2006) or traumatic brain injury (Sandhir and Berman, 2010). The increase 24 h post-insult has been replicated in many studies (Choi et al., 2009; Hua et al., 2011; Ridder et al., 2009; Tureyen et al., 2007; von Gertten et al., 2005). Increased C/EBP β and C/EBP δ mRNA levels have also been reported to occur early in areas of lesion after traumatic brain injury (Oliva et al., 2012) or exposure to carbonyl sulphide, a gas that produces highly reproducible neurotoxicity in the rat CNS, particularly in the posterior colliculus (Morrison et al., 2009). The above studies have analyzed C/EBP β or C/EBP δ expression at the mRNA level and, surprisingly, the only one that also analyzed protein levels found that the increase in C/EBP β and C/EBP δ mRNA levels after cerebral ischemia did not translate into protein changes (Ridder et al., 2009). Further studies are needed to clarify this point. Few studies have analyzed the cellular localization of C/EBPs in the CNS after injury. The most detailed study of C/EBP localization in the injured brain was performed after intrahippocampal injection of kainic acid in mice. This lesion induced the appearance of predominantly nuclear C/EBP β immunoreactivity in neurons, astrocytes and microglia. Whereas 24 h after injury all three cell types showed C/EBP β immunoreactivity, the signal was primarily neuronal 72 h after injury. On a study of transient forebrain ischemia in gerbils, both C/EBP β and C/EBP δ immunoreactivities were induced in hippocampal cells of neuronal morphology. The signal was observed in all the cell soma and appeared 3 days after the insult (Soga et al., 2003). These two studies suggest a predominant neuronal C/EBP β or C/EBP δ expression in the injured brain. However, the parallel increase of C/EBP β or C/EBP δ with neuroinflammation markers (Hua et al., 2011; Kapadia et al., 2006; Morrison et al., 2009; Tureyen et al., 2007) together with the abovementioned upregulation of C/EBP β and C/EBP δ in activated glial cells suggests a predominantly glial rather than neuronal localization. This is supported by the recently reported expression of C/EBP β in activated microglia in the lesion core 48 h after middle cerebral artery occlusion (Wang et al., 2013a). In summary, in models in which neuronal damage and neuroinflammation co-occur C/EBP β or C/EBP δ expression can be altered in neurons, glia or both and these changes can have different time-courses or even be of opposite sign depending on the cell type. Experiments, preferably time-course studies, with cellular resolution techniques and cell specific markers are needed to clarify this important point.

4.2.2.4. Other models. Increases in the CNS expression of C/EBP β or C/EBP δ have been observed in aging (Akar and Feinstein, 2009), Huntington's disease mouse model (Obrietan and Hoyt, 2004), Alzheimer's disease mouse model (Ko et al., 2012) where C/EBP β expression was located in astrocytes (Ko et al., 2014) and prosapin deficient mice which show a complex neurodegeneration with neuronal and microglial accumulation of glycosphingolipids and demyelination (Sun et al., 2008). In most cases the cell type in which the C/EBP β or C/EBP δ upregulation occurred was not identified but the associated neuroinflammation in these paradigms suggests localization in activated glial cells. In contrast to this trend, C/EBP δ expression in the CNS was observed to be reduced in aging and in association with Alzheimer's disease pathology in a mouse model (Ramberg et al., 2011).

C/EBP β upregulation in the CNS has also been described in a variety of otherwise unrelated experimental in vivo models and in most cases the cell types involved were not identified. Thus, C/EBP β levels are increased in rat cerebellum by hypothyroidism (Alvarez et al., 2005), in the hippocampus by experimental diabetes (Kazkayasi et al., 2013), in rat frontal cortex and midbrain by systemic lysergic acid diethylamide injection (Nichols and Sanders-Bush, 2004) and in rat hypothalamic neurons by dehydration-induced remodeling (Qiu et al., 2007). Down-regulation of C/EBP β in the CNS is rarer and it has been reported in mouse in prefrontal cortex after inflammatory pain by facial carrageenan injection (Poh et al., 2011) and in hippocampus after chronic electroconvulsive seizures (Chen et al., 2004b). Hypoxic preconditioning in rats and mice (Bernaudin et al., 2002; Tang et al., 2006b) and exposure to hyperbaric oxygen in rats (Hirata et al., 2007) upregulate CNS C/EBP δ levels in unidentified cells. A neuroprotective role for C/EBP δ upregulation in the CNS has been proposed since both treatments are neuroprotective against subsequent brain ischemia.

In summary, C/EBP β and C/EBP δ expression is changed, mainly upregulated, in the CNS by many conditions. Upregulations induced by learning and upregulations associated to neuroinflammation are thought to be neuronal and glial, respectively, but in most cases the cell type(s) in which this expression occurs remains to be elucidated.

4.2.3. C/EBP β and C/EBP δ expression in the diseased human CNS

The analysis of C/EBP β and C/EBP δ expression in human CNS samples is particularly relevant in order to support a pathogenic role for these transcription factors in human neurological disorders. In Alzheimer's disease brain both C/EBP β (Colangelo et al., 2002) and C/EBP δ (Parachikova et al., 2007) mRNA levels have been reported to be increased by microarray studies and these increases have been confirmed at the protein level by western blot for both C/EBP β (Strohmeier et al., 2014) and C/EBP δ (Li et al., 2004). Immunohistochemistry revealed that C/EBP β and C/EBP δ immunoreactivities were mainly observed in microglia and astrocytes, respectively. In both cases, immunoreactive cells were particularly abundant surrounding senile plaques and surprisingly the immunoreactivity showed a cytosolic rather than nuclear localization (Li et al., 2004; Strohmeier et al., 2014). In amyotrophic lateral sclerosis spinal cord samples the C/EBP β gene is hypomethylated and C/EBP β mRNA levels are increased (Figueroa-Romero et al., 2012). In fitting with this, the number of C/EBP β positive cells, and also C/EBP δ positive cells, increases. Both proteins show a nuclear localization and many of the positive cells correspond to microglia (Valente et al., 2012, 2013). C/EBP β expression is also increased in astrocytes derived from post-mortem amyotrophic lateral sclerosis spinal cord neural progenitor (Haidet-Phillips et al., 2011). In multiple sclerosis blood samples C/EBP β mRNA levels were found to be decreased in two microarray studies (Arthur et al., 2008; Gandhi et al., 2010). Analysis of



published multiple sclerosis gene expression profile data in blood cells, identified C/EBP β as a central regulator of gene expression in multiple sclerosis (Liu et al., 2013a). In the cerebral cortex of **Down's syndrome** patients, C/EBP β protein levels are reduced and this is thought to be caused by the overexpression of miR-155, a chromosome 21 miRNA gene which targets C/EBP β . The down-regulation of C/EBP β in Down's syndrome, assumed to be neuronal, is believed to mediate synaptic dysfunction through dysregulation of sorting nexin 27 expression (Wang et al., 2013b). Finally, increased C/EBP β expression has been observed in HIV-1-associated neurocognitive disorders (Fields et al., 2011) and increased C/EBP δ expression in glaucoma (Yang et al., 2007) and in spinocerebellar ataxia type 3. In this last case the increase in C/EBP δ was observed in pons and dentate nucleus neurons and showed a cytosolic distribution (Evert et al., 2006).

5. Physiological roles of C/EBP β and C/EBP δ in the CNS

The studies reported in the previous section show the presence of C/EBP β and C/EBP δ in neurons, astrocytes and microglia and how different stimuli induce changes in their expression in these cell types. The pattern of expression changes suggests completely different physiological roles for these transcription factors in neurons vs glia. Evidence for physiological roles of C/EBP β and C/EBP δ in CNS cells comes mainly from studies with deficient mice or with RNAi, antisense oligonucleotides or dominant-negative forms, given the absence of drugs able to specifically inhibit C/EBP β or C/EBP δ . Before describing these studies, we will review what can be inferred about the physiological roles of C/EBP β and C/EBP δ in the normal CNS from the analysis of the phenotype of deficient mice.

5.1. Lessons from knockout mice on the role of C/EBP β and C/EBP δ in the normal CNS

Several independent lines of C/EBP β deficient mice have been generated (see Table 4) and they all show serious deficits including high perinatal mortality, female infertility and abnormal carbohydrate and lipid metabolism. Analysis of the hippocampal transcriptome of C/EBP β deficient mice has revealed changes of modest entity in the expression of numerous genes (Kfoury and Kapatos, 2009) but no major neurological deficits have been reported in these animals with the exception of an unusual

increase of the escape latency during the later trials in the water maze (Yukawa et al., 2000). This suggests that C/EBP β regulates transcription in the normal CNS and/or it plays a role in CNS development, but the CNS plasticity prevents these molecular changes to be translated into observable deficits. Interestingly, C/EBP β deficiency mainly caused upregulation of mRNA levels suggesting that C/EBP β plays a predominantly inhibitory role of transcription in the normal CNS (Kfoury and Kapatos, 2009). The basic neurological functions of C/EBP δ deficient mice are also normal. However, these animals show a selectively enhanced contextual fear response suggesting a role for C/EBP δ in the regulation of a specific type of learning and memory (Sterneck et al., 1998). These findings could be interpreted as suggesting a negligible role for C/EBP β and a very specific but minor role for C/EBP δ in the baseline CNS function of mice. However, they can also indicate redundancy among C/EBPs biological roles in the CNS. C/EBP β and C/EBP δ are known to play redundant roles in other cell types (Tsukada et al., 2011). Most double C/EBP β + δ deficient mice die perinatally (Tanaka et al., 1997) and no studies on their neurological function have been reported to our knowledge. Studies with cell-specific double C/EBP β and C/EBP δ deletion are needed to ascertain the importance of their redundancy in the different CNS cell types.

5.2. Physiological roles of neuronal C/EBP β / δ

5.2.1. Memory formation

The best characterized role for C/EBPs in neurons is its involvement in memory formation. A fundamental role for C/EBPs in memory formation was initially discovered in the marine mollusc *Aplysia californica* which has a single C/EBP isoform named ApC/EBP. Long-term potentiation in *Aplysia* was blocked by antisense, antibodies or decoy oligonucleotides targeting ApC/EBP (Alberini et al., 1994) and this was confirmed by RNA interference studies (Lee et al., 2001). The ApC/EBP promoter was found to integrate excitatory inputs, which induced CREB1 recruitment and histone acetylation, and inhibitory inputs, which recruited CREB2 and HDAC5 (Guan et al., 2002). Among mammalian C/EBPs, C/EBP β has the highest homology to ApC/EBP (Alberini et al., 1994) and C/EBP β and C/EBP δ are induced by learning in mammalian hippocampal neurons (Taubenfeld et al., 2001b). Experiments with antisense oligonucleotides demonstrated a key role in rats for hippocampal C/EBP β in the consolidation of inhibitory avoidance memory (Chen et al., 2011; Taubenfeld et al., 2001a) and for amygdala C/EBP β in memory reconsolidation (Milekic et al., 2007). IGF-2 (Chen et al., 2011) and brain derived neurotrophic factor (Bambah-Mukku et al., 2014) are neuronal targets for C/EBP β that may mediate its memory consolidation effects. Similar to C/EBP β findings, blocking of C/EBP δ by stereotaxic injection of antisense oligonucleotides in the rat hippocampus or amygdala prevents memory formation but with a different time window. Memory of inhibitory avoidance training is lost when oligonucleotides are injected in the amygdala 5–12 h after training but only at 12 h, and not before, when injected in the hippocampus. These results show the importance also of C/EBP δ in the memory formation circuit (Arguello et al., 2013).

5.2.2. Neuritogenesis and neuroregeneration

Axotomy increases *in vivo* expression of both C/EBP β (de Heredia and Magoulas, 2013; Nadeau et al., 2005) and C/EBP δ in rodents (Boeshore et al., 2004; de Heredia and Magoulas, 2013). Although this increase is generally assumed to be neuronal, localization in glial cells cannot be excluded. Experiments with RNAi or deficient mice suggest that the upregulation of C/EBP β and C/EBP δ participates in neurite outgrowth and regeneration. Thus,

Table 4
Transgenic mice involving C/EBP β or C/EBP δ genes.

C/EBP β	
C/EBP β -deficient mice	Screpanti et al. (1995)
C/EBP β -deficient mice	Tanaka et al. (1995)
C/EBP β -deficient mice	Sterneck et al. (1997)
LAP deficiency	Uematsu et al. (2007)
Full and LAP deficiency. LIP expression from its native genetic locus (LIP knock-in)	Smink et al. (2009)
Deletion of two CREB-binding sites from the Cebp promoter	Ruffell et al. (2009)
Mice deficient in the uORF initiation codon	Wethmar et al. (2010)
C/EBP β fl/fl	Sterneck et al. (2006)
C/EBP β fl/fl	Matsuda et al. (2010)
C/EBP β -A217	Buck and Chojkier (2007)
C/EBP β -E217	Buck and Chojkier (2007)
C/EBP β expression from C/EBP α locus	Chen et al. (2000)
tTA expression under C/EBP β promoter	Kistner et al. (1996)
C/EBP δ	
C/EBP δ -deficient mice	Sterneck et al. (1998)
C/EBP δ -deficient mice	Tanaka et al. (1997)
Other	
C/EBP reporter mice	Lopez de Heredia et al. (2011)



neurite outgrowth induced by forskolin or C1q in cultured rat neurons is blocked with siRNA against C/EBP β or C/EBP δ (Benoit and Tenner, 2011; MacGillavry et al., 2011) and the expression of regeneration-associated proteins induced by facial nerve injury is attenuated in C/EBP β deficient mice (Nadeau et al., 2005). Also, C/EBP β overexpression stimulates neurite outgrowth in cultured murine cortical neurons (Halterman et al., 2009). Choline kinase α , a key gene in the acceleration of membrane phospholipid metabolism associated with neuritogenesis, could partly mediate these effects since it is transcriptionally regulated by C/EBP β in neuronal differentiation in vitro (Domizi et al., 2014). Experiments with deficient mice show an important role in nerve regeneration also for C/EBP δ : neurite outgrowth of cultured dorsal root ganglion neurons and sciatic nerve regeneration after crush in vivo in mice are markedly impaired by C/EBP δ deficiency (de Heredia and Magoulas, 2013).

5.2.3. Neuroprotection/neuronal death

Various reports have analysed the involvement of C/EBP β and C/EBP δ in neuronal death but the data obtained so far are not conclusive. C/EBP β inhibition by RNAi or antisense oligonucleotides reduces neuronal death by growth factor deprivation or NMDA in cultured rat cerebellar granular neurons, suggesting that C/EBP β participates in neuronal death programs (Marshall et al., 2003). However, overexpression of Full + LAP, but not of LAP + LIP, protects HN33 neuronal cell death induced by overexpression of MAP kinase-specific phosphatase 1 (Rininger et al., 2012) and overexpression of Full or LAP, but not of LIP, protects rat cerebellar granular neurons from potassium deprivation-induced apoptosis (Pena-Altamira et al., 2014). The increased expression of hippocampal C/EBP β by complement component C5, which is neuroprotective, (Gong et al., 2013) or the demonstration that genes involved in neuroprotective responses such as Sestrin2 are C/EBP β targets (Papadia et al., 2008) provide indirect evidence for a neuroprotective role of C/EBP β . Less is known regarding the role of C/EBP δ in neuronal death. A neuroprotective role has been suggested by the findings that C/EBP δ is upregulated by treatments that are protective against subsequent brain ischemia (Bernaudin et al., 2002; Hirata et al., 2007; Tang et al., 2006b) which may be due to C/EBP δ 's role in augmenting hypoxia-inducible factor-1 expression and function (Balamurugan et al., 2010).

5.2.4. Neurogenesis

C/EBP β has been proposed to also participate in neurogenesis. C/EBP β is expressed in cortical precursors and phosphorylated C/EBP β is detected in in vitro differentiated neurons but not in vivo. In vitro and in vivo mouse data indicates that C/EBP β phosphorylation biases cortical precursors to generate neurons rather than astrocytes (Menard et al., 2002; Paquin et al., 2005). This suggests a role for C/EBP β promoting neurogenesis which is supported by the upregulation of C/EBP β in neuronal differentiation in human neural stem cells in vitro (Cheeran et al., 2005) and in murine neural progenitor cells in the subventricular zone in vivo (Liu et al., 2009). In agreement with this, C/EBP β deficient mice show reduced neurogenesis in vitro and in vivo (Cortes-Canteli et al., 2011). Therefore, with the exception of one study reporting that C/EBP β inhibition is associated with TNF α -induced neuronal differentiation of neural stem cells (Zhang et al., 2012a), most experimental data support a role for C/EBP β in promoting neurogenesis. There are in contrast no reports showing a role for C/EBP δ in neurogenesis.

5.2.5. Neuroendocrinology

C/EBP β and C/EBP δ regulate the expression of key hypothalamic-pituitary axis genes. Hypothalamic expression of

corticotropin-releasing hormone is activated by C/EBP β and C/EBP δ (Stephanou et al., 1997) and that of gonadotropin-releasing hormone is inhibited by C/EBP β (Belsam and Mellon, 2000). C/EBP β also activates the expression of important pituitary genes such as pro-opiomelanocortin (Abbud et al., 2004) whereas C/EBP δ represses prolactin expression (Tong et al., 2011). Most of these studies have analysed the role of C/EBP β or C/EBP δ on the transcription of neuroendocrine genes by reporter assays. There is no direct evidence for a role of C/EBP β or C/EBP δ in neuroendocrine function but reports showing changes in their levels in the hypothalamic-pituitary axis in vivo support such a role. Thus, in a rat model of chronic stress the hypothalamic levels of C/EBP δ and corticotropin-releasing hormone were reduced (Stephanou et al., 1997) and in an in situ hybridization study, C/EBP β mRNA levels in supraoptic nucleus and paraventricular nucleus magnocellular neurons have been found to be increased by 3 day-water deprivation in rats (Qiu et al., 2007).

5.2.6. Regulation of specific/key neuronal genes by C/EBP β and C/EBP δ

The involvement of C/EBP β or C/EBP δ in the regulation of these neuronal functions must imply regulation of expression of neuronal genes supporting these functions. Candidate genes have been identified for some – e.g. memory formation, neuroprotection or axonal growth – but not for all proposed C/EBP β -regulated neuronal functions. In contrast, C/EBP β -regulated key neuronal genes have been identified which suggest an important role for neuronal C/EBP β in neurotransmission and neuropathogenesis. Using a combination of chromatin immunoprecipitation and serial analysis of gene expression, 115C/EBP β target genes were identified in growth-arrested PC12 cells, a neuronal cell line model. The expression of many of these genes was altered in the hippocampus of C/EBP β deficient mice and they included neurotransmitter receptors, ion channels, protein kinases, synaptic vesicle proteins and transcription factors (Kfoury and Kapatos, 2009). A microarray study of gene expression induced by C/EBP β overexpression in a mouse neuroblastoma cell line has also identified inflammatory genes as potential C/EBP β targets in neurons (Cortes-Canteli et al., 2004). Genes involved in a variety of neuronal roles have been identified as C/EBP β targets. Some examples are provided below but the list cannot be exhaustive. Various genes involved in neurotransmission are C/EBP β targets including neurotransmitter synthesis enzymes such as choline acetyltransferase (Robert et al., 2002) or histidine decarboxylase (Cortes-Canteli et al., 2004), neurotransmitter precursors such as preprotachykinin-A (Kovacs et al., 2006) or the amino acid transporter SNAT2 which is used by neurons to take up Gln when in need of increased Glu synthesis (Grewal et al., 2009). C/EBP β targets also include neurotransmitter receptors such as metabotropic glutamate receptor 1 (Crepaldi et al., 2007) or the pain-related purinergic receptor P2X3 (Ugarte et al., 2012), ion channels like TRPV1 (Ugarte et al., 2013) or proteins involved in receptor and ion channel trafficking like sorting nexin 27 (Wang et al., 2013b). Genes involved in axonal outgrowth like growth associated protein 43 (Murakami et al., 2011), in neuroprotective responses like Sestrin2 (Papadia et al., 2008) and trophic factors with a proposed role in memory formation like IGF-2 (Chen et al., 2011) are also C/EBP β targets. C/EBP β also regulates the expression of neuronal transcription factors such as Fos, Egr1, Egr2 (Caella et al., 2007) or NeuroD6 (Uittenbogaard et al., 2007). Finally, genes thought to be central in prevalent neurodegenerative disorders like amyloid precursor protein (Kfoury and Kapatos, 2009; MacGillavry et al., 2011) or α -synuclein (Gomez-Santos et al., 2005; Kfoury and Kapatos, 2009) are also regulated by C/EBP β . In contrast to C/EBP β , the absence of identified C/EBP δ -regulated neuronal genes is remarkable.



5.3. Physiological roles of astroglial C/EBP β and C/EBP δ

5.3.1. Astroglial pro-inflammatory response

The best characterized role for C/EBP β and C/EBP δ in astrocytes is the regulation of pro-inflammatory gene expression, mainly induced by LPS or IL-1. NOS2 expression was the first functionally identified astroglial C/EBP β or C/EBP δ target. Various reports, mainly from the group of K Pahan, show that astroglial NOS2 expression and subsequent NO production is induced by C/EBP β or C/EBP δ overexpression and is inhibited by LIP overexpression when induced by pro-inflammatory stimuli (Auch et al., 2004; Giri et al., 2002; Jana et al., 2005; Liu et al., 2002; Pahan et al., 2002). It is important to note that most of these studies were performed on human astrocytes. In the neuroinflammatory response there are marked species-related differences in NOS2 production which is primarily astroglial in humans and microglial in rodents. As it is indicated later, NOS2 expression in rodent microglia is also under C/EBP β and C/EBP δ control. Other pro-inflammatory genes expressed by activated astrocytes that are regulated by C/EBP β are CCL2 (often referred as monocyte chemoattractant protein-1) induced by HIV-tat (Abraham et al., 2005) and complement component C3 induced by IL-1 β (Maranto et al., 2011). The involvement of C/EBP β and C/EBP δ in astroglial inflammatory expression has been analysed by profiling experiments. In one study, the effect of C/EBP β inhibition by siRNA on IL-1 β -induced (12 h) expression of 92 inflammatory genes in human primary astroglial cultures was analysed. C/EBP β inhibition changed by >25% the expression of 17 out of 29 IL-1 β -affected genes, but the C/EBP β effects were seldom significant. COX-2 was among the few genes significantly down-regulated by C/EBP β inhibition. NOS-2 levels were reduced by >25% but the effect was not significant (Fields and Ghorpade, 2012). On another study, the effect on global gene expression profile of C/EBP δ overexpression in the human astroglial cell line U373MG was analyzed. Various inflammation and neurological disease-related genes were among the 430 genes affected by C/EBP δ upregulation in astrocytes, including C-X-C chemokine receptor 4, integrin α 2, monoamine oxidase B and membrane protein palmitoylated 1 (Ko et al., 2012).

An aspect of the response of the activated astrocyte particularly dependent upon C/EBP β and C/EBP δ is the regulation of genes involved in **astroglial-microglial cross-talk**. Thus transcription of CCL2, a protein secreted by activated astrocytes which is chemotactic for monocytes/microglia, is activated by C/EBP β (Abraham et al., 2005) and transcription of pentraxin 3, a protein secreted by astrocytes that modulates macrophage/microglia phagocytosis, is activated by C/EBP δ (Ko et al., 2012). In human astrocytes, C/EBP β inhibits transcription of intercellular adhesion molecule 1, a transmembrane protein that mediates astrocyte-microglia adhesion (Fields and Ghorpade, 2012). Finally, it is interesting to note that IL-1 β , one of the main factors released by microglia that participate in the coordinate activation of astrocytes and microglia in neuroinflammation, is a potent inducer of C/EBP β in human astrocytes (Fields et al., 2011).

5.3.2. Energy metabolism

C/EBP β and C/EBP δ play also a role in the control of astroglial **energy metabolism**. Thus, overexpression of the C/EBP β isoforms LAP and LIP increases and decreases, respectively, noradrenaline-induced glycogen synthesis in rat primary astrocytes (Cardinaux and Magistretti, 1996). Also, the expression of cytochrome P450 2E1, a gene that plays a key role in gluconeogenesis, is activated by C/EBP β and C/EBP δ in rat primary astrocytes (Kelicen and Tindberg, 2004).

5.3.3. Neurotrophic support

C/EBP δ mediates β -adrenergic induced expression of the neurotrophic factor nerve growth factor (NGF) in C6, a rat glioma cell line with some astroglial features (Colangelo et al., 1998). This finding is supported by the in vivo observation that the brain expression of NGF induced by systemic infusion of a β -adrenergic agonist is prevented in C/EBP δ deficient mice. However, the astroglial nature of the cells expressing NGF in this model was not demonstrated (McCauslin et al., 2006). In vitro data with C6 cells suggests astroglial NGF expression, but neuronal expression cannot be discarded since C1q-induced expression of NGF in rat neuronal cortical cultures is blocked by C/EBP δ siRNAs (Benoit and Tenner, 2011).

5.3.4. Antiapoptotic role

In cultured human astrocytes, silencing of C/EBP β with siRNA decreases TIMP1 mRNA and protein levels. TIMP1, a physiological inhibitor of matrix metalloproteases, is a multifunctional protein that stimulates cellular proliferation and inhibits apoptosis (Fields et al., 2011). A similar role has been suggested for C/EBP δ . In a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease the number of apoptotic astrocytes was increased by C/EBP δ absence. The antiapoptotic role of C/EBP δ in astrocytes appears to be mediated by regulating the expression of the antiapoptotic transcription factor RFP112 through interaction with the promyelocytic leukemia zinc finger protein (Wang et al., 2014). These data suggest a pro-survival and antiapoptotic role of C/EBP β and C/EBP δ in astrocytes.

5.4. Physiological roles of microglial C/EBP β and C/EBP δ

5.4.1. Lessons from macrophage studies

Our knowledge on the physiological role of C/EBP β and C/EBP δ in microglia is limited. More is known about their role in macrophages and given the ontogenic and functional relationship between both cell types we think it is important to summarize the literature on the role of C/EBP β and C/EBP δ in macrophages since it may offer clues about their roles in microglia. The upregulation of C/EBP β and C/EBP δ expression by pro-inflammatory stimuli in macrophages has been well characterized (Bradley et al., 2003; Litvak et al., 2009). In activated macrophages C/EBP β promotes the expression of pro-inflammatory cytokines and NO- and PGE2-producing enzymes (Gorgoni et al., 2001; Rahman et al., 2012; Screpanti et al., 1995; Tanaka et al., 1995; Uematsu et al., 2002; Yan et al., 2012b). In the absence or inhibition of C/EBP β the upregulated pro-inflammatory gene expression by activated macrophages is often attenuated, but not completely ablated. This is characteristic of pro-inflammatory genes which have complex promoter regions and are regulated by many transcription factors. Recently, a role for C/EBP β in the regulation of anti-inflammatory/M2 genes in macrophages has been reported (Lai et al., 2013; Sheldon et al., 2013; Shoji et al., 2014; Zhu et al., 2014). It may seem contradictory that the same transcription factor regulates pro- and anti-inflammatory responses. However, the anti-inflammatory response is often induced after the pro-inflammatory one, as part of the resolution of inflammation. It is likely that C/EBP β is activated throughout the process acting in both pro- and anti-inflammatory phases by interacting with a different set of partners. It is also possible that different C/EBP β isoforms or different post-translationally modified C/EBP β forms play specific roles in the pro- vs anti-inflammatory response in macrophages, but little is known in this respect.

Regarding the involvement of C/EBP β in phagocytosis by macrophages it is interesting to note that phagocytic activity is not affected in C/EBP β -deficient macrophages (Pizarro-Cerda et al., 1999; Tanaka et al., 1995; Uematsu et al., 2007) whereas



bactericidal activity is impaired (Pizarro-Cerda et al., 1999; Screpanti et al., 1995; Tanaka et al., 1995; Uematsu et al., 2007). This impairment is not LAP-dependent, since the rate of killing bacteria is almost identical between mice lacking this isoform and their wild-type littermates (Uematsu et al., 2007). Apart from the abovementioned roles, C/EBP β is also important in macrophage survival (Buck and Chojkier, 2007), proliferation (Gutsch et al., 2011) and differentiation (Xie et al., 2004). Interestingly, the C/EBP β role in macrophage differentiation is tissue-specific being necessary for the generation of alveolar or large peritoneal macrophages but not of spleen, kidney, liver, skin, mesenteric lymph nodes or small peritoneal macrophages (Cain et al., 2013). For a review on the role of C/EBP β in monocytic cell biology, see Huber et al. (2012).

C/EBP δ is also upregulated in macrophages upon pro-inflammatory stimulation. After LPS treatment in macrophages, rapid NF- κ B binding to C/EBP δ promoter induces C/EBP δ transcription which is later sustained by C/EBP δ stimulation of its own transcription (Litvak et al., 2009). Based on this and other studies, C/EBP δ has been categorized as a LPS-induced secondary response gene in macrophages whereas C/EBP β would belong to a third wave of transcription factor activation (Medzhitov and Horg, 2009). The best described role for C/EBP δ activation in macrophages is the promotion of pro-inflammatory gene transcription (Balamurugan et al., 2013; Litvak et al., 2009; Yan et al., 2013), although a recent study suggests an effect of C/EBP δ on macrophage migration/mobilization rather than on pro-inflammatory expression (Duitman et al., 2012). Regulation of anti-inflammatory gene expression has not been well established. However, C/EBP δ regulation of IL-10 has been implicated in PGE2-mediated suppression of phagocytosis of tumor cells by macrophages (Hsiao et al., 2013).

5.4.2. Pro-inflammatory role for C/EBP β and C/EBP δ in microglia

As in macrophages, the role of C/EBP β in microglial function has been better studied than that of C/EBP δ . In the microglial cell line BV2, overexpression of the dominant negative form of C/EBP β LIP inhibits CD40-induced NOS2 expression (Jana et al., 2001), IFN γ -induced TNF α expression (Jana et al., 2002) and T cell-induced cytokine expression (Dasgupta et al., 2003). In primary mixed glial cultures from C/EBP β deficient mice, a reduction was observed in LPS-induced IL1- β expression (Cortes-Canteli et al., 2008) and in LPS- or LPS + IFN γ -induced NO production and NOS2, IL-1 β and IL-6 expression (Straccia et al., 2011) and these effects were predominantly microglial. In primary microglial cultures from C/EBP β deficient mice, PGE2 production and prostaglandin E synthase and COX2 expression induced by LPS or LPS + IFN γ were also markedly reduced (Straccia et al., 2013). Finally, studies with C/EBP β deficient glial cultures and LAP overexpression in BV2 cells have shown that C/EBP β represses transcription of CD200R1, a glycoprotein receptor that keeps microglia in an inhibited state through binding to the neuronal ligand CD200 (Dentesano et al., 2012). Altogether, these data point to C/EBP β as an important regulator of the pro-inflammatory program induced by TLR agonists in microglia. Interestingly, C/EBP β absence in microglia completely suppresses its neurotoxic effects in a neuronal-microglial co-culture model of neurotoxicity elicited by LPS + IFN γ -activated microglia (Straccia et al., 2011) suggesting that, because of its central position as a regulator of the pro-inflammatory program, C/EBP β inhibition in microglia could have therapeutic potential.

C/EBP δ plays also a regulatory role of the pro-inflammatory response in microglia. In the only study reported to date with primary glial cultures from C/EBP δ deficient mice, the absence of C/EBP δ resulted in an attenuated expression of NOS2, COX2 and IL-6 (Valente et al., 2013). This study was conducted in mixed glial

cultures and the effects observed were primarily microglial. In the abovementioned neuronal-microglial co-culture model of neurotoxicity elicited by activated microglia, a complete neuroprotective effect was observed when microglia was deficient for C/EBP δ (Valente et al., 2013) or when it was treated with the flavonoid chrysin, which reduced C/EBP δ levels without affecting C/EBP β or NF- κ B levels (Gresa-Arribas et al., 2010). As mentioned for C/EBP β , these data point to C/EBP δ as a central regulator of pro-inflammatory gene expression by activated microglia and as a potential drug target to modulate neuroinflammation.

5.5. Neuroprotective potential of glial C/EBP β and C/EBP δ inhibition: more lessons from knockout mice

Studies with knockout mice have shown anti-inflammatory and neuroprotective effects associated to complete C/EBP β or C/EBP δ deficiency in vivo. C/EBP β deficient mice showed smaller infarcts, reduced neurological deficits, decreased TUNEL positive cells and attenuated neuroinflammatory response after focal ischemia (Kapadia et al., 2006) and reduced neuronal loss and glial activation after hippocampal injection of kainic acid (Cortes-Canteli et al., 2008) whereas C/EBP δ deficiency results in attenuated pro-inflammatory gene expression after systemic LPS infusion (Valente et al., 2013), in attenuated expression of astroglial and microglial activation markers in an Alzheimer's disease transgenic mouse model (Ko et al., 2014) and in less severe clinical disease in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis (Tsai et al., 2011). Key to understand how C/EBP β or C/EBP δ absence results in neuroprotective effects is the question of which cell types mediate the neurotoxic effects of C/EBPs in these models. In the focal ischemia study the cell types expressing C/EBP β after the insult were not studied (Kapadia et al., 2006). After intrahippocampal kainic acid C/EBP β was expressed both in neurons and glial cells (Cortes-Canteli et al., 2008) and in experimental autoimmune encephalomyelitis C/EBP δ expression was induced in dendritic cells and to a lesser extent in astrocytes (Tsai et al., 2011). Since these mice had complete deficiency for C/EBP β or C/EBP δ it is not possible to conclude whether the neuroprotective effects observed were caused by their absence in a particular cell type. Data reported in this review suggest that neuronal C/EBP β or C/EBP δ absence would be detrimental by causing memory deficits or impaired axonal regeneration. On the other hand, attenuation of neuroinflammation in glial cultures and neuroprotection in *in vitro* models of microglia-induced neurotoxicity elicited by C/EBP β or C/EBP δ absence suggest that the neuroprotective effects observed *in vivo* could be mainly mediated by the absence of these factors in microglia, astrocytes and/or other non-neuronal cells related to the neuroinflammatory response such as dendritic cells. Studies with cell-specific deficient mice will be decisive to determine the respective involvement of the various CNS cell types in the pro-inflammatory and neurotoxic effects mediated by C/EBP β and C/EBP δ .

6. Concluding remarks

The basic biology of C/EBP β and C/EBP δ offers fascinating aspects including the study of the usage regulation of the alternative initiation codons in C/EBP β mRNA, the regulation and functional effects of their multiple post-translational modifications, the functional effects of their multiple dimerization partners, their ability to regulate transcription without direct DNA binding or their possible moonlighting effects. Both proteins seem to play a coordinated and probably partially redundant role in many cell types. In the CNS they play a completely different role in neurons vs glial cells. In neurons, C/EBP β and C/EBP δ play an



important role in memory formation and neurite outgrowth. In contrast, in glial cells they play a well established role in the regulation of pro-inflammatory gene expression, particularly in microglia where the role of *C/EBPβ* and *C/EBPδ* is probably as important, if not more, as that of key transcription factors such as NF-κB or STATs. In consequence, *C/EBPβ* and *C/EBPδ* are candidate therapeutic targets for neurological disorders in which neuroinflammation plays a pathogenic role. With the present knowledge *C/EBPβ* and *C/EBPδ* in microglia are promising targets and *C/EBPs* in astrocytes and other CNS myeloid cells offer also interesting potential. In contrast, inhibition in neuronal cells seems undesirable. Microglial-specific drugs or microglial-specific delivery mechanisms will be necessary to obtain cell-specific *C/EBPβ* and *C/EBPδ* inhibition. Despite recent improvements, such strategies are not yet ready for use in humans. The strong evidence for the central role of *C/EBPβ* and *C/EBPδ* in microglial pro-inflammatory response supports the need for further research in this field.

Acknowledgments

We thank our colleagues Carme Sola, Tony Valente and Joan Serratosa, and our previous PhD students Aroa Ejarque-Ortiz, Nuria Gresa-Arribas and Marco Straccia, whose work and discussions have greatly contributed to build this review. We thank also Eva Serrano for help on phylogenetic analysis and to Grayson Richards for English revision. We apologize to researchers whose work could not be cited in this review because of space limitations. MPS is a recipient of a FPU grant AP2010-5428 from the Spanish Ministerio de Educacion, Cultura y Deporte. The experiments from our group cited in this review were funded by grants 04/778, 07/455, 10/378, 12/709 and 14/302 from the Instituto de Salud Carlos III, cofinanced from FEDER funds, and V-2006-TV063031 and 110530 from Fundació La Marató de TV3. The authors report no conflict of interests.

References

Abbud, R.A., Kelleher, R., Melmed, S., 2004. Cell-specific pituitary gene expression profiles after treatment with leukemia inhibitory factor reveal novel modulators for proopiomelanocortin expression. *Endocrinology* 145, 867–880.

Abdoul, H.S., Atlas, E., Hache, R.J., 2011. Liver-enriched inhibitory protein (LIP) actively inhibits preadipocyte differentiation through histone deacetylase 1 (HDAC1). *J. Biol. Chem.* 286, 21488–21499.

Abraham, S., Sweet, T., Sawaya, B.E., Rappaport, J., Khalili, K., Amini, S., 2005. Cooperative interaction of *C/EBP beta* and *Tat* modulates *MCP-1* gene transcription in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 160, 219–227.

Agrawal, A., Cha-Molstad, H., Samols, D., Kushner, I., 2001. Transactivation of C-reactive protein by IL-6 requires synergistic interaction of CCAAT/enhancer binding protein beta (*C/EBP beta*) and *Rel p50*. *J. Immunol.* 166, 2378–2384.

Agrawal, S., Hofmann, W.K., Tidow, N., Ehrlich, M., van den Boom, D., Koschmieder, S., Berdel, W.E., Serve, H., Muller-Tidow, C., 2007. The *C/EBPdelta* tumor suppressor is silenced by hypermethylation in acute myeloid leukemia. *Blood* 109, 3895–3905.

Akagi, T., Luong, Q.T., Gui, D., Said, J., Selektor, J., Yung, A., Bunce, C.M., Braunstein, G.D., Koeffler, H.P., 2008. Induction of sodium iodide symporter gene and molecular characterization of HNF3 beta/FoxA2, TTF-1 and *C/EBP beta* in thyroid carcinoma cells. *Br. J. Cancer* 99, 781–788.

Akagi, T., Thoenissen, N.H., George, A., Crooks, G., Song, J.H., Okamoto, R., Nowak, D., Gombart, A.F., Koeffler, H.P., 2010. In vivo deficiency of both *C/EBPbeta* and *C/EBPepsilon* results in highly defective myeloid differentiation and lack of cytokine response. *PLoS ONE* 5, e15419.

Akar, C.A., Feinstein, D.L., 2009. Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by sumoylation. *J. Neuroinflamm.* 6, 12.

Alam, T., An, M.R., Papaconstantinou, J., 1992. Differential expression of three *C/EBP* isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J. Biol. Chem.* 267, 5021–5024.

Alberini, C.M., Ghirardi, M., Metz, R., Kandel, E.R., 1994. *C/EBP* is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* 76, 1099–1114.

Alii, S., Singh, N.N., Yildirim, H., Ramji, D.P., 2010. Requirement for nuclear factor kappa B signalling in the interleukin-1-induced expression of the CCAAT/enhancer binding protein-delta gene in hepatocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 113–119.

Alvarez, M., Perez-Castillo, A., Santos, A., 2005. Thyroid hormone regulates Galphai gene expression in the rat cerebellar cortex during post-natal development. *J. Neurochem.* 92, 395–404.

An, M.R., Hsieh, C.C., Reisner, P.D., Rabek, J.P., Scott, S.G., Kuninger, D.T., Papaconstantinou, J., 1996. Evidence for posttranscriptional regulation of *C/EBPalpha* and *C/EBPbeta* isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response. *Mol. Cell Biol.* 16, 2295–2306.

Arguello, A.A., Ye, X., Bozdagi, O., Pollonini, G., Tronel, S., Bambah-Mukku, D., Huntley, G.W., Platano, D., Alberini, C.M., 2013. CCAAT enhancer binding protein delta plays an essential role in memory consolidation and reconsolidation. *J. Neurosci.* 33, 3646–3658.

Armstrong, D.A., Leseur, C., Conrad, E., Lester, B.M., Marsit, C.J., 2014. Global and gene-specific DNA methylation across multiple tissues in early infancy: implications for children's health research. *FASEB J.* 28, 2088–2097.

Arthur, A.T., Armatt, P.J., Bye, C., Southern, M.S.G.C., Heard, R.N., Stewart, G.J., Pollard, J.D., Booth, D.R., 2008. Genes implicated in multiple sclerosis pathogenesis from consilience of genotyping and expression profiles in relapse and remission. *BMC Med. Genet.* 9, 17.

Atlios, J., Impey, S., Pineda, V.V., Chen, X., Storm, D.R., 2002. Hippocampal CRE-mediated gene expression is required for contextual memory formation. *Nat. Neurosci.* 5, 1119–1120.

Atwood, A.A., Jerrell, R., Sealy, L., 2011. Negative regulation of *C/EBPbeta1* by sumoylation in breast cancer cells. *PLoS ONE* 6, e25205.

Atwood, A.A., Sealy, L., 2010. Regulation of *C/EBPbeta1* by Ras in mammary epithelial cells and the role of *C/EBPbeta1* in oncogene-induced senescence. *Oncogene* 29, 6004–6015.

Auch, C.J., Saha, R.N., Sheikh, F.G., Liu, X., Jacobs, B.L., Pahan, K., 2004. Role of protein kinase R in double-stranded RNA-induced expression of nitric oxide synthase in human astroglia. *FEBS Lett.* 563, 223–228.

Bae, E.J., Kim, S.G., 2005. Enhanced CCAAT/enhancer-binding protein beta-liver-enriched inhibitory protein production by Oltipraz, which accompanies CUG repeat-binding protein-1 (CUGBP1) RNA-binding protein activation, leads to inhibition of preadipocyte differentiation. *Mol. Pharmacol.* 68, 660–669.

Baer, M., Johnson, P.F., 2000. Generation of truncated *C/EBPbeta* isoforms by in vitro proteolysis. *J. Biol. Chem.* 275, 26582–26590.

Baer, M., Williams, S.C., Dillner, A., Schwartz, R.C., Johnson, P.F., 1998. Autocrine signals control CCAAT/enhancer binding protein beta expression, localization, and activity in macrophages. *Blood* 92, 4353–4365.

Balamurugan, K., Sharan, S., Klarmann, K.D., Zhang, Y., Coppola, V., Summers, G.H., Roger, T., Morrison, D.K., Keller, J.R., Sterneck, E., 2013. *FBXW7alpha* attenuates inflammatory signalling by downregulating *C/EBPdelta* and its target gene *Tlr4*. *Nat. Commun.* 4, 1662.

Balamurugan, K., Sterneck, E., 2013. The many faces of *C/EBPdelta* and their relevance for inflammation and cancer. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 917–933.

Balamurugan, K., Wang, J.M., Tsai, H.H., Sharan, S., Anver, M., Leighty, R., Sterneck, E., 2010. The tumour suppressor *C/EBPdelta* inhibits *FBXW7* expression and promotes mammary tumour metastasis. *EMBO J.* 29, 4106–4117.

Bambah-Mukku, D., Travaglia, A., Chen, D.Y., Pollonini, G., Alberini, C.M., 2014. A positive autoregulatory BDNF feedback loop via *C/EBPbeta* mediates hippocampal memory consolidation. *J. Neurosci.* 34, 12547–12559.

Banerjee, S., Xie, N., Cui, H., Tan, Z., Yang, S., Icyuz, M., Abraham, E., Liu, G., 2013. MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization. *J. Immunol.* 190, 6542–6549.

Basu, S.K., Malik, R., Huggins, C.J., Lee, S., Sebastian, T., Sakchaisri, K., Quinones, O.A., Alvord, W.G., Johnson, P.F., 2011. 3'UTR elements inhibit Ras-induced *C/EBPbeta* post-translational activation and senescence in tumour cells. *EMBO J.* 30, 3714–3728.

Begay, V., Smink, J.J., Loddenkemper, C., Zimmermann, K., Rudolph, C., Scheller, M., Steinemann, D., Leser, U., Schlegelberger, B., Stein, H., et al., 2015. Deregulation of the endogenous *C/EBPbeta* LIP isoform predisposes to tumorigenesis. *J. Mol. Med. (Berl)* 93, 39–49.

Belsham, D.D., Mellon, P.L., 2000. Transcription factors Oct-1 and *C/EBPbeta* (CCAAT/enhancer-binding protein-beta) are involved in the glutamate/nitric oxide/cyclic-guanosine 5'-monophosphate-mediated repression of mediated repression of gonadotropin-releasing hormone gene expression. *Mol. Endocrinol.* 14, 212–228.

Bennett, C.E., Nsengimana, J., Bostock, J.A., Cymbalista, C., Futers, T.S., Knight, B.L., McCormack, L.J., Prasad, U.K., Riches, K., Rolton, D., et al., 2010. CCAAT/enhancer binding protein alpha, beta and delta gene variants: associations with obesity related phenotypes in the Leeds Family Study. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 7, 195–203.

Benoit, M.E., Tenner, A.J., 2011. Complement protein C1q-mediated neuroprotection is correlated with regulation of neuronal gene and microRNA expression. *J. Neurosci.* 31, 3459–3469.

Berberich-Siebert, F., Berberich, I., Andrusis, M., Santner-Nanan, B., Jha, M.K., Kleinhessling, S., Schimpl, A., Serfling, E., 2006. SUMOylation interferes with CCAAT/enhancer-binding protein beta-mediated c-myc repression, but not IL-4 activation in T cells. *J. Immunol.* 176, 4843–4851.

Bergalet, J., Fawal, M., Lopez, C., Desjober, C., Lamant, L., Delsol, G., Morello, D., Espinos, E., 2011. HUR-mediated control of *C/EBPbeta* mRNA stability and translation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas. *Mol. Cancer Res.* 9, 485–496.

Bernaudo, M., Tang, Y., Reilly, M., Petit, E., Sharp, F.R., 2002. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J. Biol. Chem.* 277, 39728–39738.



- Berrier, A., Siu, G., Calame, K., 1998. Transcription of a minimal promoter from the NF-IL6 gene is regulated by CREB/ATF and SP1 proteins in U937 promonocytic cells. *J. Immunol.* 161, 2267–2275.
- Billiard, J., Grewal, S.S., Lukaesko, L., Stork, P.J., Rotwein, P., 2001a. Hormonal control of insulin-like growth factor I gene transcription in human osteoblasts: dual actions of cAMP-dependent protein kinase on CCAAT/enhancer-binding protein delta. *J. Biol. Chem.* 276, 31238–31246.
- Billiard, J., Umayahara, Y., Wiren, K., Centrella, M., McCarthy, T.L., Rotwein, P., 2001b. Regulated nuclear-cytoplasmic localization of CCAAT/enhancer-binding protein delta in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 15354–15361.
- Birsoy, K., Chen, Z., Friedman, J., 2008. Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab.* 7, 339–347.
- Boeshore, K.L., Schreiber, R.C., Vaccariello, S.A., Sachs, H.H., Salazar, R., Lee, J., Ratan, R.R., Leahy, P., Zigmond, R.E., 2004. Novel changes in gene expression following axotomy of a sympathetic ganglion: a microarray analysis. *J. Neurobiol.* 59, 216–235.
- Borrelli, S., Testoni, B., Callari, M., Alotto, D., Castagnoli, C., Romano, R.A., Sinha, S., Vignano, A.M., Mantovani, R., 2007. Reciprocal regulation of p63 by C/EBP delta in human keratinocytes. *BMC Mol. Biol.* 8, 85.
- Bradley, M.N., Zhou, L., Smale, S.T., 2003. C/EBPbeta regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol. Cell Biol.* 23, 4841–4858.
- Buck, M., Chojkier, M., 2007. C/EBPbeta phosphorylation rescues macrophage dysfunction and apoptosis induced by anthrax lethal toxin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C1788–C1796.
- Buck, M., Poli, V., Hunter, T., Chojkier, M., 2001a. C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Mol. Cell* 8, 807–816.
- Buck, M., Poli, V., van der Geer, P., Chojkier, M., Hunter, T., 1999. Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Mol. Cell* 4, 1087–1092.
- Buck, M., Zhang, L., Halasz, N.A., Hunter, T., Chojkier, M., 2001b. Nuclear export of phosphorylated C/EBPbeta mediates the inhibition of albumin expression by TNF-alpha. *EMBO J.* 20, 6712–6723.
- Cain, D.W., O'Koren, E.G., Kan, M.J., Womble, M., Sempowski, G.D., Hopper, K., Gunn, M.D., Kelsoe, G., 2013. Identification of a tissue-specific, C/EBPbeta-dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 191, 4665–4675.
- Calella, A.M., Nerlov, C., Lopez, R.G., Sciarretta, C., von Bohlen und Halbach, O., Bereshchenko, O., Minichiello, L., 2007. Neurotrophin/Trk receptor signaling mediates C/EBPalpha, -beta and NeuroD recruitment to immediate-early gene promoters in neuronal cells and requires C/EBPs to induce immediate-early gene transcription. *Neural Dev.* 2, 4.
- Calkhoven, C.F., Muller, C., Leutz, A., 2000. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev.* 14, 1920–1932.
- Cantwell, C.A., Sterneck, E., Johnson, P.F., 1998. Interleukin-6-specific activation of the C/EBPdelta gene in hepatocytes is mediated by Stat3 and Sp1. *Mol. Cell Biol.* 18, 2108–2117.
- Cardinaux, J.R., Allaman, I., Magistretti, P.J., 2000. Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. *Glia* 29, 91–97.
- Cardinaux, J.R., Magistretti, P.J., 1996. Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-beta and C/EBP delta in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism. *J. Neurosci.* 16, 919–929.
- Ceccarelli, V., Raccanichis, S., Martelli, M.P., Nocentini, G., Fettucciari, K., Riccardi, C., Marconi, P., Di Nardo, P., Grignani, F., Binaglia, L., et al., 2011. Eicosapentaenoic acid demethylates a single CpG that mediates expression of tumor suppressor CCAAT/enhancer-binding protein delta in U937 leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 286, 27092–27102.
- Cesena, T.J., Cardinaux, J.R., Kwok, R., Schwartz, J., 2007. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *J. Biol. Chem.* 282, 956–967.
- Cesena, T.J., Cui, T.X., Subramanian, L., Fulton, C.T., Iniguez-Lluhi, J.A., Kwok, R.P., Schwartz, J., 2008. Acetylation and deacetylation regulate CCAAT/enhancer binding protein beta at K39 in mediating gene transcription. *Mol. Cell Endocrinol.* 289, 94–101.
- Chamberlain, W., Gonnella, P., Alamdari, N., Aversa, Z., Hasselgren, P.O., 2012. Multiple muscle wasting-related transcription factors are acetylated in dexamethasone-treated muscle cells. *Biochem. Cell Biol.* 90, 200–208.
- Chang, C.J., Shen, B.J., Lee, S.C., 1995. Autoregulated induction of the acute-phase response transcription factor gene, *cjg/ebp*. *DNA Cell Biol.* 14, 529–537.
- Chang, L.C., Tsao, L.T., Chang, C.S., Chen, C.J., Huang, L.J., Kuo, S.C., Lin, R.H., Wang, J.P., 2008. Inhibition of nitric oxide production by the carbazole compound LCY-2-CHO via blockade of activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein activation in microglia. *Biochem. Pharmacol.* 76, 507–519.
- Chang, W., Rewari, A., Centrella, M., McCarthy, T.L., 2004. Fos-related antigen 2 controls protein kinase A-induced CCAAT/enhancer-binding protein beta expression in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 279, 42438–42444.
- Cheeran, M.C., Hu, S., Ni, H.T., Sheng, W., Palmquist, J.M., Peterson, P.K., Lokensgard, J.R., 2005. Neural precursor cell susceptibility to human cytomegalovirus diverges along glial or neuronal differentiation pathways. *J. Neurosci. Res.* 82, 839–850.
- Chen, C., Dudenhausen, E., Chen, H., Pan, Y.X., Gjymishka, A., Kilberg, M.S., 2005a. Amino-acid limitation induces transcription from the human C/EBPbeta gene via an enhancer activity located downstream of the protein coding sequence. *Biochem. J.* 391, 649–658.
- Chen, C., Dudenhausen, E.E., Pan, Y.X., Zhong, C., Kilberg, M.S., 2004a. Human CCAAT/enhancer-binding protein beta gene expression is activated by endoplasmic reticulum stress through an unfolded protein response element downstream of the protein coding sequence. *J. Biol. Chem.* 279, 27948–27956.
- Chen, D.Y., Stern, S.A., Garcia-Osta, A., Saunier-Rebori, B., Pollonini, G., Bambah-Mukku, D., Blitzer, R.D., Alberini, C.M., 2011. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* 469, 491–497.
- Chen, H.M., Liao, W.S., 1993. Differential acute-phase response of rat kininogen genes involves type I and type II interleukin-6 response elements. *J. Biol. Chem.* 268, 25311–25319.
- Chen, J., Newton, S.S., Zeng, L., Adams, D.H., Dow, A.L., Madsen, T.M., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2004b. Downregulation of the CCAAT-enhancer binding protein beta in deltaFosB transgenic mice and by electroconvulsive seizures. *Neuropsychopharmacology* 29, 23–31.
- Chen, J.C., Alvarez, M.J., Talos, F., Dhruv, H., Rieckhof, G.E., Iyer, A., Diefes, K.L., Aldape, K., Berens, M., Shen, M.M., et al., 2014. Identification of causal genetic drivers of human disease through systems-level analysis of regulatory networks. *Cell* 159, 402–414.
- Chen, S.S., Chen, J.F., Johnson, P.F., Muppala, V., Lee, Y.H., 2000. C/EBPbeta, when expressed from the C/ebpalpha gene locus, can functionally replace C/EBPalpha in liver but not in adipose tissue. *Mol. Cell Biol.* 20, 7292–7299.
- Chen, Z., Torrens, J.L., Anand, A., Spiegelman, B.M., Friedman, J.M., 2005b. Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab.* 1, 93–106.
- Cherry, J., Jones, H., Karschner, V.A., Pekala, P.H., 2008. Post-transcriptional control of CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) expression: formation of a nuclear HuR-C/EBPbeta mRNA complex determines the amount of message reaching the cytosol. *J. Biol. Chem.* 283, 30812–30820.
- Chiang, B.T., Liu, Y.W., Chen, B.K., Wang, J.M., Chang, W.C., 2006. Direct interaction of C/EBPdelta and Sp1 at the GC-enriched promoter region synergizes the IL-10 gene transcription in mouse macrophage. *J. Biomed. Sci.* 13, 621–635.
- Chinery, R., Brockman, J.A., Dransfield, D.T., Coffey, R.J., 1997. Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299. *J. Biol. Chem.* 272, 30356–30361.
- Choi, B.K., Kim, J.H., Jung, J.S., Lee, Y.S., Han, M.E., Baek, S.Y., Kim, B.S., Kim, J.B., Oh, S.O., 2009. Reduction of ischemia-induced cerebral injury by all-trans-retinoic acid. *Exp. Brain Res.* 193, 581–589.
- Choy, L., Derynck, R., 2003. Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP reactivation function. *J. Biol. Chem.* 278, 9609–9619.
- Christakos, S., Dhawan, P., Peng, X., Obukhov, A.G., Nowicky, M.C., Benn, B.S., Zhong, Y., Liu, Y., Shen, Q., 2007. New insights into the function and regulation of vitamin D target proteins. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103, 405–410.
- Chung, S.S., Ahn, B.Y., Kim, M., Choi, H.H., Park, H.S., Kang, S., Park, S.G., Kim, Y.B., Cho, Y.M., Lee, H.K., et al., 2010. Control of adipogenesis by the SUMO-specific protease SENP2. *Mol. Cell Biol.* 30, 2135–2146.
- Cleutjens, C.B., van Eekelen, C.C., van Dekken, H., Smit, E.M., Hagemeijer, A., Wagner, M.J., Wells, D.E., Trapman, J., 1993. The human C/EBP delta (CRP3/CEL3) gene: structure and chromosomal localization. *Genomics* 16, 520–523.
- Cloutier, A., Guindi, C., Larivee, P., Dubois, C.M., Amrani, A., McDonald, P.P., 2009. Inflammatory cytokine production by human neutrophils involves C/EBP transcription factors. *J. Immunol.* 182, 563–571.
- Colangelo, A.M., Johnson, P.F., Mocchetti, I., 1998. beta-adrenergic receptor-induced activation of nerve growth factor transcription in rat cerebral cortex involves CCAAT/enhancer-binding protein delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10920–10925.
- Colangelo, V., Schurr, J., Ball, M.J., Pelaez, R.P., Bazan, N.G., Lukiw, W.J., 2002. Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J. Neurosci. Res.* 70, 462–473.
- Cortes-Canteli, M., Aguilar-Morante, D., Sanz-Sancristobal, M., Megias, D., Santos, A., Perez-Castillo, A., 2011. Role of C/EBPbeta transcription factor in adult hippocampal neurogenesis. *PLoS ONE* 6, e24842.
- Cortes-Canteli, M., Luna-Medina, R., Sanz-Sancristobal, M., Alvarez-Barrientos, A., Santos, A., Perez-Castillo, A., 2008. CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J. Cell Sci.* 121, 1224–1234.
- Cortes-Canteli, M., Wagner, M., Anson, W., Perez-Castillo, A., 2004. Microarray analysis supports a role for ccaat/enhancer-binding protein-beta in brain injury. *J. Biol. Chem.* 279, 14409–14417.
- Cox, G.M., Kithcart, A.P., Pitt, D., Guan, Z., Alexander, J., Williams, J.L., Shawler, T., Dagia, N.M., Popovich, P.G., Satoskar, A.R., et al., 2013. Macrophage migration inhibitory factor potentiates autoimmune-mediated neuroinflammation. *J. Immunol.* 191, 1043–1054.
- Crepaldi, L., Lackner, C., Corti, C., Ferraguti, F., 2007. Transcriptional activators and repressors for the neuron-specific expression of a metabotropic glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 17877–17889.
- Cui, T.X., Piwien-Pilipuk, G., Huo, J.S., Kaplani, J., Kwok, R., Schwartz, J., 2005. Endogenous CCAAT/enhancer binding protein beta and p300 are both regulated by growth hormone to mediate transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.* 19, 2175–2186.



- Damm, J., Luheshi, G.N., Gerstberger, R., Roth, J., Rummel, C., 2011. Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction. *J. Comp. Neurol.* 519, 480–505.
- Damm, J., Wiegand, F., Harden, L.M., Wenisch, S., Gerstberger, R., Rummel, C., Roth, J., 2014. Intraperitoneal and subcutaneous injections of the TLR9 agonist ODN 1668 in rats: Brain inflammatory responses are related to peripheral IL-6 rather than interferons. *J. Neuroimmunol.* 277, 105–117.
- Dannenberg, L.O., Edenberg, H.J., 2006. Epigenetics of gene expression in human hepatoma cells: expression profiling the response to inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *BMC Genomics* 7, 181.
- Darbinian-Sarkissian, N., Darbinyan, A., Otte, J., Radhakrishnan, S., Sawaya, B.E., Arzumanyan, A., Chiptitsyna, G., Popov, Y., Rappaport, J., Amini, S., et al., 2006. p27(SJ), a novel protein in St John's Wort, that suppresses expression of HIV-1 genome. *Gene Ther.* 13, 288–295.
- Dasgupta, S., Jana, M., Liu, X., Pahan, K., 2003. Role of very-late antigen-4 (VLA-4) in myelin basic protein-primed T cell contact-induced expression of proinflammatory cytokines in microglial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 22424–22431.
- de Heredia, L.L., Magoulas, C., 2013. Lack of the transcription factor C/EBPdelta impairs the intrinsic capacity of peripheral neurons for regeneration. *Exp. Neurol.* 239, 148–157.
- Dearth, L.R., DeWille, J., 2003. Posttranscriptional and posttranslational regulation of C/EBP delta in G0 growth-arrested mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 11246–11255.
- Dearth, L.R., Hutt, J., Sattler, A., Gigliotti, A., DeWille, J., 2001. Expression and function of CCAAT/enhancer binding proteinbeta (C/EBPbeta) LAP and LIP isoforms in mouse mammary gland, tumors and cultured mammary epithelial cells. *J. Cell Biochem.* 82, 357–370.
- Dentesano, G., Straccia, M., Ejarque-Ortiz, A., Tusell, J.M., Serratos, J., Saura, J., Sola, C., 2012. Inhibition of CD200R1 expression by C/EBP beta may constitute an effort to revascularize and oxygenate the tissue in reactive microglial cells. *J. Neuroinflamm.* 9, 165.
- Descombes, P., Schibler, U., 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67, 569–579.
- Di-Poi, N., Desvergne, B., Michalik, L., Wahli, W., 2005. Transcriptional repression of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta in murine keratinocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 38700–38710.
- Diehl, J.A., Hannink, M., 1994. Identification of a C/EBP-Rel complex in avian lymphoid cells. *Mol. Cell Biol.* 14, 6635–6646.
- Do-Umehara, H.C., Chen, C., Ulrich, D., Zhou, L., Qiu, J., Jang, S., Zander, A., Baker, M.A., Eilers, M., Sporn, P.H., et al., 2013. Suppression of inflammation and acute lung injury by Miz1 via repression of C/EBP-delta. *Nat. Immunol.* 14, 461–469.
- Dolfini, D., Gatta, R., Mantovani, R., 2012. NF- κ B and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 29–49.
- Dolfini, D., Zambelli, F., Pavesi, G., Mantovani, R., 2009. A perspective of promoter architecture from the CCAAT box. *Clin. Cell Cycle* 8, 4127–4137.
- Domizi, P., Aoyama, C., Banchio, C., 2014. Choline kinase alpha expression during RA-induced neuronal differentiation: role of C/EBPbeta. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 544–551.
- Doohar, J.E., Paz-Priel, I., Houg, S., Baldwin Jr., A.S., Friedman, A.D., 2011. C/EBPalpha, C/EBPbeta oncoproteins, or C/EBPbeta preferentially bind NF-kappaB p50 compared with p65, focusing therapeutic targeting on the C/EBP:p50 interaction. *Mol. Cancer Res.* 9, 1395–1405.
- Dudaronok, J.M., Barber, S.A., Clements, J.E., 2007. CUGBP1 is required for IFNbeta-mediated induction of dominant-negative C/EBPbeta and suppression of SIV replication in macrophages. *J. Immunol.* 179, 7262–7269.
- Duitman, J., Hoogendijk, A.J., Groot, A.P., Ruela de Sousa, R.R., van der Poll, T., Florquin, S., Spek, C.A., 2012. CCAAT-enhancer binding protein delta (C/EBP-delta) protects against Klebsiella pneumoniae-induced pulmonary infection: potential role for macrophage migration. *J. Infect. Dis.* 206, 1826–1835.
- Duprez, E., Wagner, K., Koch, H., Tenen, D.G., 2003. C/EBPbeta: a major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells. *EMBO J.* 22, 5806–5816.
- Eaton, E.M., Sealy, L., 2003. Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-beta by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3. *J. Biol. Chem.* 278, 33416–33421.
- Ejarque-Ortiz, A., Gresa-Arribas, N., Straccia, M., Mancera, P., Sola, C., Tusell, J.M., Serratos, J., Saura, J., 2010. CCAAT/enhancer binding protein delta in microglial activation. *J. Neurosci. Res.* 88, 1113–1123.
- Ejarque-Ortiz, A., Medina, M.G., Tusell, J.M., Perez-Gonzalez, A.P., Serratos, J., Saura, J., 2007a. Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. *Glia* 55, 178–188.
- Ejarque-Ortiz, A., Tusell, J.M., Serratos, J., Saura, J., 2007b. CCAAT/enhancer binding protein-alpha is down-regulated by toll-like receptor agonists in microglial cells. *J. Neurosci. Res.* 85, 985–993.
- Elberg, G., Gimble, J.M., Tsai, S.Y., 2000. Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 27815–27822.
- Evert, B.O., Schelhaas, J., Fleischer, H., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Stenzel, W., Klockgether, T., Wullner, U., 2006. Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin. Neuropathol.* 25, 272–281.
- Faggioli, L., Costanzo, C., Donadelli, M., Palmieri, M., 2004. Activation of the Interleukin-6 promoter by a dominant negative mutant of c-Jun. *Biochim. Biophys. Acta* 1692, 17–24.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Fields, J., Cisneros, I.E., Borgmann, K., Ghorpade, A., 2013. Extracellular regulated kinase 1/2 signaling is a critical regulator of interleukin-1beta-mediated astrocyte tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression. *PLoS ONE* 8, e56891.
- Fields, J., Gardner-Mercer, J., Borgmann, K., Clark, I., Ghorpade, A., 2011. CCAAT/enhancer binding protein beta expression is increased in the brain during HIV-1-infection and contributes to regulation of astrocyte tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J. Neurochem.* 118, 93–104.
- Fields, J., Ghorpade, A., 2012. C/EBPbeta regulates multiple IL-1beta-induced human astrocyte inflammatory genes. *J. Neuroinflamm.* 9, 177.
- Figuroa-Romero, C., Hur, J., Bender, D.E., Delaney, C.E., Cataldo, M.D., Smith, A.L., Yung, R., Ruden, D.M., Callaghan, B.C., Feldman, E.L., 2012. Identification of epigenetically altered genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 7, e2672.
- Flobdy, P., Barlow, C., Kylefjord, H., Ahrlund-Richter, L., Xanthopoulos, K.G., 1996. Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein alpha. *J. Biol. Chem.* 271, 24753–24760.
- Fu, L., Kilberg, M.S., 2013. Elevated cJUN expression and an ATF/CRE site within the ATF3 promoter contribute to activation of ATF3 transcription by the amino acid response. *Physiol. Genomics* 45, 127–137.
- Fuchs, F., Damm, J., Gerstberger, R., Roth, J., Rummel, C., 2013. Activation of the inflammatory transcription factor nuclear factor interleukin-6 during inflammatory and psychological stress in the brain. *J. Neuroinflamm.* 10, 140.
- Fukuoka, T., Kitami, Y., Okura, T., Hiwada, K., 1999. Transcriptional regulation of the platelet-derived growth factor alpha receptor gene via CCAAT/enhancer-binding protein-delta in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274, 25576–25582.
- Gandhi, K.S., McKay, F.C., Cox, M., Riveros, C., Armstrong, N., Heard, R.N., Vucic, S., Williams, D.W., Stankovich, J., Brown, M., et al., 2010. The multiple sclerosis whole blood mRNA transcriptome and genetic associations indicate dysregulation of specific T cell pathways in pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2134–2143.
- Gantt, K., Cherry, J., Tenney, R., Karschner, V., Pekala, P.H., 2005. An early event in adipogenesis, the nuclear selection of the CCAAT enhancer-binding protein {beta} (C/EBP{beta}) mRNA by HuR and its translocation to the cytosol. *J. Biol. Chem.* 280, 24768–24774.
- Gao, H., Parkin, S., Johnson, P.F., Schwartz, R.C., 2002. C/EBP gamma has a stimulatory role on the IL-6 and IL-8 promoters. *J. Biol. Chem.* 277, 38827–38837.
- Garcia-Osta, A., Tsokas, P., Pollonini, G., Landau, E.M., Blitzer, R., Alberini, C.M., 2006. MusK expressed in the brain mediates cholinergic responses, synaptic plasticity, and memory formation. *J. Neurosci.* 26, 7919–7932.
- Gaub, P., Joshi, Y., Wuttke, A., Naumann, U., Schnichels, S., Heiduschka, P., Di Giovanni, S., 2011. The histone acetyltransferase p300 promotes intrinsic axonal regeneration. *Brain* 134, 2134–2148.
- Gaya, M., Repetto, V., Toneatto, J., Anesini, C., Pivien-Pilipuk, G., Moreno, S., 2013. Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPARgamma pathways at the onset of the differentiation program. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3796–3806.
- Giedraitis, V., Kilander, L., Degerman-Gunnarsson, M., Sundelof, J., Axelsson, T., Syvanen, A.C., Lannfelt, L., Glaser, A., 2009. Genetic analysis of Alzheimer's disease in the Uppsala Longitudinal Study of Adult Men. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 27, 59–68.
- Giri, S., Jatana, M., Rattan, R., Won, J.S., Singh, I., Singh, A.K., 2002. Galactosylsphingosine (psychosine)-induced expression of cytokine-mediated inducible nitric oxide synthases via AP-1 and C/EBP: implications for Krabbe disease. *FASEB J.* 16, 661–672.
- Giri, S., Nath, N., Smith, B., Viollet, B., Singh, A.K., Singh, I., 2004. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J. Neurosci.* 24, 479–487.
- Gomez-Nicola, D., Fransen, N.L., Suzzi, S., Perry, V.H., 2013. Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J. Neurosci.* 33, 2481–2493.
- Gomez-Santos, C., Barrachina, M., Gimenez-Xavier, P., Dalfo, E., Ferrer, I., Ambrosio, S., 2005. Induction of C/EBP beta and GADD153 expression by dopamine in human neuroblastoma cells. Relationship with alpha-synuclein increase and cell damage. *Brain Res. Bull.* 65, 87–95.
- Gomis, R.R., Alarcon, C., Nadal, C., Van Poznak, C., Massague, J., 2006. C/EBPbeta at the core of the TGfbeta cytoskeletal response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell* 10, 203–214.
- Gong, B., Pan, Y., Zhao, W., Knable, L., Vempati, P., Begum, S., Ho, L., Wang, J., Yemul, S., Barnum, S., et al., 2013. IVIG immunotherapy protects against synaptic dysfunction in Alzheimer's disease through complement anaphylatoxin C5a-mediated AMPA-CREB-C/EBP signaling pathway. *Mol. Immunol.* 56, 619–629.
- Gorgoni, B., Caivano, M., Arizmendi, C., Poli, V., 2001. The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the cox-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 40769–40777.
- Gow, A., Wrabetz, L., 2009. CHOP and the endoplasmic reticulum stress response in myelinating glia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 505–510.
- Grant, C., Nonnemacher, M., Jain, P., Pandya, D., Irish, B., Williams, S.C., Wigdahl, B., 2006. CCAAT/enhancer-binding proteins modulate human T cell leukemia virus type 1 long terminal repeat activation. *Virology* 348, 354–369.
- Gresa-Arribas, N., Serratos, J., Saura, J., Sola, C., 2010. Inhibition of CCAAT/enhancer binding protein delta expression by chrysin in microglial cells results in anti-inflammatory and neuroprotective effects. *J. Neurochem.* 115, 526–536.



- Grewal, S., Defame, N., Zhang, X., De Gois, S., Shawki, A., Mackenzie, B., Chen, C., Varouhi, H., Erickson, J.D., 2009. SNAT2 amino acid transporter is regulated by amino acids of the SLC6 gamma-aminobutyric acid transporter subfamily in neocortical neurons and may play a role in delivering glutamine for glutamatergic transmission. *J. Biol. Chem.* 284, 11224–11236.
- Grigoryan, G., Reinke, A.W., Keating, A.E., 2009. Design of protein-interaction specificity gives selective bZIP-binding peptides. *Nature* 458, 859–864.
- Grontved, L., John, S., Baek, S., Liu, Y., Buckley, J.R., Vinson, C., Aguilera, G., Hager, G.L., 2013. C/EBP maintains chromatin accessibility in liver and facilitates glucocorticoid receptor recruitment to steroid response elements. *EMBO J.* 32, 1568–1583.
- Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J.H., Miniaci, M.C., Schwartz, J.H., Thanos, D., Kandel, E.R., 2002. Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell* 111, 483–493.
- Guerzoni, C., Bardini, M., Mariani, S.A., Ferrari-Amorotti, G., Neviani, P., Panno, M.L., Zhang, Y., Martinez, R., Perrotti, D., Calabretta, B., 2006. Inducible activation of CEBPB, a gene negatively regulated by BCR/ABL, inhibits proliferation and promotes differentiation of BCR/ABL-expressing cells. *Blood* 107, 4080–4089.
- Guo, L., Li, X., Huang, J.X., Huang, H.Y., Zhang, Y.Y., Qian, S.W., Zhu, H., Zhang, Y.D., Liu, Y., Liu, Y., et al., 2012. Histone demethylase Kdm4b functions as a co-factor of C/EBPbeta to promote mitotic clonal expansion during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Death Differ.* 19, 1917–1927.
- Gutsch, R., Kandemir, J.D., Pietsch, D., Cappello, C., Meyer, J., Simanowski, K., Huber, R., Brand, K., 2011. CCAAT/enhancer-binding protein beta inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the retinoblastoma protein/E2F/cyclin E pathway but is not directly required for macrophage morphology. *J. Biol. Chem.* 286, 22716–22729.
- Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., et al., 2011. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat. Biotechnol.* 29, 824–828.
- Halene, S., Gaines, P., Sun, H., Zibello, T., Lin, S., Khanna-Gupta, A., Williams, S.C., Perkins, A., Krause, D., Berliner, N., 2010. C/EBPepsilon directs granulocytic-vs-monocytic lineage determination and confers chemotactic function via Hlx. *Exp. Hematol.* 38, 90–103.
- Halterman, M.W., Giuliano, R., Dejesus, C., Schor, N.F., 2009. In-tube transfection improves the efficiency of gene transfer in primary neuronal cultures. *J. Neurosci. Methods* 177, 348–354.
- Hallenborg, P., Feddersen, S., Francoz, S., Murano, I., Sundekilde, U., Petersen, R.K., Akimov, V., Olson, M.V., Lozano, G., Cinti, S., et al., 2012. Mdm2 controls CREB-dependent transactivation and initiation of adipocyte differentiation. *Cell Death Differ.* 19, 1381–1389.
- Hanlon, M., Sturgill, T.W., Sealy, L., 2001. ERK2- and p90(Rsk2)-dependent pathways regulate the CCAAT/enhancer-binding protein-beta interaction with serum response factor. *J. Biol. Chem.* 276, 38449–38456.
- Hattori, T., Ohoka, N., Inoue, Y., Hayashi, H., Onozaki, K., 2003. C/EBP family transcription factors are degraded by the proteasome but stabilized by forming dimer. *Oncogene* 22, 1273–1280.
- He, M., Xu, Z., Ding, T., Kuang, D.M., Zheng, L., 2009. MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta. *Cell Mol. Immunol.* 6, 343–352.
- Hirai, H., Kamio, N., Huang, G., Matsusue, A., Ogino, S., Kimura, N., Satake, S., Ashihara, E., Imanishi, J., Tenen, D.G., et al., 2013. Cyclic AMP responsive element binding proteins are involved in 'emergency' granulopoiesis through the upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta. *PLoS ONE* 8, e54862.
- Hirata, M., Kugimiya, F., Fukai, A., Saito, T., Yano, F., Ikeda, T., Mabuchi, A., Sapkota, B.R., Akune, T., Nishida, N., et al., 2012. C/EBPbeta and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2alpha as the inducer in chondrocytes. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1111–1123.
- Hirata, T., Cui, Y.J., Funakoshi, T., Mizukami, Y., Ishikawa, Y., Shibasaki, F., Matsumoto, M., Sakabe, T., 2007. The temporal profile of genomic responses and protein synthesis in ischemic tolerance of the rat brain induced by repeated hyperbaric oxygen. *Brain Res.* 1130, 214–222.
- Hoepner, M.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Linzer, D.I., Wu, B., 1996. Cloning and characterization of mouse CCAAT binding factor. *Nucleic Acids Res.* 24, 1091–1098.
- Holm, T.H., Draebys, D., Owens, T., 2012. Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia* 60, 630–638.
- Hong, S., Skaist, A.M., Wheelan, S.J., Friedman, A.D., 2011. AP-1 protein induction during monoepoiesis favors C/EBP: AP-1 heterodimers over C/EBP homodimerization and stimulates FosB transcription. *J. Leukoc Biol.* 90, 643–651.
- Hoozemans, J.J., van Haastert, E.S., Nijholt, D.A., Rozenmuller, A.J., Scheper, W., 2012. Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurodegener. Dis.* 10, 212–215.
- Hou, Y., Xue, P., Bai, Y., Liu, D., Woods, C.G., Yarborough, K., Fu, J., Zhang, Q., Sun, G., Collins, S., et al., 2012. Nuclear factor erythroid-derived factor 2-related factor 2 regulates transcription of CCAAT/enhancer-binding protein beta during adipogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 462–472.
- Hsiao, Y.W., Li, C.F., Chi, J.Y., Tseng, J.T., Chang, Y., Hsu, L.J., Lee, C.H., Chang, T.H., Wang, S.M., Wang, D.D., et al., 2013. CCAAT/enhancer binding protein delta in macrophages contributes to immunosuppression and inhibits phagocytosis in nasopharyngeal carcinoma. *Sci. Signal.* 6, RA59.
- Hu, H.M., Baer, M., Williams, S.C., Johnson, P.F., Schwartz, R.C., 1998. Redundancy of C/EBP alpha, -beta, and -delta in supporting the lipopolysaccharide-induced transcription of IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J. Immunol.* 160, 2334–2342.
- Hu, H.M., Tian, Q., Baer, M., Spooner, C.J., Williams, S.C., Johnson, P.F., Schwartz, R.C., 2000. The C/EBP bZIP domain can mediate lipopolysaccharide induction of the proinflammatory cytokines interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J. Biol. Chem.* 275, 16373–16381.
- Hua, F., Wang, J., Ishrat, T., Wei, W., Atif, F., Sayeed, I., Stein, D.G., 2011. Genomic profile of Toll-like receptor pathways in traumatically brain-injured mice: effect of exogenous progesterone. *J. Neuroinflamm.* 8, 42.
- Huang, J.H., Liao, W.S., 1994. Induction of the mouse serum amyloid A3 gene by cytokines requires both C/EBP family proteins and a novel constitutive nuclear factor. *Mol. Cell Biol.* 14, 4475–4484.
- Huang, Y.C., Chang, W.C., Su, J.G., Cai, J.L., Chen, C.C., Hung, J.J., Liu, Y.W., 2007. Peptidoglycan enhances transcriptional expression of CCAAT/enhancer-binding protein delta gene in mouse macrophages. *J. Biomed. Sci.* 14, 407–418.
- Huber, R., Pietsch, D., Panterodt, T., Brand, K., 2012. Regulation of C/EBPbeta and resulting functions in cells of the monocytic lineage. *Cell Signal.* 24, 1287–1296.
- Huggins, C.J., Malik, R., Lee, S., Salotti, J., Thomas, S., Martin, N., Quinones, O.A., Alvord, W.G., Olanich, M.E., Keller, J.R., et al., 2013. C/EBPgamma Suppresses Senescence and Inflammatory Gene Expression by Heterodimerizing with C/EBPbeta. *Mol. Cell Biol.* 33, 3242–3258.
- Hutt, J.A., O'Rourke, J.P., DeWille, J., 2000. Signal transducer and activator of transcription 3 activates CCAAT enhancer-binding protein delta gene transcription in G0 growth-arrested mouse mammary epithelial cells and in involuting mouse mammary gland. *J. Biol. Chem.* 275, 29123–29131.
- Hyvonen, M.T., Koponen, T., Weisell, J., Pietila, M., Khotumov, A.R., Vepsäläinen, J., Alhonen, L., Keinänen, T.A., 2013. Spermidine promotes adipogenesis of 3T3-L1 cells by preventing interaction of ANP32 with HuR and Pp2A. *Biochem. J.* 453, 467–474.
- Imbriano, C., Bolognese, F., Gurtner, A., Piaggio, G., Mantovani, R., 2001. HSP-CBF is an NF-Y-dependent coactivator of the heat shock promoters CCAAT boxes. *J. Biol. Chem.* 276, 26332–26339.
- Jana, M., Anderson, J.A., Saha, R.N., Liu, X., Pahan, K., 2005. Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 655–664.
- Jana, M., Dasgupta, S., Liu, X., Pahan, K., 2002. Regulation of tumor necrosis factor-alpha expression by CD40 ligation in BV-2 microglial cells. *J. Neurochem.* 80, 197–206.
- Jana, M., Dasgupta, S., Saha, R.N., Liu, X., Pahan, K., 2003. Induction of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by interleukin-12 p40 monomer and homodimer in microglia and macrophages. *J. Neurochem.* 86, 519–528.
- Jana, M., Liu, X., Koka, S., Ghosh, S., Petro, T.M., Pahan, K., 2001. Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 44527–44533.
- Ji, C., Chang, W., Centrella, M., McCarthy, T.L., 2003. Activation domains of CCAAT enhancer binding protein delta: regions required for native activity and prostaglandin E2-dependent inactivation of insulin-like growth factor I gene expression in rat osteoblasts. *Mol. Endocrinol.* 17, 1834–1843.
- Ji, S., Li, W., Bao, L., Han, P., Yang, W., Ma, L., Meng, F., Cao, B., 2014. PU.1 promotes miR-191 to inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 329–333.
- Jimenez-Pretner, M., Berney, X., Uldry, M., Vitali, A., Cinti, S., Ledford, J.G., Thorens, B., 2011. Plac8 is an inducer of C/EBPbeta required for brown fat differentiation, thermoregulation, and control of body weight. *Cell Metab.* 14, 658–670.
- Jin, J., Iakova, P., Jiang, Y., Lewis, K., Sullivan, E., Jawanmardi, N., Donehower, L., Timchenko, L., Timchenko, N.A., 2013. Transcriptional and translational regulation of C/EBPbeta-HDAC1 protein complexes controls different levels of p53, SIRT1, and PGC1alpha proteins at the early and late stages of liver cancer. *J. Biol. Chem.* 288, 14451–14462.
- Jin, J., Iakova, P., Jiang, Y., Medrano, E.E., Timchenko, N.A., 2011. The reduction of SIRT1 in livers of old mice leads to impaired body homeostasis and to inhibition of liver proliferation. *Hepatology* 54, 989–998.
- Jin, J., Wang, G.L., Shi, X., Darlington, G.J., Timchenko, N.A., 2009. The age-associated decline of glycogen synthase kinase 3beta plays a critical role in the inhibition of liver regeneration. *Mol. Cell Biol.* 29, 3867–3880.
- Johansson-Haque, K., Palanichamy, E., Okret, S., 2008. Stimulation of MAPK-phosphatase 1 gene expression by glucocorticoids occurs through a tethering mechanism involving C/EBP. *J. Mol. Endocrinol.* 41, 239–249.
- Johansson, J., Berg, T., Kurzejamska, E., Pang, M.F., Tabor, V., Jansson, M., Roswall, P., Pietras, K., Sund, M., Religa, P., et al., 2013. MiR-155-mediated loss of C/EBPbeta shifts the TGF-beta response from growth inhibition to epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in breast cancer. *Oncogene* 32, 5614–5624.
- Joo, M., Park, G.Y., Wright, J.G., Blackwell, T.S., Atchison, M.L., Christman, J.W., 2004. Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in macrophages by PU.1. *J. Biol. Chem.* 279, 6658–6665.
- Kaji, H., Fukano, C., Kimura, Y., Takiguchi, E., Tanida, K., 2008. Genetic variations at the CCAAT/enhancer-binding protein delta are associated with metabolic phenotypes in the Japanese population. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 6, 24–31.
- Kaminsky, E.B., Kaul, V., Paschall, J., Church, D.M., Bunke, B., Kunig, D., Moreno-De-Luca, D., Moreno-De-Luca, A., Mulle, J.G., Warren, S.T., et al., 2011. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet. Med.* 13, 777–784.
- Kapadia, R., Tureyen, K., Bowen, K.K., Kalluri, H., Johnson, P.F., Vemuganti, R., 2006. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 98, 1718–1731.



- Karagiannides, I., Tchkonja, T., Dobson, D.E., Steppan, C.M., Cummins, P., Chan, G., Salvatori, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kirkland, J.L., 2001. Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1772–R1780.
- Karagiannides, I., Thomou, T., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Kypreos, K.E., Cartwright, A., Dalagiorou, G., Lash, T.L., Farmer, S.R., Timchenko, N.A., et al., 2006. Increased CUG triplet repeat-binding protein-1 predisposes to impaired adipogenesis with aging. *J. Biol. Chem.* 281, 23025–23033.
- Kazkayasi, I., Burul-Bozkurt, N., Onder, S., Kelicen-Ugur, P., Pekiner, C., 2013. Effects of experimental diabetes on C/EBP proteins in rat hippocampus, sciatic nerve and ganglia. *Cell. Mol. Neurobiol.* 33, 559–567.
- Kelicen, P., Tindberg, N., 2004. Lipopolysaccharide induces CYP2E1 in astrocytes through MAP kinase kinase-3 and C/EBPbeta and -delta. *J. Biol. Chem.* 279, 15734–15742.
- Kfoury, N., Kapatou, G., 2009. Identification of neuronal target genes for CCAAT/enhancer binding proteins. *Mol. Cell. Neurosci.* 40, 313–327.
- Ki, S.H., Kim, S.G., 2008. Phase II enzyme induction by alpha-lipoic acid through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent C/EBPs activation. *Xenobiotica* 38, 587–604.
- Kim, J., Cantwell, C.A., Johnson, P.F., Pfarr, C.M., Williams, S.C., 2002. Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J. Biol. Chem.* 277, 38037–38044.
- Kim, J.W., Tang, Q.Q., Li, X., Lane, M.D., 2007. Effect of phosphorylation and S-S bond-induced dimerization on DNA binding and transcriptional activation by C/EBPbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1800–1804.
- Kim, M.O., Suh, H.S., Brosnan, C.F., Lee, S.C., 2004. Regulation of RANTES/CCL5 expression in human astrocytes by interleukin-1 and interferon-beta. *J. Neurochem.* 90, 297–308.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., Bujard, H., 1996. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10933–10938.
- Kitami, Y., Fukuoka, T., Hiwada, K., Inagami, T., 1999. A high level of CCAAT/enhancer binding protein-delta expression is a major determinant for markedly elevated differential gene expression of the platelet-derived growth factor-alpha receptor in vascular smooth muscle cells of genetically hypertensive rats. *Circ. Res.* 84, 64–73.
- Ko, C.Y., Chang, L.H., Lee, Y.C., Sterneck, E., Cheng, C.P., Chen, S.H., Huang, A.M., Tseng, J.T., Wang, J.M., 2012. CCAAT/enhancer binding protein delta (CEBPD) elevating PTX3 expression inhibits macrophage-mediated phagocytosis of dying neuron cells. *Neurobiol. Aging* 33, e11–e25.
- Ko, C.Y., Hsu, H.C., Shen, M.R., Chang, W.C., Wang, J.M., 2008. Epigenetic silencing of CCAAT/enhancer-binding protein delta activity by YY1/polycomb group/DNA methyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* 283, 30919–30932.
- Ko, C.Y., Wang, W.L., Wang, S.M., Chu, Y.Y., Chang, W.C., Wang, J.M., 2014. Glycogen synthase kinase-3beta-mediated CCAAT/enhancer-binding protein delta phosphorylation in astrocytes promotes migration and activation of microglia/macrophages. *Neurobiol. Aging* 35, 24–34.
- Kolyada, A.Y., Madias, N.E., 2001. Transcriptional regulation of the human iNOS gene by IL-1beta in endothelial cells. *Mol. Med.* 7, 329–343.
- Kovacs, K.A., Steinmann, M., Magistretti, P.J., Halfon, O., Cardinaux, J.R., 2003. CCAAT/enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 36959–36965.
- Kovacs, K.A., Steinmann, M., Magistretti, P.J., Halfon, O., Cardinaux, J.R., 2006. C/EBPbeta couples dopamine signalling to substance P precursor gene expression in striatal neurons. *J. Neurochem.* 98, 1390–1399.
- Kowenz-Leutz, E., Leutz, A., 1999. A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol. Cell* 4, 735–743.
- Kowenz-Leutz, E., Pless, O., Dittmar, G., Knoblich, M., Leutz, A., 2010. Crosstalk between C/EBPbeta phosphorylation, arginine methylation, and SWI/SNF/Mediator implies an indexing transcription factor code. *EMBO J.* 29, 1105–1115.
- Kravchenko, V.V., Mathison, J.C., Schwaborn, K., Mercurio, F., Ulevitch, R.J., 2003. IKK1/IKKepsilon plays a key role in integrating signals induced by pro-inflammatory stimuli. *J. Biol. Chem.* 278, 26612–26619.
- Kumar, R., Krause, G.S., Yoshida, H., Mori, K., DeGracia, D.J., 2003. Dysfunction of the unfolded protein response during global brain ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 462–471.
- Lacorte, J.M., Kistaki, E., Beigneux, A., Zannis, V.I., Chambaz, J., Talianidis, I., 1997. Activation of CAAT enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) by interleukin-1 negatively influences apolipoprotein C-III expression. *J. Biol. Chem.* 272, 23578–23584.
- Lai, P.H., Wang, W.L., Ko, C.Y., Lee, Y.C., Yang, W.M., Shen, T.W., Chang, W.C., Wang, J.M., 2008. HDAC1/HDAC3 modulates PPARgamma2 transcription through the sumoylated CEBPD in hepatic lipogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1803–1814.
- Lai, T.Y., Wu, S.D., Tsai, M.H., Chuang, E.Y., Chuang, L.L., Hsu, L.C., Lai, L.C., 2013. Transcription of Tnfrsf13 is regulated by NF-kappaB and p38 via C/EBPbeta in activated macrophages. *PLoS ONE* 8, e73153.
- Lamirand, A., Ramauge, M., Pierre, M., Courtin, F., 2011. Bacterial lipopolysaccharide induces type 2 deiodinase in cultured rat astrocytes. *J. Endocrinol.* 208, 183–192.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J., McKnight, S.L., 1988. Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev.* 2, 786–800.
- Le Lay, S., Lefrere, I., Trautwein, C., Dugail, I., Krief, S., 2002. Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein beta as an SREBP-1C target. *J. Biol. Chem.* 277, 35625–35634.
- Lechner, S., Mitterberger, M.C., Mattesich, M., Zwerschke, W., 2013. Role of C/EBPbeta-LAP and C/EBPbeta-LIP in early adipogenic differentiation of human white adipose-derived progenitors and at later stages in immature adipocytes. *Differentiation* 85, 20–31.
- Lee, C.H., Liu, C.M., Wen, C.C., Chang, S.M., Hwu, H.G., 2010a. Genetic copy number variants in sib pairs both affected with schizophrenia. *J. Biomed. Sci.* 17, 2.
- Lee, J.A., Kim, H.K., Kim, K.H., Han, J.H., Lee, Y.S., Lim, C.S., Chang, D.J., Kubo, T., Kaang, B.K., 2001. Overexpression of and RNA interference with the CCAAT enhancer-binding protein on long-term facilitation of Aplysia sensory to motor synapses. *Learn. Mem.* 8, 220–226.
- Lee, J.Y., Han, C.Y., Yang, J.W., Smith, C., Kim, S.K., Lee, E.Y., Kim, S.G., Kang, K.W., 2007. Induction of glutathione transferase in insulin-like growth factor type I receptor-overexpressed hepatoma cells. *Mol. Pharmacol.* 72, 1082–1093.
- Lee, K., Na, W., Lee, J.Y., Na, J., Cho, H., Yune, T.Y., Kim, W.S., Ju, B.G., 2012a. Molecular mechanism of Jmjd3-mediated interleukin-6 gene regulation in endothelial cells underlying spinal cord injury. *J. Neurochem.* 122, 272–282.
- Lee, S., Liu, B., Lee, S., Huang, S.X., Shen, B., Qian, S.B., 2012b. Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E2424–E2432.
- Lee, S., Miller, M., Shuman, J.D., Johnson, P.F., 2010b. CCAAT/Enhancer-binding protein beta DNA binding is auto-inhibited by multiple elements that also mediate association with p300/CREB-binding protein (CBP). *J. Biol. Chem.* 285, 21399–21410.
- Lee, S., Shuman, J.D., Guszczynski, T., Sakchaisri, K., Sebastian, T., Copeland, T.D., Miller, M., Cohen, M.S., Taunton, J., Smart, R.C., et al., 2010c. RSK-mediated phosphorylation in the C/EBP(beta) leucine zipper regulates DNA binding, dimerization, and growth arrest activity. *Mol. Cell Biol.* 30, 2621–2635.
- Lekstrom-Himes, J., Xanthopoulos, K.G., 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 28545–28548.
- Lekstrom-Himes, J., Xanthopoulos, K.G., 1999. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is critical for effective neutrophil-mediated response to inflammatory challenge. *Blood* 93, 3096–3105.
- Leutz, A., Pless, O., Lappe, M., Dittmar, G., Kowenz-Leutz, E., 2011. Crosstalk between phosphorylation and multi-site arginine/lysine methylation in C/EBPs. *Transcription* 2, 3–8.
- Li, B., Si, J., DeWille, J.W., 2008. Ultraviolet radiation (UVR) activates p38 MAP kinase and induces post-transcriptional stabilization of the C/EBPdelta mRNA in G0 growth arrested mammary epithelial cells. *J. Cell Biochem.* 103, 1657–1669.
- Li, H., Baldwin, B.R., Zahnow, C.A., 2011a. LIP expression is regulated by IGF-1R signaling and participates in suppression of anoikis. *Mol. Cancer* 10, 100.
- Li, R., Strohmeier, R., Liang, Z., Lue, L.F., Rogers, J., 2004. CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta) expression and elevation in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 25, 991–999.
- Li, S., Pal, R., Monaghan, S.A., Schafer, P., Ouyang, H., Mapara, M., Galson, D.L., Lentzsch, S., 2011b. IIMiD immunomodulatory compounds block C/EBP(beta) translation through eIF4E down-regulation resulting in inhibition of MDM. *Blood* 117, 5157–5165.
- Li, X., Molina, H., Huang, H., Zhang, Y.Y., Liu, M., Qian, S.W., Slawson, C., Dias, W.B., Pandey, A., Hart, G.W., et al., 2009. O-linked N-acetylglucosamine modification on CCAAT enhancer-binding protein beta: role during adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 284, 19248–19254.
- Lin, W.C., Shen, B.J., Tsay, Y.G., Yen, H.C., Lee, S.C., Chang, C.J., 2002. Transcriptional activation of C/EBPbeta gene by c-Jun and ATF2. *DNA Cell Biol.* 21, 551–560.
- Listman, J.A., Wara-aswapati, N., Race, J.E., Blystone, L.W., Walker-Kopp, N., Yang, Z., Aaron, P.E., 2005. Conserved ETS domain arginines mediate DNA binding, nuclear localization, and a novel mode of bZIP interaction. *J. Biol. Chem.* 280, 41421–41428.
- Litvak, V., Ramsey, S.A., Rust, A.G., Zak, D.E., Kennedy, K.A., Lampano, A.E., Nykter, M., Shmulevich, I., Aderem, A., 2009. Function of C/EBPdelta in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals. *Nat. Immunol.* 10, 437–443.
- Liu, M., Hou, X., Zhang, P., Hao, Y., Yang, Y., Wu, X., Zhu, D., Guan, Y., 2013a. Microarray gene expression profiling analysis combined with bioinformatics in multiple sclerosis. *Mol. Biol. Rep.* 40, 3731–3737.
- Liu, S., Yang, Y., Wu, J., 2011. TNFalpha-induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 618–624.
- Liu, X., Jana, M., Dasgupta, S., Koka, S., He, J., Wood, C., Pahan, K., 2002. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) tat induces nitric-oxide synthase in human astroglia. *J. Biol. Chem.* 277, 39312–39319.
- Liu, X.S., Chopp, M., Zhang, R.L., Hozeska-Solgot, A., Gregg, S.C., Buller, B., Lu, M., Zhang, Z.G., 2009. Angiopoietin 2 mediates the differentiation and migration of neural progenitor cells in the subventricular zone after stroke. *J. Biol. Chem.* 284, 22680–22689.
- Liu, Y., Zhang, Y.D., Guo, L., Huang, H.Y., Zhu, H., Huang, J.X., Liu, Y., Zhou, S.R., Dang, Y.J., Li, X., et al., 2013b. Protein Inhibitor of Activated STAT 1 (PIAS1) Is Identified as the SUMO E3 Ligase of CCAAT/Enhancer-Binding Protein beta (C/EBPbeta) during Adipogenesis. *Mol. Cell Biol.* 33, 4606–4617.
- Liu, Y.W., Chen, C.C., Wang, J.M., Chang, W.C., Huang, Y.C., Chung, S.Y., Chen, B.K., Hung, J.J., 2007. Role of transcriptional factors Sp1, c-Rel, and c-Jun in

- LPS-induced C/EBPdelta gene expression of mouse macrophages. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 3282–3294.
- Lopez, A.B., Wang, C., Huang, C.C., Yaman, I., Li, Y., Chakravarty, K., Johnson, P.F., Chiang, C.M., Snider, M.D., Wek, R.C., et al., 2007. A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. *Biochem. J.* 402, 163–173.
- Lopez de Heredia, L., Gengatharan, A., Foster, J., Mather, S., Magoulas, C., 2011. Bioluminescence imaging of the brain response to acute inflammation in living C/EBP reporter mice. *Neurosci. Lett.* 497, 134–138.
- Lu, J., Sun, H., Wang, X., Liu, C., Xu, X., Li, F., Huang, B., 2005. Interleukin-12 p40 promoter activity is regulated by the reversible acetylation mediated by HDAC1 and p300. *Cytokine* 31, 46–51.
- Lum, L.S., Sultzman, L.A., Kaufman, R.J., Linzer, D.I., Wu, B.J., 1990. A cloned human CCAAT-box-binding factor stimulates transcription from the human hsp70 promoter. *Mol. Cell Biol.* 10, 6709–6717.
- MacGillivray, H.D., Cornelis, J., van der Kallen, L.R., Sassen, M.M., Verhaagen, J., Smit, A.B., van Kesteren, R.E., 2011. Genome-wide gene expression and promoter binding analysis identifies NFIL3 as a repressor of C/EBP target genes in neuronal outgrowth. *Mol. Cell Neurosci.* 46, 460–468.
- Mahoney, C.W., Shuman, J., McKnight, S.L., Chen, H.C., Huang, K.P., 1992. Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding. *J. Biol. Chem.* 267, 19396–19403.
- Maranto, J., Rappaport, J., Datta, P.K., 2011. Role of C/EBP-beta, p38 MAPK, and MKK6 in IL-1beta-mediated C3 gene regulation in astrocytes. *J. Cell Biochem.* 112, 1168–1175.
- Marcinkowska, E., Garay, E., Gocek, E., Chrobak, A., Wang, X., Studzinski, G.P., 2006. Regulation of C/EBPbeta isoforms by MAPK pathways in HL60 cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Exp. Cell Res.* 312, 2054–2065.
- Marshall, J., Dolan, B.M., Garcia, E.P., Sathe, S., Tang, X., Mao, Z., Blair, L.A., 2003. Calcium channel and NMDA receptor activities differentially regulate nuclear C/EBPbeta levels to control neuronal survival. *Neuron* 39, 625–639.
- Matsuda, T., Kido, Y., Asahara, S., Kaisho, T., Tanaka, T., Hashimoto, N., Shigeyama, Y., Takeda, A., Inoue, T., Shibutani, Y., et al., 2010. Ablation of C/EBPbeta alleviates ER stress and pancreatic beta cell failure through the GRP78 chaperone in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 115–126.
- McCarthy, T.L., Ji, C., Chen, Y., Kim, K.K., Imagawa, M., Ito, Y., Centrella, M., 2000. Runt domain factor (Runx)-dependent effects on CCAAT/enhancer-binding protein delta expression and activity in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 275, 21746–21753.
- McCaustlin, C.S., Heath, V., Colangelo, A.M., Malik, R., Lee, S., Mallei, A., Mocchetti, I., Johnson, P.F., 2006. CCAAT/enhancer-binding protein delta and cAMP-response element-binding protein mediate inducible expression of the nerve growth factor gene in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 281, 17681–17688.
- McKnight, S.L., 2001. McBindall—a better name for CCAAT/enhancer binding proteins? *Cell* 107, 259–261.
- Medzhitov, R., Horng, T., 2009. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 692–703.
- Meir, O., Dvash, E., Werman, A., Rubinstein, M., 2010. C/EBP-beta regulates endoplasmic reticulum stress-triggered cell death in mouse and human models. *PLoS ONE* 5, e9516.
- Menard, C., Hein, P., Paquin, A., Savelson, A., Yang, X.M., Lederfer, D., Barnabe-Heider, F., Mir, A.A., Sterneck, E., Peterson, A.C., et al., 2002. An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron* 36, 597–610.
- Merhav, M., Kuulmann-Vander, S., Elkobi, A., Jacobson-Pick, S., Karni, A., Rosenblum, K., 2006. Behavioral interference and C/EBPbeta expression in the insular-cortex reveal a prolonged time period for taste memory consolidation. *Learn. Mem.* 13, 571–574.
- Milekic, M.H., Pollonini, G., Alberini, C.M., 2007. Temporal requirement of C/EBPbeta in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance. *Learn. Mem.* 14, 504–511.
- Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Xu, H., Leutz, A., 2004. Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta. *Mol. Cell* 13, 241–250.
- Monti, B., Berteotti, C., Contestabile, A., 2005. Dysregulation of memory-related proteins in the hippocampus of aged rats and their relation with cognitive impairment. *Hippocampus* 15, 1041–1049.
- Morrison, J.P., Ton, T.V., Collins, J.B., Switzer, R.C., Little, P.B., Morgan, D.L., Sills, R.C., 2009. Gene expression studies reveal that DNA damage, vascular perturbation, and inflammation contribute to the pathogenesis of carbonyl sulfide neurotoxicity. *Toxicol. Pathol.* 37, 502–511.
- Mouthiers, A., Baillet, E., Delomenie, C., Porquet, D., Mejdoubi-Charef, N., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha physically interacts with CCAAT/enhancer binding protein (C/EBPbeta) to inhibit C/EBPbeta-responsive alpha-1-acid glycoprotein gene expression. *Mol. Endocrinol.* 19, 1135–1146.
- Murakami, M., Ito, H., Hagiwara, K., Kobayashi, M., Hoshikawa, A., Takagi, A., Kojima, T., Tamiya-Koizumi, K., Sobue, S., Ichihara, M., et al., 2011. Sphingosine kinase 1/S1P pathway involvement in the GDNF-induced GAP43 transcription. *J. Cell Biochem.* 112, 3449–3458.
- Nadeau, S., Hein, P., Fernandes, K.J., Peterson, A.C., Miller, F.D., 2005. A transcriptional role for C/EBP beta in the neuronal response to axonal injury. *Mol. Cell Neurosci.* 29, 525–535.
- Nakade, K., Pan, J., Yoshiki, A., Ugai, H., Kimura, M., Liu, B., Li, H., Obata, Y., Iwama, M., Itohara, S., et al., 2007. JDP2 suppresses adipocyte differentiation by regulating histone acetylation. *Cell Death Differ.* 14, 1398–1405.
- Nakajima, T., Kinoshita, S., Sasagawa, T., Sasaki, K., Naruto, M., Kishimoto, T., Akira, S., 1993. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2207–2211.
- Nerlov, C., 2007. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol.* 17, 318–324.
- Nerlov, C., 2008. C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Curr Opin Cell Biol.* 20, 180–185.
- Newman, J.R., Keating, A.E., 2003. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science* 300, 2097–2101.
- Nichols, C.D., Sanders-Bush, E., 2004. Molecular genetic responses to lysergic acid diethylamide include transcriptional activation of MAP kinase phosphatase-1, C/EBP-beta and ILAD-1, a novel gene with homology to arrestins. *J. Neurochem.* 90, 576–584.
- Niehof, M., Kubicka, S., Zender, L., Manns, M.P., Trautwein, C., 2001a. Autoregulation enables different pathways to control CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) transcription. *J. Mol. Biol.* 309, 855–868.
- Niehof, M., Manns, M.P., Trautwein, C., 1997. CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Mol. Cell Biol.* 17, 3600–3613.
- Niehof, M., Streeck, K., Rakemann, T., Bischoff, S.C., Manns, M.P., Horn, F., Trautwein, C., 2001b. Interleukin-6-induced tethering of STAT3 to the LAP/C/EBPbeta promoter suggests a new mechanism of transcriptional regulation by STAT3. *J. Biol. Chem.* 276, 9016–9027.
- Obrietan, K., Hoyt, K.R., 2004. CRE-mediated transcription is increased in Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurosci.* 24, 791–796.
- Oliva Jr., A.A., Kang, Y., Sanchez-Molano, J., Furones, C., Atkins, C.M., 2012. STAT3 signaling after traumatic brain injury. *J. Neurochem.* 120, 710–720.
- Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T., Imagawa, M., 1996. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J. Biol. Chem.* 271, 3891–3896.
- Oyadomari, S., Mori, M., 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 11, 381–389.
- Paglinawan, R., Malipiero, U., Schlapbach, R., Frei, K., Reith, W., Fontana, A., 2003. TGFbeta directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. *Glia* 44, 219–231.
- Pahan, K., Jana, M., Liu, X., Taylor, B.S., Wood, C., Fischer, S.M., 2002. Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, inhibits the induction of nitric-oxide synthase in human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 45984–45991.
- Palmieri, C., Monteverde, M., Lattanzio, L., Gojis, O., Rudraraju, B., Fortunato, M., Syed, N., Thompson, A., Garrone, O., Merlano, M., et al., 2012. Site-specific CpG methylation in the CCAAT/enhancer binding protein delta (CEBPdelta) CpG island in breast cancer is associated with metastatic relapse. *Br. J. Cancer* 107, 732–738.
- Pan, H.C., Yang, C.N., Hung, Y.W., Lee, W.J., Tien, H.R., Shen, C.C., Sheehan, J., Chou, C.T., Sheu, M.L., 2013a. Reciprocal modulation of C/EBP-alpha and C/EBP-beta by IL-13 in activated microglia prevents neuronal death. *Eur. J. Immunol.* 43, 2854–2865.
- Pan, S., Zheng, Y., Zhao, R., Yang, X., 2013b. MicroRNA-130b and microRNA-374b mediate the effect of maternal dietary protein on offspring lipid metabolism in Meishan pigs. *Br. J. Nutr.* 109, 1731–1738.
- Papadia, S., Soriano, F.X., Leveille, F., Martel, M.A., Dakin, K.A., Hansen, H.H., Kaindl, A., Siffringer, M., Fowler, J., Stefovskaja, V., et al., 2008. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat. Neurosci.* 11, 476–487.
- Paquin, A., Barnabe-Heider, F., Kageyama, R., Miller, F.D., 2005. CCAAT/enhancer-binding protein phosphorylation biases cortical precursors to generate neurons rather than astrocytes in vivo. *J. Neurosci.* 25, 10747–10758.
- Parachikova, A., Agadjanyan, M.G., Cribbs, D.H., Blurton-Jones, M., Perreau, V., Rogers, J., Beach, T.G., Cotman, C.W., 2007. Inflammatory changes parallel the early stages of Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 28, 1821–1833.
- Park, Y.K., Park, H., 2012. Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) represses PPARGgamma2 gene through interacting with CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta). *Mol. Cells* 33, 575–581.
- Parkin, S.E., Baer, M., Copeland, T.D., Schwartz, R.C., Johnson, P.F., 2002. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) activator proteins by heterodimerization with C/EBPgamma (Ig/EBP). *J. Biol. Chem.* 277, 23563–23572.
- Paz-Priel, I., Friedman, A., 2011. C/EBPalpha dysregulation in AML and ALL. *Crit. Rev. Oncog.* 16, 93–102.
- Pedersen, T.A., Kowenz-Leutz, E., Leutz, A., Nerlov, C., 2001. Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev.* 15, 3208–3216.
- Pena-Altamira, E., Polazzi, E., Moretto, E., Lauriola, M., Monti, B., 2014. The transcription factor CCAAT enhancer-binding protein beta protects rat cerebellar granule neurons from apoptosis through its transcription-activating isoforms. *Eur. J. Neurosci.* 39, 176–185.
- Perez-Capote, K., Saura, J., Serratos, J., Sola, C., 2006. Expression of C/EBPalpha and C/EBPbeta in glial cells in vitro after inducing glial activation by different stimuli. *Neurosci. Lett.* 410, 25–30.
- Piwien Pilipuk, G., Galigniana, M.D., Schwartz, J., 2003. Subnuclear localization of C/EBP beta is regulated by growth hormone and dependent on MAPK. *J. Biol. Chem.* 278, 35668–35677.
- Pizarro-Cerda, J., Desjardins, M., Moreno, E., Akira, S., Gorvel, J.P., 1999. Modulation of endocytosis in nuclear factor IL-6(-/-) macrophages is responsible for a high susceptibility to intracellular bacterial infection. *J. Immunol.* 162, 3519–3526.



- Pless, O., Kowenz-Leutz, E., Knoblich, M., Lausen, J., Beyermann, M., Walsh, M.J., Leutz, A., 2008. G9a-mediated lysine methylation alters the function of CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *J. Biol. Chem.* 283, 26357–26363.
- Plevy, S.E., Gemberling, J.H., Hsu, S., Dornier, A.J., Smale, S.T., 1997. Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol. Cell Biol.* 17, 4572–4588.
- Podust, L.M., Krezel, A.M., Kim, Y., 2001. Crystal structure of the CCAAT box/enhancer-binding protein beta activating transcription factor-4 basic leucine zipper heterodimer in the absence of DNA. *J. Biol. Chem.* 276, 505–513.
- Poh, K.W., Yeo, J.F., Ong, W.Y., 2011. MicroRNA changes in the mouse prefrontal cortex after inflammatory pain. *Eur. J. Pain* 15 (801), e1–e12.
- Pomerance, M., Mockey, M., Young, J., Quillard, J., Blondeau, J.P., 2005. Expression, hormonal regulation, and subcellular localization of CCAAT/enhancer-binding protein-beta in rat and human thymocytes. *Thyroid* 15, 197–204.
- Porse, B.T., Pedersen, T.A., Xu, X., Lindberg, B., Wewer, U.M., Friis-Hansen, L., Nerlov, C., 2001. E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell* 107, 247–258.
- Qian, N.S., Liu, W.H., Lv, W.P., Xiang, X., Su, M., Raut, V., Chen, Y.L., Dong, J.H., 2013. Upregulated microRNA-92b regulates the differentiation and proliferation of EpCAM-positive fetal liver cells by targeting C/EBPs. *PLoS ONE* 8, e68004.
- Qiu, J., Yao, S., Hindmarch, C., Antunes, V., Paton, J., Murphy, D., 2007. Transcription factor expression in the hypothalamo-neurohypophysial system of the dehydrated rat: upregulation of gonadotrophin inducible transcription factor 1 mRNA is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. *J. Neurosci.* 27, 2196–2203.
- Qiu, X., Aiken, K.J., Chokas, A.L., Beachy, D.E., Nick, H.S., 2008. Distinct functions of CCAAT enhancer-binding protein isoforms in the regulation of manganese superoxide dismutase during interleukin-1beta stimulation. *J. Biol. Chem.* 283, 25774–25785.
- Rahman, S.M., Janssen, R.C., Choudhury, M., Baquero, K.C., Aikens, R.M., de la Houssaye, B.A., Friedman, J.E., 2012. CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) expression regulates dietary-induced inflammation in macrophages and adipose tissue in mice. *J. Biol. Chem.* 287, 34349–34360.
- Ramberg, V., Tracy, L.M., Samuelsson, M., Nilsson, L.N., Iverfeldt, K., 2011. The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) delta is differently regulated by fibrillar and oligomeric forms of the Alzheimer amyloid-beta peptide. *J. Neuroinflamm.* 8, 34.
- Ramji, D.P., Foka, P., 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 365, 561–575.
- Ramji, D.P., Vitelli, A., Tronche, F., Cortese, R., Ciliberto, G., 1993. The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP delta/NF-IL6 beta, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 21, 289–294.
- Ray, A., Ray, B.K., 1994a. Serum amyloid A gene expression under acute-phase conditions involves participation of inducible C/EBP-beta and C/EBP-delta and their activation by phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 14, 4324–4332.
- Ray, B.K., Ray, A., 1994b. Expression of the gene encoding alpha 1-acid glycoprotein in rabbit liver under acute-phase conditions involves induction and activation of beta and delta CCAAT/enhancer-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 222, 891–900.
- Reddy, K.V., Serio, K.J., Hodulic, C.R., Bigby, T.D., 2003. 5-lipoxygenase-activating protein gene expression. Key role of CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) in constitutive and tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced expression in THP-1 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 13810–13818.
- Ridder, D.A., Bulashevskaya, S., Chaitanya, G.V., Babu, P.P., Brors, B., Eils, R., Schneider, A., Schwaninger, M., 2009. Discovery of transcriptional programs in cerebral ischemia by in silico promoter analysis. *Brain Res.* 1272, 3–13.
- Rininger, A., DeJesus, C., Totten, A., Wayland, A., Halterman, M.W., 2012. MKP-1 antagonizes C/EBPbeta activity and lowers the apoptotic threshold after ischemic injury. *Cell Death Differ.* 19, 1634–1643.
- Robert, I., Sutter, A., Quirin-Stricker, C., 2002. Synergistic activation of the human choline acetyltransferase gene by c-Myb and C/EBPbeta. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 106, 124–135.
- Romagnoli, L., Wollebo, H.S., Deshmene, S.L., Mukerjee, R., Del Valle, L., Safak, M., Khalili, K., White, M.K., 2009. Modulation of JC virus transcription by C/EBPbeta. *Virus Res.* 146, 97–106.
- Ron, D., Habener, J.F., 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6, 439–453.
- Roos, A.B., Nord, M., 2012. The emerging role of C/EBPs in glucocorticoid signaling: lessons from the lung. *J. Endocrinol.* 212, 291–305.
- Ruffell, D., Mourikioti, F., Gambardella, A., Kirstetter, P., Lopez, R.G., Rosenthal, N., Nerlov, C., 2009. A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 17475–17480.
- Rui, W., Jin, Z., Zhe, G., Song, H., 2013. The methylation of C/EBP beta gene promoter and regulated by GATA-2 protein. *Mol. Biol. Rep.* 40, 797–801.
- Ruocco, M.R., Chen, X., Ambrosino, C., Dragonetti, E., Liu, W., Mallardo, M., De Falco, G., Palmieri, C., Franzoso, G., Quinto, I., et al., 1996. Regulation of HIV-1 long terminal repeats by interaction of C/EBP(NF-IL6) and NF-kappaB/Rel transcription factors. *J. Biol. Chem.* 271, 22479–22486.
- Saito, H., Shultz, L.D., Sinha, M., Papaconstantinou, J., 1999. Induction of the alpha(1)-antichymotrypsin gene in the brain associated with TGF-beta1 deficiency or systemic administration of endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 270–275.
- Samuelsson, M., Ramberg, V., Iverfeldt, K., 2008. Alzheimer amyloid-beta peptides block the activation of C/EBPbeta and C/EBPdelta in glial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 619–622.
- Sandhir, R., Berman, N.E., 2010. Age-dependent response of CCAAT/enhancer binding proteins following traumatic brain injury in mice. *Neurochem. Int.* 56, 188–193.
- Sarkar, T.R., Sharan, S., Wang, J., Pawar, S.A., Cantwell, C.A., Johnson, P.F., Morrison, D.K., Wang, J.M., Sterneck, E., 2012. Identification of a Src tyrosine kinase/SIAH2 E3 ubiquitin ligase pathway that regulates C/EBPdelta expression and contributes to transformation of breast tumor cells. *Mol. Cell Biol.* 32, 320–332.
- Saura, J., 2007. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J. Neuroinflamm.* 4, 26.
- Scrapanti, I., Romani, L., Musiani, P., Modesti, A., Fattori, E., Lazzaro, D., Sellitto, C., Scarpa, S., Bellavia, D., Lattanzio, G., et al., 1995. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J.* 14, 1932–1941.
- Schrem, H., Klempnauer, J., Borlak, J., 2004. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacol. Rev.* 56, 291–330.
- Schwanger, M., Petersen, N., Prinz, S., Sallmann, S., Neher, M., Spranger, M., 2000. Adenosine-induced expression of interleukin-6 in astrocytes through protein kinase A and NF-IL-6. *Glia* 31, 51–58.
- Schwartz, C., Beck, K., Mink, S., Schmolke, M., Budde, B., Wenning, D., Klempnauer, K.H., 2003. Recruitment of p300 by C/EBPbeta triggers phosphorylation of p300 and modulates coactivator activity. *EMBO J.* 22, 882–892.
- Schwartz, C., Catez, P., Rohr, O., Lecestre, D., Anis, D., Schaeffer, E., 2000. Functional interactions between C/EBP, Sp1, and COUP-TF regulate human immunodeficiency virus type 1 gene transcription in human brain cells. *J. Virol.* 74, 65–73.
- Schwind, L., Zimmer, A.D., Gotz, C., Montenarh, M., 2015. CK2 phosphorylation of C/EBPdelta regulates its transcription factor activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 61, 81–89.
- Serrat, N., Pereira-Lopes, S., Comalada, M., Lloberas, J., Celada, A., 2012. Deacetylation of C/EBPbeta is required for IL-4-induced arginase-1 expression in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 42, 3028–3037.
- Shandilya, J., Roberts, S.G., 2012. The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 391–400.
- Sheldon, K.E., Shandilya, H., Kepka-Lenhart, D., Poljakovic, M., Ghosh, A., Morris Jr., S.M., 2013. Shaping the murine macrophage phenotype: IL-4 and cyclic AMP synergistically activate the arginase 1 promoter. *J. Immunol.* 191, 2290–2298.
- Shen, F., Li, N., Gade, P., Kalvakolanu, D.V., Weibley, T., Doble, B., Woodgett, J.R., Wood, T.D., Gaffen, S.L., 2009. IL-17 receptor signaling inhibits C/EBPbeta by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. *Sci. Signal.* 2, ra8.
- Shin, C.S., Jeon, M.J., Yang, J.Y., Her, S.J., Kim, D., Kim, S.W., Kim, S.Y., 2006. CCAAT/enhancer-binding protein delta activates the Runx2-dependent transcription of mouse osteocalcin II promoter. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 531–546.
- Shoji, T., Higuchi, H., Nishijima, K.L., Iijima, S., 2014. Effects of Siglec on the expression of IL-10 in the macrophage cell line RAW264. *Cytotechnology* 67, 633–639.
- Shuman, J.D., Sebastian, T., Kaldis, P., Copeland, T.D., Zhu, S., Smart, R.C., Johnson, P.F., 2004. Cell cycle-dependent phosphorylation of C/EBPbeta mediates oncogenic cooperativity between C/EBPbeta and H-RasV12. *Mol. Cell Biol.* 24, 7380–7391.
- Si, J., Yu, X., Zhang, Y., DeWille, J.W., 2010. Myc interacts with Max and Miz1 to repress C/EBPdelta promoter activity and gene expression. *Mol. Cancer* 9, 92.
- Sivko, G.S., Sanford, D.C., Dearth, L.D., Tang, D., DeWille, J.W., 2004. CCAAT/Enhancer binding protein delta (C/EBPdelta) regulation and expression in human mammary epithelial cells: II. Analysis of activating signal transduction pathways, transcriptional, post-transcriptional, and post-translational control. *J. Cell Biochem.* 93, 844–856.
- Sleptsov, A.A., Nazarenko, M.S., Lebedev, I.N., Skryabin, N.A., Frolov, A.V., Popov, V.A., Barbarash, O.L., Barbarash, L.S., Puzryev, V.P., 2014. Somatic genome variations in vascular tissues and peripheral blood leukocytes in patients with atherosclerosis. *Russ. J. Genet.* 50, 986–995.
- Smink, J.J., Begay, V., Schoenmaker, T., Sterneck, E., de Vries, T.J., Leutz, A., 2009. Transcription factor C/EBPbeta isoform ratio regulates osteoclastogenesis through MafB. *EMBO J.* 28, 1769–1781.
- Smink, J.J., Tunn, P.U., Leutz, A., 2012. Rapamycin inhibits osteoclast formation in giant cell tumor of bone through the C/EBPbeta–MafB axis. *J. Mol. Med. (Berl)* 90, 25–30.
- Smith, A.M., Gibbons, H.M., Oldfield, R.L., Bergin, P.M., Mee, E.W., Curtis, M.A., Faulk, R.L., Dragunow, M., 2013. M-CSF increases proliferation and phagocytosis while modulating receptor and transcription factor expression in adult human microglia. *J. Neuroinflamm.* 10, 85.
- Soga, Y., Yamanaka, R., Nishino, K., Tanaka, R., 2003. CCAAT/enhancer binding proteins are expressed in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurosci. Lett.* 337, 106–110.
- Stein, B., Cogswell, P.C., Baldwin Jr., A.S., 1993. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol. Cell Biol.* 13, 3964–3974.
- Steinmann, S., Coulibaly, A., Ohnheiser, J., Jakobs, A., Klempnauer, K.H., 2013. Interaction and cooperation of the CCAAT-box enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) with the homeodomain-interacting protein kinase 2 (Hipk2). *J. Biol. Chem.* 288, 22257–22269.



- Steinmann, S., Schulte, K., Beck, K., Chachra, S., Bujnicki, T., Klempnauer, K.H., 2009. v-Myc inhibits C/EBPbeta activity by preventing C/EBPbeta-induced phosphorylation of the co-activator p300. *Oncogene* 28, 2446–2455.
- Stephanou, A., Okosi, A., Knight, R.A., Chowdhry, H.S., Latchman, D.S., 1997. C/EBP activates the human corticotropin-releasing hormone gene promoter. *Mol. Cell Endocrinol.* 134, 41–50.
- Sterneck, E., Johnson, P.F., 1998. CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. *J. Neurochem.* 70, 2424–2433.
- Sterneck, E., Paylor, R., Jackson-Lewis, V., Libbey, M., Przedborski, S., Tessarollo, L., Crawley, J.N., Johnson, P.F., 1998. Selectively enhanced contextual fear conditioning in mice lacking the transcriptional regulator CCAAT/enhancer binding protein delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10908–10913.
- Sterneck, E., Tessarollo, L., Johnson, P.F., 1997. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev.* 11, 2153–2162.
- Sterneck, E., Zhu, S., Ramirez, A., Jorcano, J.L., Smart, R.C., 2006. Conditional ablation of C/EBP beta demonstrates its keratinocyte-specific requirement for cell survival and mouse skin tumorigenesis. *Oncogene* 25, 1272–1276.
- Straccia, M., Dentesano, G., Valente, T., Pulido-Salgado, M., Sola, C., Saura, J., 2013. CCAAT/enhancer binding protein beta regulates prostaglandin E synthase expression and prostaglandin E2 production in activated microglial cells. *Glia* 61, 1607–1619.
- Straccia, M., Gresa-Arribas, N., Dentesano, G., Ejarque-Ortiz, A., Tusell, J.M., Serratos, J., Sola, C., Saura, J., 2011. Pro-inflammatory gene expression and neurotoxic effects of activated microglia are attenuated by absence of CCAAT/enhancer binding protein beta. *J. Neuroinflamm.* 8, 156.
- Strohmeier, R., Shelton, J., Loughheed, C., Breitkopf, T., 2014. CCAAT-Enhancer Binding Protein-beta Expression and Elevation in Alzheimer's Disease and Microglial Cell Cultures. *PLoS ONE* 9, e86617.
- Suh, H.C., Gooya, J., Renn, K., Friedman, A.D., Johnson, P.F., Keller, J.R., 2006. C/EBPalpha determines hematopoietic cell fate in multipotential progenitor cells by inhibiting erythroid differentiation and inducing myeloid differentiation. *Blood* 107, 4308–4316.
- Sun, W., Choi, S.H., Park, S.K., Kim, S.J., Noh, M.R., Kim, E.H., Kim, H.J., Kim, H., 2007. Identification and characterization of novel activity-dependent transcription factors in rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 100, 269–278.
- Sun, Y., Jia, L., Williams, M.T., Zamzow, M., Ran, H., Quinn, B., Aronow, B.J., Vorhees, C.V., Witte, D.P., Grabowski, G.A., 2008. Temporal gene expression profiling reveals CEBPD as a candidate regulator of brain disease in prosaposin deficient mice. *BMC Neurosci.* 9, 76.
- Susperreguy, S., Prendes, L.P., Desbats, M.A., Charo, N.L., Brown, K., MacDougald, O.A., Kerppola, T., Schwartz, J., Piwien-Philipuk, G., 2011. Visualization by BiFC of different C/EBPbeta dimers and their interaction with HP1alpha reveals a differential subnuclear distribution of complexes in living cells. *Exp. Cell Res.* 317, 706–723.
- Svotelis, A., Doyon, G., Bernatchez, G., Desilets, A., Rivard, N., Asselin, C., 2005. IL-1 beta-dependent regulation of C/EBP delta transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 461–470.
- Tabas, I., Ron, D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 184–190.
- Tahirov, T.H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., et al., 2002. Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell* 108, 57–70.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., 1995. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80, 353–361.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S., 1997. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16, 7432–7443.
- Tang, D., Sivko, G.S., DeWille, J.W., 2006a. Promoter methylation reduces C/EBPdelta (CEBPD) gene expression in the SUM-52PE human breast cancer cell line and in primary breast tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 95, 161–170.
- Tang, Q.Q., Gronborg, M., Huang, H., Kim, J.W., Otto, T.C., Pandey, A., Lane, M.D., 2005. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9766–9771.
- Tang, Q.Q., Lane, M.D., 1999. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* 13, 2231–2241.
- Tang, Y., Pacary, E., Freret, T., Divoux, D., Petit, E., Schumann-Bard, P., Bernardin, M., 2006b. Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidates for stroke. *Neurobiol. Dis.* 21, 18–28.
- Taubenfeld, S.M., Milekic, M.H., Monti, B., Alberini, C.M., 2001a. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat. Neurosci.* 4, 813–818.
- Taubenfeld, S.M., Wiig, K.A., Monti, B., Dolan, B., Pollonini, G., Alberini, C.M., 2001b. Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *J. Neurosci.* 21, 84–91.
- Tavor, S., Vuong, P.T., Park, D.J., Gombart, A.F., Cohen, A.H., Koeffler, H.P., 2002. Macrophage functional maturation and cytokine production are impaired in C/EBP epsilon-deficient mice. *Blood* 99, 1794–1801.
- Timchenko, L.T., Iakova, P., Welm, A.L., Cai, Z.J., Timchenko, N.A., 2002. Calreticulin interacts with C/EBPalpha and C/EBPbeta mRNAs and represses translation of C/EBP proteins. *Mol. Cell Biol.* 22, 7242–7257.
- Timchenko, L.T., Salisbury, E., Wang, G.L., Nguyen, H., Albrecht, J.H., Hershey, J.W., Timchenko, N.A., 2006. Age-specific CUGBP1-eIF2 complex increases translation of CCAAT/enhancer-binding protein beta in old liver. *J. Biol. Chem.* 281, 32806–32819.
- Tong, Y., Zhou, J., Mizutani, J., Fukuoka, H., Ren, S.G., Gutierrez-Hartmann, A., Koeffler, H.P., Melmed, S., 2011. CEBPD suppresses prolactin expression and prolactinoma cell proliferation. *Mol. Endocrinol.* 25, 1880–1891.
- Trautwein, C., Caelles, C., van der Geer, P., Hunter, T., Karin, M., Chojkier, M., 1993. Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature* 364, 544–547.
- Trautwein, C., van der Geer, P., Karin, M., Hunter, T., Chojkier, M., 1994. Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements. *J. Clin. Invest.* 93, 2554–2561.
- Tsai, V.W., Mohammad, M.G., Tolhurst, O., Breit, S.N., Sawchenko, P.E., Brown, D.A., 2011. CCAAT/enhancer binding protein-delta expression by dendritic cells regulates CNS autoimmune inflammatory disease. *J. Neurosci.* 31, 17612–17621.
- Tsukada, J., Saito, K., Waterman, W.R., Webb, A.C., Auron, P.E., 1994. Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Mol. Cell Biol.* 14, 7285–7297.
- Tsukada, J., Yoshida, Y., Kominato, Y., Auron, P.E., 2011. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* 54, 6–19.
- Tureyan, K., Kapadia, R., Bowen, K.K., Satriotomo, I., Liang, J., Feinstein, D.L., Vemuganti, R., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J. Neurochem.* 101, 41–56.
- Turgeon, N., Valiquette, C., Blais, M., Routhier, S., Seidman, E.G., Asselin, C., 2008. Regulation of C/EBPdelta-dependent transactivation by histone deacetylases in intestinal epithelial cells. *J. Cell Biochem.* 103, 1573–1583.
- Uematsu, S., Kaisho, T., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yamakami, M., Omori, H., Yamamoto, M., Yoshimori, T., Akira, S., 2007. The C/EBP beta isoform 34-kDa LAP is responsible for NF-IL-6-mediated gene induction in activated macrophages, but is not essential for intracellular bacteria killing. *J. Immunol.* 179, 5378–5386.
- Uematsu, S., Matsumoto, M., Takeda, K., Akira, S., 2002. Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J. Immunol.* 168, 5811–5816.
- Ugarte, G.D., Diaz, E., Biscaya, M., Stehberg, J., Montecino, M., van Zundert, B., 2013. Transcription of the pain-related TRPV1 gene requires Runx1 and C/EBPbeta factors. *J. Cell Physiol.* 228, 860–870.
- Ugarte, G.D., Opazo, T., Leisewitz, F., van Zundert, B., Montecino, M., 2012. Runx1 and C/EBPbeta transcription factors directly up-regulate P2X3 gene transcription. *J. Cell Physiol.* 227, 1645–1652.
- Uittenbogaard, M., Martinka, D.L., Johnson, P.F., Vinson, C., Chiaramello, A., 2007. 5'UTR of the neurogenic bHLH Nex1/MATH-2/NeuroD6 gene is regulated by two distinct promoters through CRE and C/EBP binding sites. *J. Neurosci. Res.* 85, 1–18.
- Valente, T., Mancera, P., Tusell, J.M., Serratos, J., Saura, J., 2012. C/EBPbeta expression in activated microglia in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* 33, 2186–2199.
- Valente, T., Straccia, M., Gresa-Arribas, N., Dentesano, G., Tusell, J.M., Serratos, J., Mancera, P., Sola, C., Saura, J., 2013. CCAAT/enhancer binding protein delta regulates glial proinflammatory gene expression. *Neurobiol. Aging* 34, 2110–2124.
- von Gertten, C., Flores Morales, A., Holmin, S., Mathiesen, T., Nordqvist, A.C., 2005. Genomic responses in rat cerebral cortex after traumatic brain injury. *BMC Neurosci.* 6, 69.
- Vu, D., Huang, D.B., Vemu, A., Ghosh, G., 2013. A structural basis for selective dimerization by NF-kappaB RelB. *J. Mol. Biol.* 425, 1934–1945.
- Walker, D.G., Link, J., Lue, L.F., Dalsing-Hernandez, J.E., Boyes, B.E., 2006. Gene expression changes by amyloid beta peptide-stimulated human postmortem brain microglia identify activation of multiple inflammatory processes. *J. Leukoc. Biol.* 79, 596–610.
- Walton, M., Saura, J., Young, D., MacCibbon, G., Hansen, W., Lawlor, P., Siriramanne, E., Gluckman, P., Dragunow, M., 1998. CCAAT-enhancer binding protein alpha is expressed in activated microglial cells after brain injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 61, 11–22.
- Wang, H., Iakova, P., Wilde, M., Welm, A., Goode, T., Roesler, W.J., Timchenko, N.A., 2001. C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol. Cell* 8, 817–828.
- Wang, H., Larris, B., Peiris, T.H., Zhang, L., Le Lay, J., Gao, Y., Greenbaum, L.E., 2007. C/EBPbeta activates E2F-regulated genes in vivo via recruitment of the coactivator CREB-binding protein/P300. *J. Biol. Chem.* 282, 24679–24688.
- Wang, H., Nagai, A., Sheikh, A.M., Liang, X.Y., Yano, S., Mitaki, S., Ishibashi, Y., Kobayashi, S., Kim, S.U., Yamaguchi, S., 2013a. Human mesenchymal stem cell transplantation changes proinflammatory gene expression through a nuclear



- factor-kappaB-dependent pathway in a rat focal cerebral ischemic model. *J. Neurosci. Res.* 91, 1440–1449.
- Wang, J., Sarkar, T.R., Zhou, M., Sharan, S., Ritt, D.A., Veenstra, T.D., Morrison, D.K., Huang, A.M., Sternneck, E., 2010. CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta, CEBPD)-mediated nuclear import of FANCD2 by IPO4 augments cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16131–16136.
- Wang, J.M., Ko, C.Y., Chen, L.C., Wang, W.L., Chang, W.C., 2006. Functional role of NF-IL6beta and its sumoylation and acetylation modifications in promoter activation of cyclooxygenase 2 gene. *Nucleic Acids Res.* 34, 217–231.
- Wang, N.D., Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S.V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., Darlington, G.J., 1995. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108–1112.
- Wang, S.M., Lee, Y.C., Ko, C.Y., Lai, M.D., Lin, D.Y., Pao, P.C., Chi, J.Y., Hsiao, Y.W., Liu, T.L., Wang, J.M., 2014. Increase of zinc finger protein 179 in response to CCAAT/enhancer binding protein delta conferring an antiapoptotic effect in astrocytes of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 51, 370–382.
- Wang, W.L., Lee, Y.C., Yang, W.M., Chang, W.C., Wang, J.M., 2008. Sumoylation of LAP1 is involved in the HDAC4-mediated repression of COX-2 transcription. *Nucleic Acids Res.* 36, 6066–6079.
- Wang, X., Zhao, Y., Zhang, X., Badie, H., Zhou, Y., Mu, Y., Loo, L.S., Cai, L., Thompson, R.C., Yang, B., et al., 2013b. Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate receptor recycling in Down's syndrome. *Nat. Med.* 19, 473–480.
- Waterman, W.R., Xu, L.L., Tetradis, S., Motyckova, G., Tsukada, J., Saito, K., Webb, A.C., Robinson, D.R., Auron, P.E., 2006. Glucocorticoid inhibits the human pro-interleukin beta gene (IL6) by decreasing DNA binding of transactivators to the signal-responsive enhancer. *Mol. Immunol.* 43, 773–782.
- Wegner, M., Cao, Z., Rosenfeld, M.G., 1992. Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta. *Science* 256, 370–373.
- Wethkamp, N., Klempner, K.H., 2009. Daxx is a transcriptional repressor of CCAAT/enhancer-binding protein beta. *J. Biol. Chem.* 284, 28783–28794.
- Wethmar, K., Begay, V., Smink, J.J., Zaragoza, K., Wiesenthal, V., Dorken, B., Calkhoven, C.F., Leutz, A., 2010. C/EBPbetaDeltauORF mice—a genetic model for uORF-mediated translational control in mammals. *Genes Dev.* 24, 15–20.
- Williams, S.C., Angerer, N.D., Johnson, P.F., 1997. C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. *Gene Expr.* 6, 371–385.
- Wingender, E., Schoeps, T., Haubrock, M., Donitz, J., 2015. TFclass: a classification of human transcription factors and their rodent orthologs. *Nucleic Acids Res.* 43, D97–D102.
- Wiper-Bergeron, N., Salem, H.A., Tomlinson, J.J., Wu, D., Hache, R.J., 2007. Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2703–2708.
- Wiper-Bergeron, N., Wu, D., Pope, L., Schild-Poulter, C., Hache, R.J., 2003. Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *EMBO J.* 22, 2135–2145.
- Wood, S., Schertzer, M., Yaremkov, M.L., 1995. Sequence identity locates CEBPD and FGFR1 to mapped human loci within proximal 8p. *Cytogenet. Cell Genet.* 70, 188–191.
- Worm, J., Stenvang, J., Petri, A., Frederiksen, K.S., Obad, S., Elmen, J., Hedtjarn, M., Straarup, E.M., Hansen, J.B., Kauppinen, S., 2009. Silencing of microRNA-155 in mice during acute inflammatory response leads to derepression of c/ebp Beta and down-regulation of G-CSF. *Nucleic Acids Res.* 37, 5784–5792.
- Xie, H., Ye, M., Feng, R., Graf, T., 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117, 663–676.
- Xu, M., Nie, L., Kim, S.H., Sun, X.H., 2003. STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *EMBO J.* 22, 893–904.
- Yamada, T., Tobita, K., Osada, S., Nishihara, T., Imagawa, M., 1997. CCAAT/enhancer-binding protein delta gene expression is mediated by APRF/STAT3. *J. Biochem.* 121, 731–738.
- Yamada, T., Tsuchiya, T., Osada, S., Nishihara, T., Imagawa, M., 1998. CCAAT/enhancer-binding protein delta gene expression is mediated by autoregulation through downstream binding sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 88–92.
- Yamanaka, R., Kim, G.D., Radomska, H.S., Lektrom-Himes, J., Smith, L.T., Antonson, P., Tenen, D.G., Xanthopoulos, K.G., 1997. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 6462–6467.
- Yan, C., Johnson, P.F., Tang, H., Ye, Y., Wu, M., Gao, H., 2013. CCAAT/enhancer-binding protein delta is a critical mediator of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Am. J. Pathol.* 182, 420–430.
- Yan, C., Wang, X., Cao, J., Wu, M., Gao, H., 2012a. CCAAT/enhancer-binding protein gamma is a critical regulator of IL-1beta-induced IL-6 production in alveolar epithelial cells. *PLoS ONE* 7, e35492.
- Yan, C., Wu, M., Cao, J., Tang, H., Zhu, M., Johnson, P.F., Gao, H., 2012b. Critical role for CCAAT/enhancer-binding protein beta in immune complex-induced acute lung injury. *J. Immunol.* 189, 1480–1490.
- Yang, Y., Pares-Matos, E.L., Tesmer, V.M., Dai, C., Ashworth, S., Huai, B., Bina, M., 2002. Organization of the promoter region of the human NF-IL6 gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1577, 102–108.
- Yang, Z., Quigley, H.A., Pease, M.E., Yang, Y., Qian, J., Valenta, D., Zack, D.J., 2007. Changes in gene expression in experimental glaucoma and optic nerve transection: the equilibrium between protective and detrimental mechanisms. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 5539–5548.
- Yano, S., Fukunaga, K., Takiguchi, M., Ushio, Y., Mori, M., Miyamoto, E., 1996. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein family members by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 23520–23527.
- Ye, S., Xu, H., Jin, J., Yang, M., Wang, C., Yu, Y., Cao, X., 2012. The E3 ubiquitin ligase neuregulin receptor degradation protein 1 (Nrdp1) promotes M2 macrophage polarization by ubiquitinating and activating transcription factor CCAAT/enhancer-binding Protein beta (C/EBPbeta). *J. Biol. Chem.* 287, 26740–26748.
- Yefet, K., Mehrav, M., Kuulmann-Vander, S., Elkobi, A., Belevovsky, K., Jacobson-Pick, S., Meiri, N., Rosenblum, K., 2006. Different signal transduction cascades are activated simultaneously in the rat insular cortex and hippocampus following novel taste learning. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1434–1442.
- Yin, M., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Lane, M.D., Chatterjee, S., Diehl, A.M., 1996. Tumor necrosis factor alpha promotes nuclear localization of cytokine-inducible CCAAT/enhancer binding protein isoforms in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 17974–17978.
- Yukawa, K., Tanaka, T., Toyomi, A., Tsuji, S., Akira, S., Iso, H., 2000. Impaired water-maze performance in mice lacking transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein. *Neurosci. Res. Commun.* 26, 59–67.
- Yukawa, K., Tanaka, T., Tsuji, S., Akira, S., 1998. Expressions of CCAAT/Enhancer-binding proteins beta and delta and their activities are intensified by cAMP signaling as well as Ca2+/calmodulin kinases activation in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 273, 31345–31351.
- Zahnow, C.A., 2009. CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev. Mol. Med.* 11, e12.
- Zannetti, C., Bonnay, F., Takeshita, F., Parroche, P., Menetrier-Caux, C., Tommasino, M., Hasan, U.A., 2010. C/EBP(delta) and STAT-1 are required for TLR8 transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 285, 34773–34780.
- Zhang, G., Jin, B., Li, Y.P., 2011a. C/EBPbeta mediates tumour-induced ubiquitin ligase atrogin1/MAFBx upregulation and muscle wasting. *EMBO J.* 30, 4323–4335.
- Zhang, H., Nguyen-Jackson, H., Panopoulos, A.D., Li, H.S., Murray, P.J., Watowich, S.S., 2010. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood* 116, 2462–2471.
- Zhang, J., Li, Y., Shan, K., Wang, L., Qiu, W., Lu, Y., Zhao, D., Zhu, G., He, F., Wang, Y., 2014. Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF-beta1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBPbeta acetylation. *FASEB J.* 28, 1511–1525.
- Zhang, J.W., Klemm, D.J., Vinson, C., Lane, M.D., 2004. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 4471–4478.
- Zhang, K., Guo, W., Yang, Y., Wu, J., 2011b. JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBPbeta transcription. *J. Cell Biochem.* 112, 488–497.
- Zhang, Y., Liu, J., Yao, S., Li, F., Xin, L., Lai, M., Bracchi-Ricard, V., Xu, H., Yen, W., Meng, W., et al., 2012a. Nuclear factor kappa B signaling initiates early differentiation of neural stem cells. *Stem Cells* 30, 510–524.
- Zhang, Y., Sif, S., DeWille, J., 2007. The mouse C/EBPdelta gene promoter is regulated by STAT3 and Sp1 transcriptional activators, chromatin remodeling and c-Myc repression. *J. Cell Biochem.* 102, 1256–1270.
- Zhang, Y.Y., Li, S.F., Qian, S.W., Zhang, Y.Y., Liu, Y., Tang, Q.Q., Li, X., 2012b. Phosphorylation prevents C/EBPbeta from the calpain-dependent degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419, 550–555.
- Zhao, X., Zhuang, S., Chen, Y., Boss, G.R., Pilz, R.B., 2005. Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates CCAAT/enhancer-binding protein beta functions through inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* 280, 32683–32692.
- Zhou, S., Dewille, J.W., 2007. Proteasome-mediated CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) degradation is ubiquitin-independent. *Biochem. J.* 405, 341–349.
- Zhou, S., Si, J., Liu, T., DeWille, J.W., 2008. PIASy represses CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) transcriptional activity by sequestering C/EBPdelta to the nuclear periphery. *J. Biol. Chem.* 283, 20137–20148.
- Zhu, L., Yang, T., Li, L., Sun, L., Hou, Y., Hu, X., Zhang, L., Tian, H., Zhao, Q., Peng, J., et al., 2014. TSCI controls macrophage polarization to prevent inflammatory disease. *Nat. Commun.* 5, 4696.
- Zuckerkindl, E., Pauling, L., 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson, V., Vogel, H.J. (Eds.), *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York, NY, pp. 97–166.





CCAAT/Enhancer Binding Protein β Regulates Prostaglandin E Synthase Expression and Prostaglandin E₂ Production in Activated Microglial Cells

Marco Straccia,^{1,2} Guido Dentesano,² Tony Valente,¹ Marta Pulido-Salgado,¹ Carme Solà,² and Josep Saura¹

The eicosanoid prostaglandin E₂ (PGE₂) plays important roles in neuroinflammation and it is produced by the sequential action of the enzymes cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E synthase (PTGES). The expression of both enzymes and the production of PGE₂ are increased in neuroinflammation. The objective of this study was to elucidate whether the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) regulates the expression of prostaglandin synthesis enzymes in neuroinflammation. To this aim, the expression of these enzymes in wild-type and C/EBP β -null mice was analyzed *in vitro* and *in vivo*. In mixed glial cultures, lipopolysaccharide (LPS) \pm interferon γ (IFN- γ) induced C/EBP β binding to COX-2 and PTGES promoters. LPS \pm IFN- γ -induced increases in PTGES expression and in PGE₂ production in mixed glial and microglial cultures were abrogated in the absence of C/EBP β . Also, increased brain PTGES expression induced by systemic LPS administration was markedly reduced in C/EBP β -null mice. In contrast to PTGES, the induction of COX-2 expression *in vitro* or *in vivo* was not markedly affected by the absence of C/EBP β . These results demonstrate that C/EBP β regulates PTGES expression and PGE₂ production by activated microglial cells *in vitro* and point to C/EBP β as a regulator of PTGES expression *in vivo* in the inflamed central nervous system. Altogether, these findings strengthen the proposed role of C/EBP β as a key player in the orchestration of neuroinflammatory gene response.

GLIA 2013;61:1607–1619

Key Words: microglia, C/EBP, prostaglandin E₂, PTGES, COX-2, glial activation, neuroinflammation

Introduction

Prostaglandin E₂ (PGE₂) is an important bioactive lipid with pleiotropic effects in the central nervous system (CNS) through a paracrine action on neurons (Li et al., 2008), glial cells (Chaudhry et al., 2008; Levi et al., 1998), and smooth muscle cells of brain blood vessels (Baenziger et al., 1979; Whalley et al., 1989). The homeostatic PGE₂ level is usually low and it is mainly maintained by the sequential action of the ubiquitous enzymes prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (PTGS1, also known as COX-1), prostaglandin E synthase 2 (PTGES2, also known as mPGES-2), and PTGES3 (also known as cPGES) (Tanioka et al., 2000). Microglial cells

express PTGES2 and PTGES3 in normal conditions (de Oliveira et al., 2008), but in neuroinflammation they become the main PGE₂ producers through the upregulation of cyclooxygenase-1 (COX-1)/COX-2 and PTGES (also known as mPGES-1) enzymes (Choi et al., 2009; Ikeda-Matsuo et al., 2010; Tomimoto et al., 2000). Once released, PGE₂ can interact with four G-coupled receptors, named E Prostanoids receptors (EP1–4), each of them having a distinct structure (Narumiya et al., 1999), function, expression, and distribution in the brain (Andreasson, 2010; Cimino et al., 2008).

PGE₂ paracrine action is dual and the response can be anti- or proinflammatory (Milatovic et al., 2011). There is a

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/glia.22542

Published online Jul 25, 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). Received Mar 6, 2012, Accepted for publication May 21, 2013.

Address correspondence to Josep Saura, University of Barcelona, School of Medicine, Biochemistry and Molecular Biology Unit, IDIBAPS, Barcelona, Spain. E-mail: josepsaura@ub.edu

From the ¹Biochemistry and Molecular Biology Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain; ²IIBB-CSIC-IDIBAPS, Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Barcelona, Spain.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.



strong interest in finding strategies to promote the neuroprotective effects and to attenuate the neurotoxicity of PGE₂ in neuroinflammation (Andreasson, 2010). Epidemiological studies strongly suggest a possible neuroprotective effect of COXs inhibition (Vlad et al., 2008) but recent data seem to refute this hypothesis (Driver et al., 2011). However, it is important to take into account that COX-2 activity results in the production of PGH₂ which is the precursor of not only PGE₂, but also PGD₂, PGE, PGI₂, and Tromboxanes, whereas the sole product of PTGES activity is PGE₂. In this view, it is conceivable that the negative outcomes of COX-2 inhibition (Cheng et al., 2006) could be caused by altered levels of the other prostanoids. Hence, PTGES is a more selective target to inhibit PGE₂ during inflammation. We have been, therefore, interested to study the expression of the two inducible enzymes in the PGE₂ pathway, COX-2 and PTGES, in glial activation and in particular the possible involvement of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β).

C/EBP β is a b-zip transcription factor that is expressed in activated astrocytes and microglia (Ejarque-Ortiz et al., 2007). We and others have demonstrated that C/EBP β plays a key role in the regulation of proinflammatory genes in glial activation (Cortes-Canteli et al., 2008; Straccia et al., 2011). Interestingly, C/EBP β deficiency provides neuroprotection following ischemic (Kapadia et al., 2006) or excitotoxic injuries (Cortes-Canteli et al., 2008), two models where COX-2 inhibition has shown to be beneficial (Ikeda-Matsuo et al., 2010; Nakayama et al., 1998). We have undertaken this study to analyze whether COX-2 and PTGES gene expressions are regulated by C/EBP β in glial activation. We show for the first time that C/EBP β plays a key role in PGE₂ production in microglia. We clearly demonstrate a PGE₂ reduction in C/EBP β -null glial cultures that is mainly due to the decreased levels of PTGES and how this enzyme is under the transcriptional control of C/EBP β in *in vitro* and *in vivo* models

Materials and Methods

Animals

A colony of C/EBP β +/- (Screpanti et al., 1995) mice on a C57BL/6-129S6/SvEv background was maintained. Animals from this colony showed no serological evidence of pathological infection. The animals were group-housed (five to six) in solid floor cages and received a commercial pelleted diet and water *ad libitum*. Experiments were carried out in accordance with the Guidelines of the European Union Council (86/609/EU) and following the Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) for the use of laboratory animals, and were approved by the Ethics and Scientific Committees from the University of Barcelona and Hospital Clínic (procedures 198/09 and 124/10).

DNA Extraction and Genotyping

Genomic DNA was isolated from 2 mg of liver samples using Extract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich, XNAT2) by

following kit's instructions. PCR amplification was performed as described previously (Straccia et al., 2011).

Cortical Mixed Glial Culture from a Single Embryo

C/EBP β +/- mice were crossed and pregnant females were sacrificed at 19th day of gestation by cervical dislocation. Embryos (E19) were surgically extracted from the peritoneal cavity. Their livers were dissected and used for genotyping, whereas their brains were dissected and processed to prepare primary mixed glial cultures as described previously (Straccia et al., 2011).

Mouse Mixed Glial Subculture

Each flask was washed in serum-free medium and was digested with 0.25% of trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution for 5 min at 37°C. Trypsinization was stopped by adding an equal volume of culture medium with 10% of fetal bovine serum. Cells were pelleted (7 min, 180 g), resuspended in 1-mL culture medium, and brought to a single-cell suspension by repeated pipetting. Cells were seeded at 166,000 cells/mL. Cultures were used at 12 \pm 3 DIV. Astrocytes were the most abundant cell type and microglial cells were approximately 20–25%.

Microglial Culture

Microglial cultures were prepared by mild trypsinization from mouse mixed glial culture as described previously (Saura et al., 2003). Briefly, 19–21 DIV-mixed glial subcultures were treated for 30 min with 0.06% of trypsin in the presence of 0.25 mM of EDTA and 0.5 mM of Ca²⁺. This resulted in the detachment of an intact layer of cells containing virtually all the astrocytes, leaving a population of firmly attached cells identified as >98% of microglia.

In Vivo Treatments

Male C/EBP β -null mice (Screpanti et al., 1995) and their wild-type (14–16 weeks, 20–25 g) littermates were used. Mice (five to six/group) were injected intraperitoneally (i.p.) with 100 μ g of lipopolysaccharide (LPS) per mouse dissolved in 100 μ L of NaCl (0.9%). Controls received the same volume of vehicle. Animals were anesthetized and sacrificed by decapitation for 2, 6, 16, or 24 h after treatment. From every animal, cerebral cortex was dissected, quickly removed, and frozen with dry ice. The isolation of RNA was performed as indicated below.

In Vitro Treatments

Culture medium was replaced 24 h prior to treatment. Mixed glial or microglial-enriched cultures were treated with 100 ng/mL of LPS (Sigma-Aldrich, L-2654, *Escherichia coli* serotype 026:B6) \pm 0.1 ng/mL of recombinant mouse interferon γ (IFN- γ) (Sigma-Aldrich, I4777), both prepared from 10 \times solutions.

Total Protein Extraction

Protein levels were determined in primary mixed glial or microglial cultures 16 h after treatments. For isolation of total proteins, two wells from six-well plates (mixed glial) or one T25 flask (microglial) were used per condition. After a cold PBS wash, cells were scrapped and recovered in 100 μ L per well or 50 μ L per flask of RIPA buffer



TABLE 1: The qPCR Primers Used for mRNA Amplification and for qChIP

Assay	Target gene	Accession	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
qPCR	PTGES	NM_022415.3	AggCCAgATgAggCTgCggA	AgCgAAggCgTgggTTCAgC
	COX-2	NM_011198.3	TgCAGAATTgAAAgCCCTCT	CCCCAAAgATAgCATCTggA
	HPRT1	NM_013556.2	ATCATTATgCCgAggATTTgg	gCAAAGAACTTATAgCCCCC
	β -Actin	NM_007393.3	CAACgAgCggTTCCgATg	gCCACAggATTCATACCCA
	Rn18s	NR_003286.2	gTAACCCgTTgAACCCCAT	CCATCCAATCggTAgTAgCg
Assay	Target gene	BOX	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
qChIP	PTGES	P 1	AACAATggTCCTgAgCCAAg	AAgTCCTgAgTAggCggTCA
		P 2	TAACAaggCCAggCTgTACT	ggTTTTgTTCTgCCATgTgA
		P 3	gCATggCTgTCCCTCTACAT	TTTTCTgAggCTCTggTCCAT
	COX-2	C 1	CggCTTCCTTCgTCTCTCAT	ACAACCTggCTgCTAATgggg
		C 2	TCTTgATTTggTTTgggACAg	AgACCTggAggACAAGgCA
		C 3	gAACTgACTgCTATCAAATgCAC	ACATgCTgggCTTgAAgACT

(1% Igepal CA-630, 5 mg/mL sodium deoxycholate, 1 mg/mL sodium dodecyl phosphate [SDS], and protease inhibitor cocktail Complete[®] in PBS). The content of the wells was pooled, sonicated, centrifuged for 5 min at 10,400g, and stored at -20°C. Protein concentration was determined by the Lowry assay.

Western Blot

Thirty micrograms of denatured (2.5 mM dithiothreitol, 100°C for 5 min) total protein extracts were subjected to 10 or 15% of SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane (Millipore, IPVH00010) for 90 min at 1 mA/cm² as described previously (Straccia et al., 2011). For a sharp resolution of COX-2 and PTGES protein bands, 10 and 15% SDS PAGE gels were used, respectively. Membranes were incubated with the following primary antibodies: polyclonal rabbit anti-COX-2 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, sc-1747), polyclonal rabbit anti-PTGES (1:1000, Agrisera, AS03031), monoclonal mouse anti- β -actin (1:3 × 10⁵, Sigma-Aldrich, A1978), diluted in immunoblot buffer (TBS containing 0.05% Tween-20 and 5% no-fat dry milk). Data are expressed as the ratio between the intensity of the protein of interest band and the loading control protein band (β -actin).

RNA Isolation and Quantitative Real-Time PCR

mRNA expression was determined 6 h after treatments in mouse-mixed glial cell cultures and in microglial-enriched cultures; mRNA expression from *in vivo* experiments was determined 2 and 6 h after treatment. For isolation of total RNA, two wells of 24-well plates were used per experimental condition in mixed glial cultures, one well of six-well plate was used per experimental condition for microglial-enriched cultures and the whole left cortex for *in vivo* experiments. Total RNA was isolated with High Pure RNA isolation kit (Roche, 11828665001) for mixed glial cultures, with PureLink RNA Micro Kit (Invitrogen, 12183-016) for microglial cultures. Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, T9424) was used, following product instruction, to

isolate total RNA from mouse hemi-cortex. In brief, 100 ng of RNA for each cell condition and 1.5 μ g per cortex was reverse transcribed with random primers using Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche, 03531287001). cDNA was diluted 1/25 and 2 μ L was used to perform quantitative real-time PCR (qPCR). Primers (Roche) were used at final concentration of 400 nM (Table 1). β -Actin, Rn18s, and HPRT1 mRNA levels were not altered by treatments (data not shown) and were used as reference genes. qPCR was carried out with Express Sybr[®] GreenER[™] qPCR Supermix Universal (Invitrogen, 1178401K) in 6 μ L of final volume using CFX384-C1000 Thermal Cycler equipment (Bio-Rad). Primer efficiency was estimated from standard curves generated by dilution of a cDNA pool. Samples were run for 45 cycles (95°C for 30 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 30 s). Amplification specificity was confirmed by the analysis of melting curves. Relative gene expression values were calculated with the comparative Ct or $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001) using Bio-Rad CFX manager software (Bio-Rad). Ct values were corrected by the amplification efficiency of the respective primer pair which was estimated from standard curves generated by dilution of a cDNA pool.

Quantitative Chromatin Immunoprecipitation

MatInspector (matrix library version 8.4) was used to identify putative C/EBP β consensus sequences in the 5,000-bp region upstream of the transcription start site of the COX-2 and PTGES mouse genes. MatInspector was set as follows: matrix group = vertebrates; core similarity = 0.75; matrix similarity = optimized. Quantitative chromatin immunoprecipitation (qChIP) was performed as described previously (Straccia et al., 2011). Primer sequences to amplify each consensus site regions are listed in Table 1.

Immunocytochemistry and Immunohistochemistry

Cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature (RT). For fluorescence labeling, cells were



incubated overnight at 4°C with 7% normal goat serum (Vector, S-1000) in PBS containing 1% Thimerosal (Sigma-Aldrich, T5125), 0.03% Triton-X100 (Sigma-Aldrich, X100), and primary antibodies: polyclonal rabbit anti-COX-2 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, sc-1747), polyclonal rabbit anti-PTGES (1:1,000, Agrisera, AS03031), monoclonal mouse anti-GFAP (1:1,000, Sigma-Aldrich, G3893), and monoclonal rat anti-CD11b (1:300, Serotec, MCA711G, clone 5C6). After rinsing in PBS, cells were incubated for 1 h at RT with secondary antibodies: goat antimouse Alexa 546 (1:1,000, Molecular Probes, A-11018), goat anti-rabbit Alexa 546 (1:1,000, Molecular Probes A-11010), Alexa 488 (1:1,000, Molecular Probes, A-11070) or goat antirat Alexa 488 (1:500, Molecular Probes, A-11006). After secondary antibody incubation, cells were stained with Hoechst 33258 for 5 min. For immunohistochemistry, cryostat sections of fresh-frozen brain were postfixed for 30 min with 4% paraformaldehyde followed by incubation for 20 min with methanol 70%. Sections were then washed in PBS-0.2% triton (PBS-T), blocked with donkey serum, and incubated overnight at 4°C with both polyclonal rabbit anti-PTGES (1:250, Agrisera, Sweden), and monoclonal mouse anti-Iba1 (1:200, Wako, Japan) primary antibodies. After PBS-T washes, sections were incubated for 1 h at RT with donkey antirabbit ALEXA 488 (1:500) and donkey anti-mouse ALEXA 594 (1:500) secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR), washed in PBS-T, counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich), and mounted in Mowiol medium. Microscopy images were obtained with an Olympus IX70 microscope and a digital camera (CC-12, Soft Imaging System GmbH).

PGE₂ Quantification

PGE₂ was quantified by using the High-Sensitivity PGE₂ Kit (Assay Design, 930-001) based on the competitive binding technique. A dilution of culture medium from LPS-, LPS+IFN- γ - and vehicle-treated mixed glial (1:100) or microglial (1:20) cultures was used by following the protocol provided by the manufacturer. Each condition was done in triplicate.

Statistical Analysis

Data were analyzed using GraphPad 4.02. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test was used when the effect of genotype on treatment was studied and vice versa. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. Error bars are presented as SEM.

Results

C/EBP β Binds COX-2 and PTGES Gene Promoters in Activated Glial Cells

Our preliminary goal was to demonstrate the existence of C/EBP β binding to COX-2 and PTGES promoters in activated glial cells. Bioinformatics analysis of the 5,000-bp region upstream of the transcription start site revealed the presence of three putative C/EBP β binding sites in the COX-2 and PTGES promoters (Fig. 1A,B). By ChIP analysis with an anti-C/EBP β antibody, we did not detect C/EBP β binding to any of these putative C/EBP β sites in untreated or in IFN- γ -treated mixed glial cultures. However, 2 h after LPS or LPS+IFN- γ

treatments C/EBP β binding was observed in the COX-2 promoter region containing the most proximal C/EBP β site (C 1) and in two regions of the PTGES promoter containing the most proximal (P 1) and the most distal (P 3) C/EBP β sites (Fig. 1C,D). LPS-induced C/EBP β binding to the C1 site in the COX-2 promoter was significantly potentiated by IFN- γ (Fig. 1C), whereas C/EBP β binding to P1 and P3 sites in the PTGES promoter was similar after LPS or LPS + IFN- γ treatments (Fig. 1D). These results indicate that C/EBP β binds to COX-2 and PTGES promoters in glial activation.

The Absence of C/EBP β Markedly Reduces PTGES Expression and PGE₂ Production During Glial Activation

qChIP results prompted us to analyze the functional role of C/EBP β on COX-2 and PTGES expression by comparing their expressions in wild-type and C/EBP β -null-mixed glial cultures. We have recently reported that mixed glial cultures prepared from the cerebral cortices of C/EBP β -null late embryos develop normally *in vitro* and do not differ from their sibling wild-type cultures (Straccia et al., 2011). Wild-type and C/EBP β -null-mixed glial cultures were treated with LPS, LPS + IFN- γ or vehicle. In wild-type cultures, LPS and LPS + IFN- γ induced a strong upregulation of COX-2 (3.6- and 4.6-fold increase, respectively) and PTGES (4.3- and 4.0-fold increase, respectively) mRNA levels 6 h after treatment. No IFN- γ potentiation of the LPS effect was observed (Fig. 2A,B). In C/EBP β -null glial cultures, LPS and LPS + IFN- γ induced a similar COX-2 mRNA upregulation as in wild-type cultures. In contrast, the LPS and LPS + IFN- γ -induced upregulation of PTGES mRNA levels was completely abrogated in the absence of C/EBP β (Fig. 2A,B). We also analyzed mRNA expression of other six main enzymes in arachidonic acid downstream pathway (Supp. Info. Table 1). In wild-type cultures, TBAXS1 and ALOX5 mRNAs showed significant decrease after LPS and LPS + IFN- γ treatments. In C/EBP β -null-mixed glial cultures, TBAXS1 mRNA showed the same significant decrease as in wild type. Among these six enzymes, the only significant difference between genotypes was a lower level of PTGS1 mRNA in wild-type versus C/EBP β -null glial cells after LPS + IFN- γ treatment.

Next, we analyzed COX-2 and PTGES protein levels by Western blot 16 h after treatment with LPS or LPS + IFN- γ . LPS increased PTGES protein levels significantly and this effect did not occur in C/EBP β -null cultures. In contrast, COX-2 protein levels were not significantly affected by LPS neither in wild-type nor in C/EBP β -null cultures. In contrast, LPS + IFN- γ increased significantly both PTGES and COX-2 protein levels and these increases were not observed in C/EBP β -null cultures (Fig. 2C–F). To determine whether the changes observed in COX-2 and PTGES proteins translate



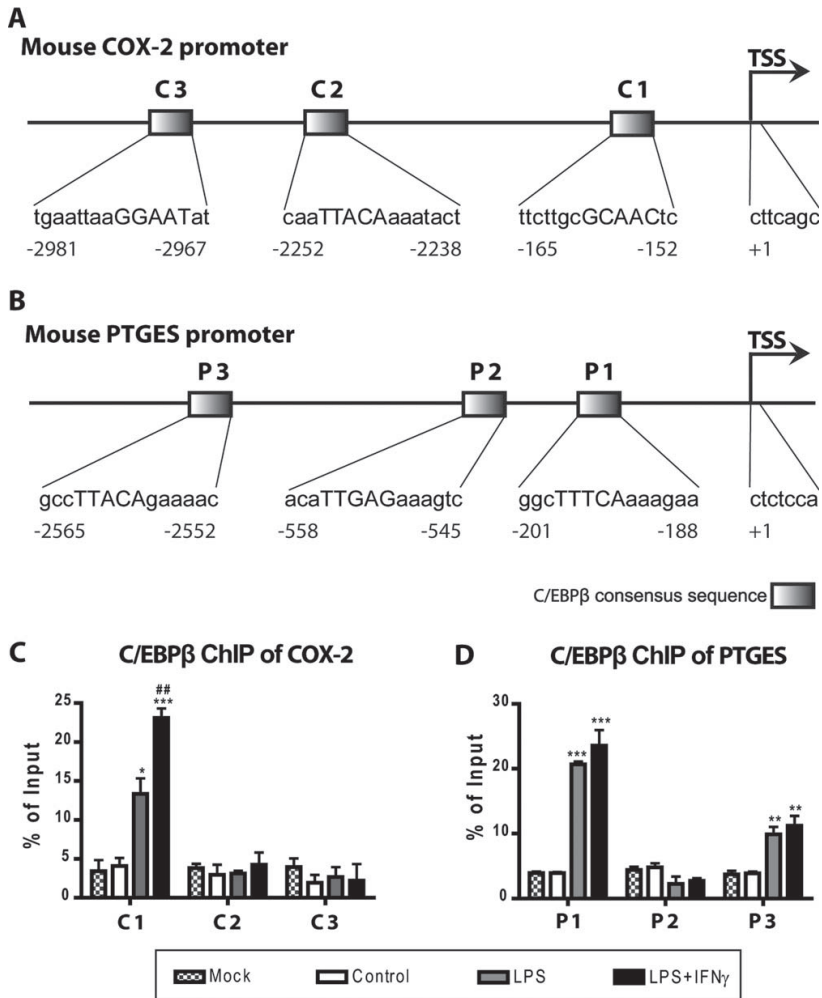


FIGURE 1: (A, B) Schematic representation of COX-2 and PTGES promoters, showing the sequences and positions with respect to the transcription start site (TSS) of the C/EBP β binding sites identified and analyzed by ChIP. **(C, D)** Quantitative analysis of C/EBP β binding to COX-2 and PTGES promoters by qChIP in mixed glial cultures. qChIP assay is carried out after 2 h of LPS, LPS + IFN- γ and vehicle (control) treatment. IL-10 was used as positive control. The Mock bars represent the mean of IgG/Control, IgG/LPS, and IgG/LPS + IFN- γ PCR values for each gene. Input refers to total DNA. % of input represents the percentage of qChIP/Input ratio. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test is applied. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control. ## $P < 0.01$ compared with LPS ($n = 3-4$).

into changes in the concentrations of the main product of their combined action, PGE $_2$ levels were analyzed by competitive binding assay in the conditioned medium of mixed glial cultures 16 h after treatments (Fig. 2G). LPS and LPS + IFN- γ significantly increased PGE $_2$ levels in wild-type cultures (vehicle, 12.5 \pm 8.2 ng/mL; LPS, 82.5 \pm 33.0 ng/mL, $P < 0.001$; LPS + IFN- γ , 88.0 \pm 30.4 ng/mL, $P < 0.001$). In C/EBP β -null glial cultures, LPS- and LPS + IFN- γ -induced upregulation of PGE $_2$ levels was

attenuated by 45.7% ($P < 0.05$) and 48.0% ($P < 0.05$), respectively. Altogether, these data demonstrate that the absence of C/EBP β clearly attenuates PTGES expression and PGE $_2$ production in activated mixed glial cultures.

COX-2 and PTGES are Expressed in Microglia

The experiments reported so far were carried out with mixed glial cultures consisting basically of astrocytes (approximately, 60–75%) and microglia (approximately, 20–25%). This is



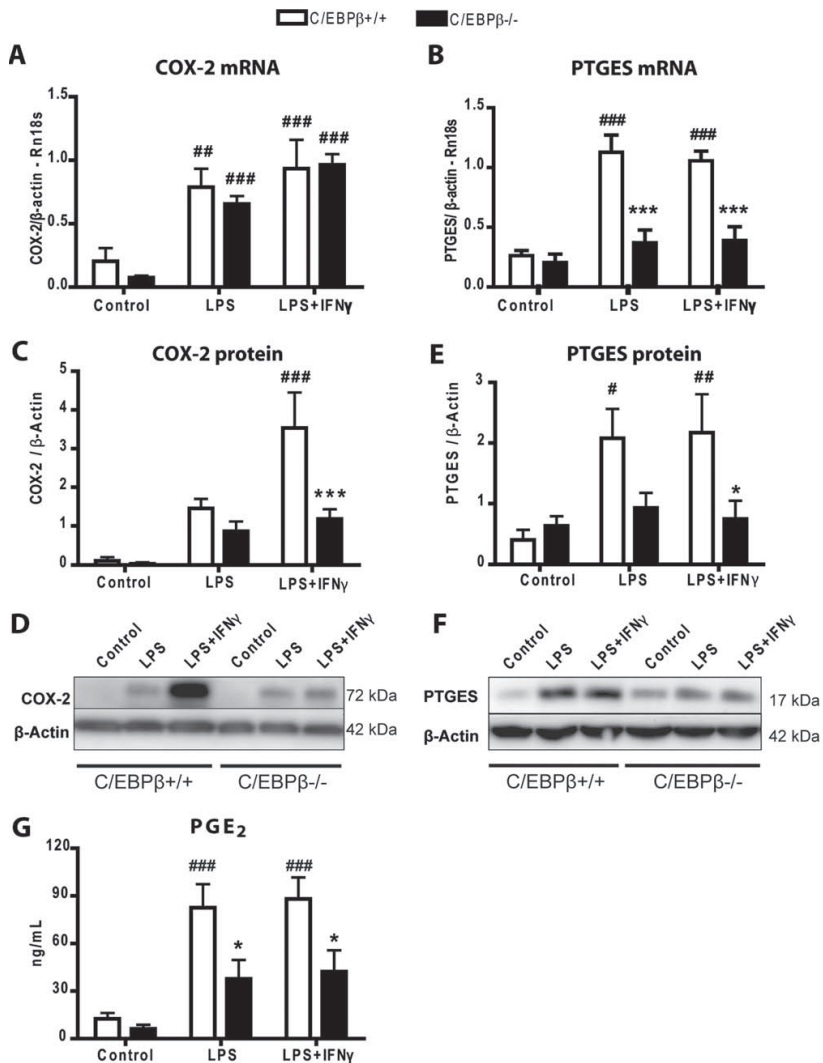


FIGURE 2: Expression of COX-2 and PTGES genes mRNA (A, B) and protein (C–F) and PGE₂ (G) in wild-type (white bars) and C/EBPβ-null (black bars) mixed glial cultures. (A, B) Cultures were treated with LPS and LPS + IFN-γ for 6 h and mRNA levels were analyzed by qPCR. In wild-type cultures, LPS and LPS + IFN-γ induce the expression of both genes. The absence of C/EBPβ results in significant decreases in the LPS- and LPS + IFN-γ-induced expression of PTGES, whereas no differences in COX-2 mRNA levels were observed between the two genotypes. Results are expressed as relative fold units of $\Delta\Delta C_t$ value between gene of interest and actin + Rn18s as reference genes. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was applied. *** $P < 0.001$ compared with respective wild-type condition. ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ compared with respective control ($n = 4-6$). (C–F) Cultures were treated with LPS and LPS + IFN-γ for 16 h and COX-2 (C, D) and PTGES (E, F) protein levels were analyzed by Western blot, followed by densitometry. Data are expressed as target protein versus β-actin band intensities. Representative Western blots are shown in (D) and (F). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was applied. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with the respective wild-type condition. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ compared with the respective control condition ($n = 4-7$). (G) PGE₂ production is decreased in activated C/EBPβ-null glial cultures. PGE₂ levels were measured by colorimetric analysis 16 h after treatments. Values are reported as ng PGE₂/mL. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was applied. * $P < 0.05$ compared with wild-type condition. ### $P < 0.001$ compared with respective control condition ($n = 5$).

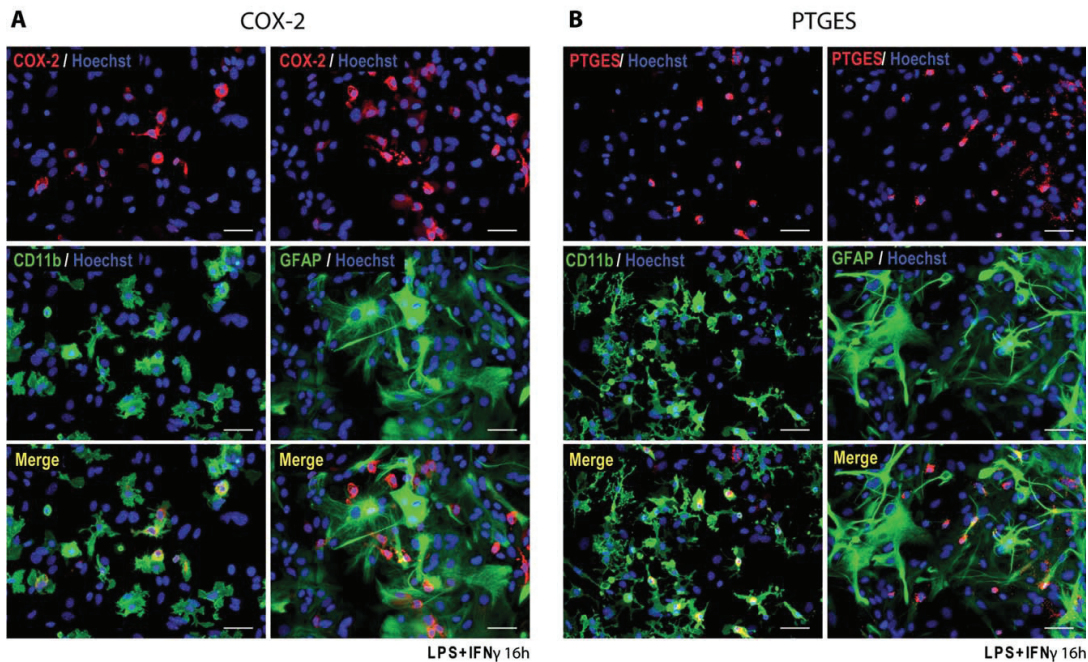
C/EBP β ^{+/+} Mixed Glial Culture

FIGURE 3: COX-2 and PTGES are expressed by activated microglia. Wild-type mixed glial cultures were immunostained for CD11b or GFAP (green), COX-2 (red in A) or PTGES (red in B), and stained for Hoechst 33258 (blue) after 16 h of LPS + IFN- γ treatment. Wild-type merged images show colocalization of COX-2 and PTGES-positive cells and CD11b-positive cells. These representative merged images clearly show that COX-2- and PTGES-positive cells are not GFAP positive. Similar results were obtained after LPS treatment but in this case the number of COX-2 positive cells was lower after LPS + IFN- γ . Bar = 50 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

our biological preparation of choice to study glial activation *in vitro* because it allows the crosstalk between astrocytes and microglia. To study whether observed effects were produced by astrocytes, microglial cells, or both, mixed glial cultures treated with LPS or LPS + IFN- γ for 16 h were immunostained with COX-2 and PTGES and the nature of positive cells was ascertained by double immunofluorescence with the astroglial and microglial markers GFAP and CD11b, respectively. In untreated cultures, COX-2 immunoreactivity was not detected (data not shown), whereas LPS and LPS + IFN- γ clearly induced COX-2 immunoreactivity in a subpopulation of cells. COX-2-positive cells were clearly delineated with COX-2 immunoreactivity filling the whole cytoplasm. COX-2-positive cells were never positive for GFAP, whereas all COX-2-positive cells were also CD11b positive (Fig. 3A) although there were CD11b-positive cells devoid of COX-2 immunoreactivity. The same pattern was observed for PTGES namely, the absence of PTGES in untreated cells and strong upregulation by LPS \pm IFN- γ in a subpopulation of cells defined as microglia by CD11b immunostaining. PTGES

immunoreactivity showed perinuclear localization (Fig. 3B). Once established that COX-2 and PTGES expression in mixed glial cultures is basically of microglial origin, we analyzed the effect of the absence of C/EBP β on COX-2 and PTGES in microglial-enriched cultures. As reported in mixed glial cultures, COX-2 and PTGES mRNA levels were low in untreated microglial cultures (0.09 ± 0.03 and 0.09 ± 0.07) and were strongly upregulated by LPS (0.69 ± 0.15 , $P < 0.001$ and 0.92 ± 0.23 , $P < 0.001$) and LPS + IFN- γ (1.47 ± 0.27 , $P < 0.001$ and 0.61 ± 0.15 , $P < 0.001$) (Fig. 4A,B). IFN- γ potentiated LPS-induced COX-2 but not PTGES expression. Interestingly, in C/EBP β -null microglial cultures, we observed a marked reduction in LPS + IFN- γ -induced COX-2 mRNA upregulation (-43.3% , $P < 0.001$) and in LPS- and LPS + IFN- γ -induced upregulation of PTGES mRNA (-90.6% , $P < 0.001$, and -89.8% , $P < 0.001$, respectively) (Fig. 4A,B). Western blot experiments revealed a marked upregulation of COX-2 and PTGES protein levels induced by LPS and LPS + IFN- γ in microglial cultures (Fig. 4C-F). The increases in COX-2 and PTGES

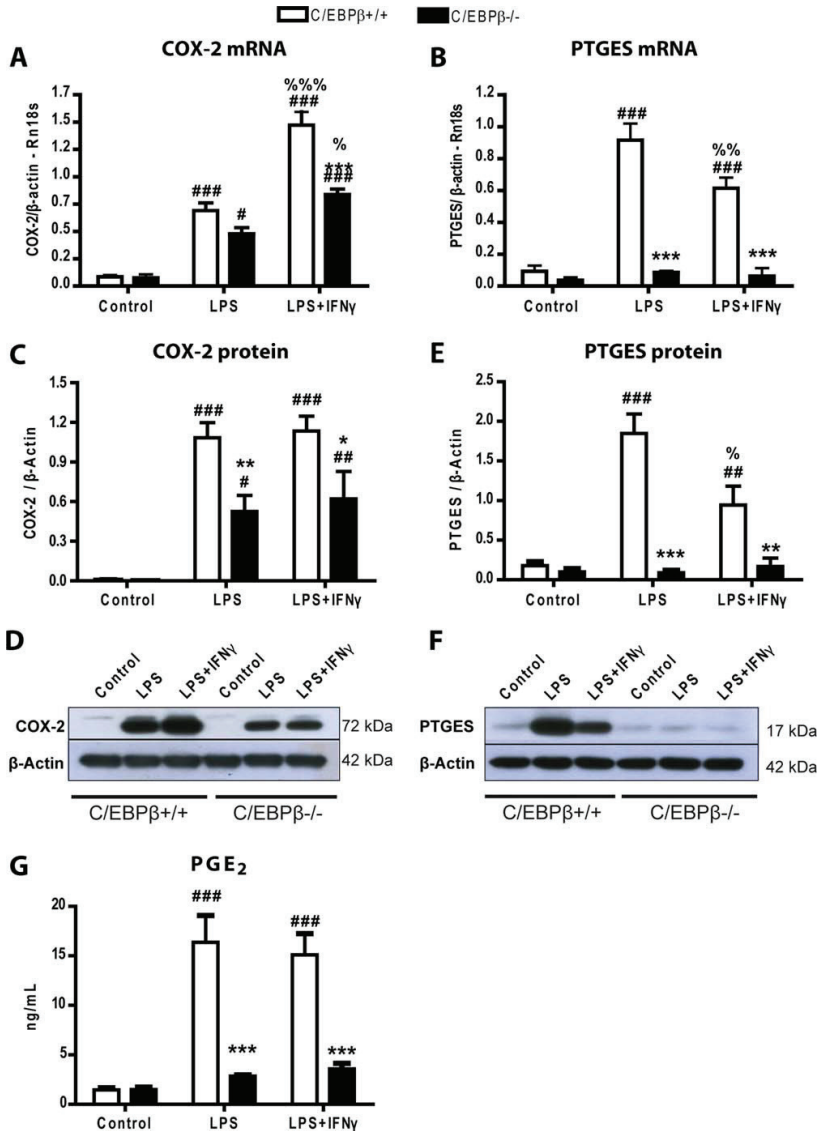


FIGURE 4: Expression of COX-2 and PTGES genes mRNA (A, B) and protein (C–F) and PGE₂ (G) in wild-type (white bars) and C/EBP β -null (black bars) microglial cultures. (A, B). Microglial cultures were treated with LPS and LPS + IFN- γ for 6 h and mRNA levels for COX-2 (A) and PTGES (B) were analyzed by qPCR. Results are expressed as relative fold units of $\Delta\Delta$ Ct value between gene of interest and β -actin + Rn18s as reference genes. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was applied. *** P <0.001 compared with respective wild-type condition. # P <0.05; ### P <0.001 compared with respective control. % P <0.05; %% P <0.01; %%% P <0.001 compared with respective LPS condition (n =3–5). (C–F) Microglial cultures were treated with LPS and LPS + IFN- γ for 16 h and COX-2 (C, D) and PTGES (E, F) protein levels were analyzed by Western blot, followed by densitometry. Data are expressed as target protein versus β -actin band intensities. Representative Western blots are shown in (D) and (F). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was applied. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with the respective wild-type condition. ## P <0.01, ### P <0.001 compared with the respective control condition. % P <0.05 compared with respective LPS condition (n =4). (G) PGE₂ production is decreased in activated C/EBP β -null microglial cultures. PGE₂ levels were measured by colorimetric analysis 16 h after treatments. Values are reported as ng PGE₂/mL. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was applied. *** P <0.001 compared with wild-type condition. ### P <0.001 compared with respective control condition (n =4). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]



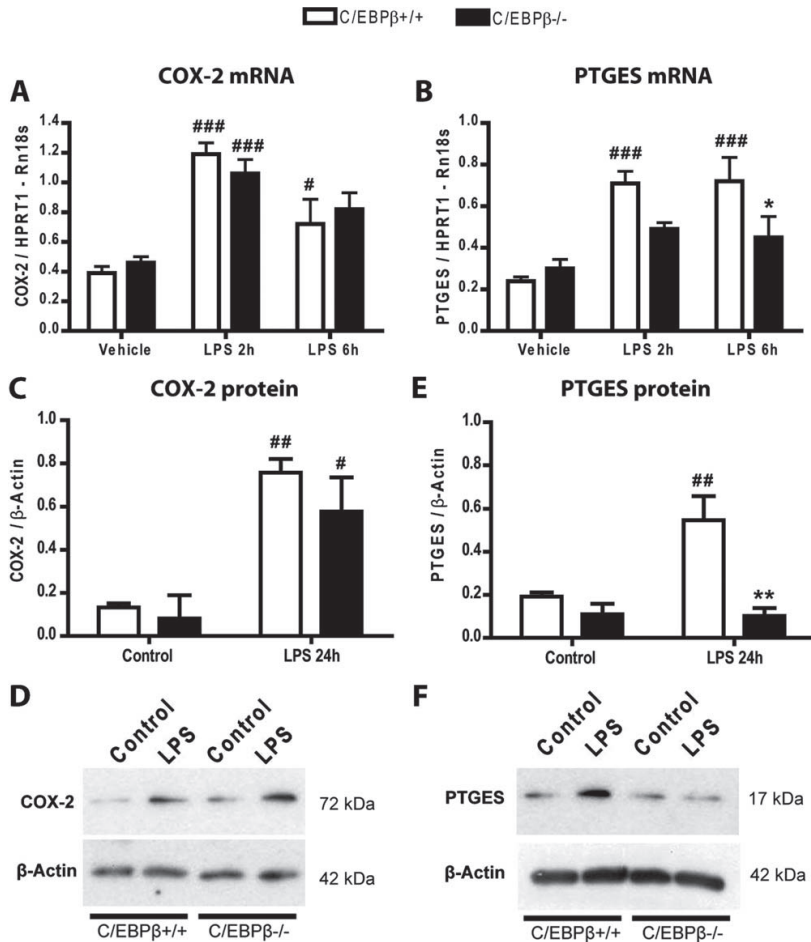


FIGURE 5: Expression of COX-2 and PTGES mRNA (A, B) and protein (C–F) in wild-type (white bars) and C/EBP β -null (black bars) LPS-treated male mice cortex. (A, B) Mice were treated i.p. with LPS or vehicle for 2 or 6 h and mRNA levels in cerebral cortex were analyzed by qPCR. In wild-type mice, elevated expression of both genes is already observed 2 h post-LPS treatment. The absence of C/EBP β results in significant decreases in expression of PTGES 6 h after LPS, whereas no differences in COX-2 mRNA levels were observed between genotypes. Results are expressed as relative fold units of $\Delta\Delta$ Ct value between gene of interest and HPRT1 + Rn18s as reference genes. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was applied. * $P < 0.05$ compared with respective wild-type condition. # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ compared with respective control ($n = 5-6$). (C–F) Mice were treated i.p. with LPS or vehicle for 24 h and protein levels in cerebral cortex were analyzed by Western blot. In wild-type mice, LPS increases the protein levels of COX-2 and PTGES. The absence of C/EBP β prevents the increase in PTGES but not in COX-2 protein levels. Data are expressed as target protein versus β -actin band intensities. Representative Western blots are shown in (D) and (F). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was applied. ** $P < 0.01$ compared with the respective wild-type condition. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with the respective control condition ($n = 3$).

protein levels were markedly attenuated in C/EBP β -null microglial cultures (COX2: LPS -53.3% , $P < 0.001$; LPS + IFN- γ -45.3% , $P < 0.05$; PTGES: LPS -95.6% , $P < 0.001$; LPS + IFN- γ -82.2% , $P < 0.001$) (Fig. 4C–F). Finally, PGE $_2$ levels in microglial cultures treated with LPS or LPS + IFN- γ were also drastically reduced in the absence of C/EBP β (-82.6% , $P < 0.001$ and -76.3% , $P < 0.001$, respectively) (Fig. 4G).

The Absence of C/EBP β Reduces Early Cortical mRNA Expression of PTGES After Systemic LPS

We were finally interested to determine whether the observed *in vitro* C/EBP β control on PTGES expression also occurs *in vivo*. We first analyzed the cellular location of PTGES in the CNS of mice treated systemically with LPS (100 μ g/mice, i.p.). In vehicle-treated mice, scattered PTGES-positive cells were observed in corpus callosum and around the ventricles.

The number of PTGES-positive cells increased in various brain regions, particularly cerebral cortex, striatum, and hippocampus, 16 h after systemic LPS injection. In these animals, PTGES colocalized with the microglial markers Iba1, tomato lectin, or CD11b in some cells but the majority of PTGES-positive cells were negative for these microglial markers (data not shown). The anti-PTGES antibody produced only a specific signal in fresh-frozen postfixed sections. This resulted in a suboptimal morphology and a decreased signal of microglial markers. To analyze whether PTGES and COX-2 expression levels were affected in *C/EBPβ*-null mice compared with wild-type mice *in vivo*, mRNA cortical levels were measured by qPCR 2 and 6 h after systemic LPS treatment. In wild-type mice, COX-2 mRNA levels were upregulated by LPS (vehicle, 0.39 ± 0.11 ; LPS, 2 h 1.19 ± 0.17 , $P < 0.001$; LPS, 6 h 0.72 ± 0.41 , $P < 0.05$) and a similar response was observed in *C/EBPβ*-null mice (Fig. 5A,B). PTGES mRNA levels were also strongly upregulated by LPS i.p. in the cerebral cortex of wild-type mice (vehicle, 0.24 ± 0.05 ; LPS, 2 h 0.71 ± 0.13 , $P < 0.001$; LPS, 6 h 0.72 ± 0.28 , $P < 0.001$) and this response was significantly lower in *C/EBPβ*-null mice (vehicle, 0.30 ± 0.10 ; LPS, 2 h 0.49 ± 0.07 ; LPS, 6 h 0.45 ± 0.20 , $P < 0.05$). By analyzing mRNA expression of the other arachidonic acid downstream pathway enzymes in cerebral cortices, we did not find any significant difference, neither between genotypes nor among LPS-treatment time points (Supp. Info. Table 2). We next analyzed COX-2 and PTGES protein levels by Western blot in the cerebral cortex of wild-type and *C/EBPβ*-null mice treated for 16 h with systemic LPS or vehicle. In agreement with the mRNA data, systemic LPS upregulated COX-2 protein levels in wild-type (vehicle, 0.133 ± 0.018 ; LPS, 0.757 ± 0.063 , $P < 0.01$) and *C/EBPβ*-null cerebral cortex (vehicle, 0.081 ± 0.108 ; LPS, 0.578 ± 0.157 , $P < 0.05$) (Fig. 5C,D). In contrast, PTGES protein levels were upregulated by systemic LPS in wild type (vehicle, 0.192 ± 0.019 ; LPS, 0.547 ± 0.112 , $P < 0.01$) but not in *C/EBPβ*-null cerebral cortex (vehicle, 0.110 ± 0.049 ; LPS, 0.102 ± 0.037 , $P > 0.05$) mirroring the *in vitro* results.

Discussion

We have recently demonstrated that the transcription factor *C/EBPβ* regulates proinflammatory gene expression and neurotoxicity elicited by activated microglia (Straccia et al., 2011). Given the important roles played by prostaglandins in neuroinflammation (Milatovic et al., 2011), we have here investigated the involvement of *C/EBPβ* in the regulation of prostaglandin-synthesis enzymes expression with a particular focus on the two inducible enzymes COX-2 and PTGES. Our results show the induction of COX-2 and PTGES expression and PGE₂ production in neuroinflammation and

TABLE 2: Summary of Changes Induced by *C/EBPβ* Deficiency Reported in This Study

		COX-2		PTGES	
		LPS	LPS + IFN-γ	LPS	LPS + IFN-γ
Mixed glia	mRNA	=	=	↓	↓
	protein	=	↓	=	↓
	PGE ₂			↓	↓
Microglia	mRNA	=	↓	↓	↓
	protein	↓	↓	↓	↓
	PGE ₂			↓	↓
CNS <i>in vivo</i> (Cortex)	mRNA	=	nd	↓	nd
	protein	=	nd	↓	nd

= denotes no changes and ↓ denotes significant decrease in COX-2, PTGES, or PGE₂ expression in *C/EBPβ*-null primary cultures/mice when compared to wild-type; nd: not determined.

the abrogation of PTGES upregulation and PGE₂ overproduction in the absence of *C/EBPβ*

COX-2 expression can be regulated by *C/EBPβ* in many cell types and stimulation paradigms (Healy et al., 2008; Kutchera et al., 1996; Liu et al., 2008; Wadleigh et al., 2000; Zhao et al., 2009). In fact, *C/EBPβ* has been proposed as a transcription-based strategy target to inhibit COX-2 (Wu, 2006). In this study, COX-2 mRNA levels were barely affected by the absence of *C/EBPβ* *in vitro* or *in vivo* (Table 2), but COX-2 protein levels were significantly decreased in activated *C/EBPβ*-null-mixed glial (LPS + IFN-γ) and microglial cultures (LPS and LPS + IFN-γ). Interestingly, this discrepancy between COX-2 mRNA and protein levels was also observed in NF-κB inhibition experiments with primary rat microglia (de Oliveira et al., 2008). The lack of marked effects on LPS-induced COX-2 expression caused by the absence of *C/EBPβ* is surprising, given the large number of cell types/experimental paradigms in which this regulation has been observed. However, the regulation of COX-2 expression by *C/EBPβ* in activated glial cells has not been demonstrated. Our ChIP data showing *C/EBPβ* binding to COX-2 promoter in activated glial cells probably indicate that *C/EBPβ* participates in the regulation of COX-2 expression in neuroinflammation through proximal *C/EBP* sites. The unaffected COX-2 expression when *C/EBPβ* is absent suggests that *C/EBPβ* role is taken over by other transcription factors. *C/EBPδ* is a particularly strong candidate to play redundant roles with *C/EBPβ* in this case. *C/EBPδ* has the same b-zip



domain primary structure and therefore it can bind the same DNA consensus sequence as C/EBP β (Tsukada et al., 2011) and it is also upregulated in glial activation (Ejarque-Ortiz et al., 2010). We have recently shown with primary mixed glial cultures that C/EBP δ binds COX-2 promoter and it is necessary for full COX-2 expression by activated microglia (Valente et al., 2013). These data together with the data here reported on the lack of marked effects on COX-2 expression caused by the absence of C/EBP β suggest that although C/EBP β can bind the COX-2 promoter and it probably participates in COX-2 transcription in activated glial cells, its role can be taken over by C/EBP δ . Interestingly, the opposite situation is found for PTGES. PTGES expression in activated glial cultures is not affected by the absence of C/EBP δ (Valente et al., unpublished observations) but, as this study shows, it is markedly affected by the absence of C/EBP β .

Much less known than COX-2, PTGES is the terminal enzyme responsible for the synthesis of PGE₂. Since its discovery in the late 1990s (Jakobsson et al., 1999), it is the subject of a very active research because it constitutes a more selective target than COX-2 to regulate PGE₂ levels (Koeberle and Werz, 2009). Putative binding sites for various transcription factors have been identified in the mouse PTGES promoter (Naraba et al., 2002). To our knowledge, only early growth response protein 1 and NF- κ B has been shown to bind the PTGES promoter and to regulate PTGES expression induced by proinflammatory stimuli (Ackerman et al., 2008; Diaz-Munoz et al., 2010; Naraba et al., 2002). PTGES expression is attenuated in C/EBP β -deficient macrophages, suggesting the involvement of this factor in PTGES expression (Uematsu et al., 2002) but direct C/EBP β binding to PTGES promoter or identification of functional C/EBP sites in this promoter has not been demonstrated. In this study, we show, for the first time, the binding of C/EBP β to the PTGES promoter. ChIP analysis demonstrated strong C/EBP β binding to a region containing a proximal -201/-188 site and a weaker but significant binding to the region containing a distal -2565/-2552 C/EBP site. C/EBP β binding to PTGES promoter was observed only in activated glial cells, suggesting a direct regulation of PTGES expression by C/EBP β in neuroinflammation. To explore the functional role of C/EBP β in PTGES expression in activated glial cells, PTGES expression was analyzed *in vitro* and *in vivo* in C/EBP β -null mice. The absence of C/EBP β resulted in reduced LPS- and LPS + IFN- γ -induced PTGES expression in mixed glial and microglial cultures as well as in the CNS of LPS-treated mice (Table 2). These data overwhelmingly support a functional role for C/EBP β in the regulation of PTGES expression in neuroinflammation which constitutes the main finding of this study. It is worth noting that the expression of the two main inducible PGE-synthesis enzymes, COX-2 and PTGES, can be regulated independently

which agrees with the previous reports, showing attenuation of LPS-induced macrophage or microglial PTGES expression without affecting COX-2 expression (Candelario-Jalil et al., 2003; Silva Bastos et al., 2011; Uematsu et al., 2002).

PGE₂ is the most common eicosanoid derived from arachidonic acid metabolism. PGE₂ levels increase in the brain and CSF in various neurological disorders and animal models thereof (Aktan et al., 1991; Almer et al., 2002; Candelario-Jalil et al., 2003; Combrinck et al., 2006; Mattsson et al., 2009; Minghetti and Pocchiari, 2007). Although the role of PGE₂ in these disorders is controversial, the evidence for a detrimental role for PGE₂ in some experimental models is strong (Ikeda-Matsuo et al., 2010; Li et al., 2008; Takemiya et al., 2010). E prostanoind receptors and COXs are actively pursued as potential targets to regulate PGE₂ production and function. Our results show that C/EBP β deficiency results in a decrease in PGE₂ production by activated glial cells which parallels PTGES but not COX-2 expression. These findings support the concept that the inhibition of PTGES can reduce PGE₂ levels in the absence of COX-2 inhibition.

In this study, we have identified microglial cells and not astrocytes as COX-2 and PTGES expressing cells in mouse mixed glial cultures upon LPS or LPS + IFN- γ activation. The expression of COX-2 (Ajmone-Cat et al., 2003; Minghetti and Pocchiari, 2007) and PTGES (Candelario-Jalil et al., 2003) in activated microglial cells in culture has already been reported. There are also reports showing COX-2 mRNA or protein in murine astroglial cultures but the presence of COX-2 in astrocytes in these cultures has not been unequivocally demonstrated. As we have previously discussed, the presence of microglial cells is often underestimated in primary astroglial cultures and there are examples of microglia being the cell type responsible for the effects observed in the so-called astroglial cultures (Saura, 2007). The absence of detectable immunoreactivity for COX-2 or PTGES in astrocytes demonstrates that activated microglia are the main COX-2 and PTGES-expressing cells in this model. *In vivo* we have observed a marked upregulation of brain COX-2 and PTGES mRNA levels after systemic LPS injection and an attenuated expression of PTGES but not COX-2 in C/EBP β -null mice, in complete correspondence with the *in vitro* data. These findings clearly show that C/EBP β regulates *in vivo* PTGES expression in the inflamed CNS. Our *in vitro* data point to microglia as a likely candidate to express PTGES under the control of C/EBP β in the CNS of systemic LPS-treated mice. However, immunohistochemistry results show that although PTGES is expressed by microglial cells in this *in vivo* model, most PTGES-expressing cells are nonmicroglial. Studies in other *in vivo* models in which neuroinflammation occurs have shown that PTGES can be expressed in the CNS by microglia (Campuzano et al., 2008; Ikeda-Matsuo et al.,

2005, 2010; Kihara et al., 2009), infiltrating macrophages (Kihara et al., 2009), and endothelial cells (Yamagata et al., 2001). The striking inhibition of PTGES induction in LPS-treated C/EBP β -null mice brain shows, for the first time, the regulation of PTGES expression by C/EBP β in the inflamed CNS and it suggests that C/EBP β control of PTGES is not restricted to microglia, but it could be extended to most PTGES-expressing cells in neuroinflammation.

Conclusions

In summary, we here strongly demonstrate the regulation of PTGES expression by the transcription factor C/EBP β in activated microglial cells and confirm the independent regulation of COX-2 and PTGES in neuroinflammation. As C/EBP β deficiency is neuroprotective, these data suggest that attenuation of PTGES expression in activated microglia could participate in the beneficial effects of C/EBP β deficiency. Altogether, these findings strengthen the proposed role of C/EBP β as a key player in the regulation of gene expression in neuroinflammation.

Acknowledgment

Grant sponsor: The Instituto de Salud Carlos III, Spain; Grant numbers: PI081396, PI10/378.

The authors thank Colleen Croniger and Valeria Poli for the generous gift of C/EBP β knockout mice, Teresa Domingo, and colleagues at animal facilities of the School of Pharmacy (University of Barcelona) for the professional care of C/EBP β knockout mice and Laura Masfarré Pinto, Marcos Muñoz García, and Unai Perpiñá for technical assistance. MS, GD, and MP are recipients of JAE-CSIC, IDIBAPS, and FPU fellowships, respectively, and TV of a Juan de la Cierva contract.

Author Contributions

MS carried out most experiments and drafted the manuscript. GD carried out the qChIP experiments. TV participated in *in vivo* experiments. MP participated in experiments with primary microglia. CS participated in the statistical analysis. JS coordinated the study and drafted the manuscript. All authors critically revised and approved the final manuscript.

References

Ackerman WET, Summerfield TL, Vandre DD, Robinson JM, Kniss DA. 2008. Nuclear factor-kappa B regulates inducible prostaglandin E synthase expression in human amnion mesenchymal cells. *Biol Reprod* 78:68–76.

Ajmone-Cat MA, Nicolini A, Minghetti L. 2003. Prolonged exposure of microglia to lipopolysaccharide modifies the intracellular signaling pathways and selectively promotes prostaglandin E2 synthesis. *J Neurochem* 87:1193–1203.

Aktan S, Aykut C, Ercan S. 1991. Leukotriene C4 and prostaglandin E2 activities in the serum and cerebrospinal fluid during acute cerebral ischemia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 43:247–249.

Almer G, Teismann P, Stevic Z, Halaschek-Wiener J, Deecke L, Kostic V, Przedborski S. 2002. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology* 58:1277–1279.

Andreasson K. 2010. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 91:104–112.

Baenziger NL, Becherer PR, Majerus PW. 1979. Characterization of prostacyclin synthesis in cultured human arterial smooth muscle cells, venous endothelial cells and skin fibroblasts. *Cell* 16:967–974.

Campuzano O, Castillo-Ruiz MM, Acarin L, Castellano B, Gonzalez B. 2008. Distinct pattern of microglial response, cyclooxygenase-2, and inducible nitric oxide synthase expression in the aged rat brain after excitotoxic damage. *J Neurosci Res* 86:3170–3183.

Candelario-Jalil E, Gonzalez-Falcon A, Garcia-Cabrera M, Alvarez D, Al-Dalain S, Martinez G, Leon OS, Springer JE. 2003. Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *J Neurochem* 86:545–555.

Chaudhry Ua, Zhuang H, Crain BJ, Doré S. 2008. Elevated microsomal prostaglandin-E synthase-1 in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 4:6–13.

Cheng Y, Wang M, Yu Y, Lawson J, Funk CD, Fitzgerald GA. 2006. Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *J Clin Invest* 116:1391–1399.

Choi S-H, Aid S, Bosetti F. 2009. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: Implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci* 30:174–181.

Cimino PJ, Keene CD, Breyer RM, Montine KS, Montine TJ. 2008. Therapeutic targets in prostaglandin E2 signaling for neurologic disease. *Curr Med Chem* 15:1863–1869.

Combrinck M, Williams J, De Berardinis MA, Warden D, Puopolo M, Smith AD, Minghetti L. 2006. Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline, and survival in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:85–88.

Cortes-Canteli M, Luna-Medina R, Sanz-Sancristobal M, Alvarez-Barrientos A, Santos A, Perez-Castillo A. 2008. CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J Cell Sci* 121:1224–1234.

de Oliveira ACP, Candelario-Jalil E, Bhatia HS, Lieb K, Hüll M, Fiebich BL. 2008. Regulation of prostaglandin E2 synthase expression in activated primary rat microglia: Evidence for uncoupled regulation of mPGES-1 and COX-2. *Glia* 56:844–855.

Diaz-Munoz MD, Osmá-García IC, Cacheiro-Llaguno C, Fresno M, Iniguez MA. 2010. Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages. *Cell Signal* 22:1427–1436.

Driver JA, Logroscino G, Lu L, Gaziano JM, Kurth T. 2011. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease: Nested case-control study. *Br Med J* 342:d198.

Ejarque-Ortiz A, Gresa-Arribas N, Straccia M, Mancera P, Sola C, Tusell JM, Serratos J, Saura J. 2010. CCAAT/enhancer binding protein delta in microglial activation. *J Neurosci Res* 88:1113–1123.

Ejarque-Ortiz A, Medina MG, Tusell JM, Perez-Gonzalez AP, Serratos J, Saura J. 2007. Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. *Glia* 55:178–188.

Healy ZR, Zhu F, Stull JD, Konstantopoulos K. 2008. Elucidation of the signaling network of COX-2 induction in sheared chondrocytes: COX-2 is induced via a Rac/MEK1/MKK7/JNK2/c-Jun-C/EBPbeta-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C1146–C1157.

Ikeda-Matsuo Y, Hirayama Y, Ota A, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. 2010. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenase-2 are both required for ischaemic excitotoxicity. *Br J Pharmacol* 159:1174–1186.



- Ikedo-Matsuo Y, Ikegaya Y, Matsuki N, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. 2005. Microglia-specific expression of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 contributes to lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production. *J Neurochem* 94:1546–1558.
- Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. 1999. Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7220–7225.
- Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, Kalluri H, Johnson PF, Vemuganti R. 2006. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 98:1718–1731.
- Kihara Y, Matsushita T, Kita Y, Uematsu S, Akira S, Kira J-i, Ishii S, Shimizu T. 2009. Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21807–21812.
- Koeberle A, Werz O. 2009. Inhibitors of the microsomal prostaglandin E(2) synthase-1 as alternative to non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)—A critical review. *Curr Med Chem* 16:4274–4296.
- Kutcher W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, White RL, Prescott SM. 1996. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: Evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4816–4820.
- Levi G, Minghetti L, Aloisi F. 1998. Regulation of prostanoid synthesis in microglial cells and effects of prostaglandin E2 on microglial functions. *Biochimie* 80:899–904.
- Li W, Wu S, Hickey RW, Rose ME, Chen J, Graham SH. 2008. Neuronal cyclooxygenase-2 activity and prostaglandins PGE2, PGD2, and PGF2 alpha exacerbate hypoxic neuronal injury in neuron-enriched primary culture. *Neurochem Res* 33:490–499.
- Liu Q, Inoue H, Mahendran R. 2008. Transcriptional regulation of the COX-2 expression by nitric oxide in colon cancer cell lines. *Oncol Rep* 19:269–274.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.
- Mattsson N, Yaong M, Rosengren L, Blennow K, Mansson JE, Andersen O, Zetterberg H, Haghighi S, Zho I, Pratico D. 2009. Elevated cerebrospinal fluid levels of prostaglandin E2 and 15-(S)-hydroxyicosatetraenoic acid in multiple sclerosis. *J Intern Med* 265:459–464.
- Milatovic D, Montine TJ, Aschner M. 2011. Prostanoid signaling: dual role for prostaglandin E2 in neurotoxicity. *Neurotoxicology* 32:312–319.
- Minghetti L, Pocchiarri M. 2007. Cyclooxygenase-2, prostaglandin E2, and microglial activation in prion diseases. *Int Rev Neurobiol* 82:265–275.
- Nakayama M, Uchimura K, Zhu RL, Nagayama T, Rose ME, Stetler Ra, Isakson PC, Chen J, Graham SH. 1998. Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10954–10959.
- Naraba H, Yokoyama C, Tago N, Murakami M, Kudo I, Fueki M, Oh-Ishi S, Tanabe T. 2002. Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E2 synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem* 277:28601–28608.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193–1226.
- Saura J. 2007. Microglial cells in astroglial cultures: A cautionary note. *J Neuroinflammation* 4:26.
- Saura J, Tusell JM, Serratos J. 2003. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44:183–189.
- Screpanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D, Sellitto C, Scarpa S, Bellavia D, Lattanzio G, Bistoni F, Frati L, Cortese R, Gulino A, Ciliberto G, Costantini F, Poli V. 1995. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J* 14:1932–1941.
- Silva Bastos LF, Pinheiro de Oliveira AC, Magnus Schlachetki JC, Fiebich BL. 2011. Minocycline reduces prostaglandin E synthase expression and 8-isoprostane formation in LPS-activated primary rat microglia. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33:576–580.
- Straccia M, Gresa-Arribas N, Dentesano G, Ejarque-Ortiz A, Tusell JM, Serratos J, Sola C, Saura J. 2011. Pro-inflammatory gene expression and neurotoxic effects of activated microglia are attenuated by absence of CCAAT/enhancer binding protein beta. *J Neuroinflammation* 8:156.
- Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Maehara M, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K. 2010. Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 exacerbates neuronal loss induced by kainate. *J Neurosci Res* 88:381–390.
- Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I. 2000. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* 275:32775–32782.
- Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, Lin JX, Budka H. 2000. Cyclooxygenase-2 is induced in microglia during chronic cerebral ischemia in humans. *Acta Neuropathol* 99:26–30.
- Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE. 2011. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* 54:6–19.
- Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K, Akira S. 2002. Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol* 168:5811–5816.
- Valente T, Straccia M, Gresa-Arribas N, Dentesano G, Tusell JM, Serratos J, Mancera P, Sola C, Saura J. CCAAT/enhancer binding protein delta regulates glial proinflammatory gene expression. *Neurobiol Aging* 34:2110–24.
- Vlad SC, Miller DR, Kowall NW, Felson DT. 2008. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology* 70:1672–1677.
- Wadleigh DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S, Herschman HR. 2000. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 275:6259–6266.
- Whalley ET, Schilling L, Wahl M. 1989. Cerebrovascular effects of prostanoids: In-vitro studies in feline middle cerebral and basilar artery. *Prostaglandins* 38:625–634.
- Wu KK. 2006. Transcription-based COX-2 inhibition: A therapeutic strategy. *Thromb Haemost* 96:417–422.
- Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki K, Yasuda S, Sugiura H, Cao C, Watanabe Y, Kobayashi S. 2001. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci* 21:2669–2677.
- Zhao Y, Usatyuk PV, Gorshkova IA, He D, Wang T, Moreno-Vinasco L, Geyh AS, Breyse PN, Samet JM, Spannake EW and others. 2009. Regulation of COX-2 expression and IL-6 release by particulate matter in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:19–30.

