



UAB

Implicación de las citoquinas *TNF- α* e *IL-6* y
de las metalotioneínas en la neuroinflamación
desencadenada por lesión cerebral

ALBERT QUINTANA ROMERO

TESIS DOCTORAL
Bellaterra, 2007



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

IMPLICACIÓN DE LAS CITOQUINAS *TNF- α* E *IL-6* Y DE LAS METALOTIONEÍNAS EN LA NEUROINFLAMACIÓN DESENCADENADA POR LESIÓN CEREBRAL

Albert Quintana Romero
Bellaterra, Octubre de 2007

Memoria de la tesis presentada por **Albert Quintana Romero** para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección de la **Doctora Amalia Molinero Egea**, profesora titular del departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Directora de tesis

Doctorando

Dra. Amalia Molinero Egea

Albert Quintana Romero

***A mis padres, por ser el ejemplo a seguir
A Eli, per haver volgut fer aquest viatge junts***

Standing at the crossroads,
trying to read the signs,
to tell me which way
I should go to find the answer

Eric Clapton
Let it grow

La verdadera ciencia enseña, sobre todo,
a dudar y a ser ignorante

Miguel de Unamuno

Agradecimientos

Una de las cosas que he aprendido en estos años a medida que diversas tesis han ido pasando por mis manos es que la primera página que todo el mundo busca, incluso antes de leer el título, es la de agradecimientos.

Eso sí, lo que nadie me había dicho nunca es que costara tanto encontrar las palabras para poder agradecer a todas las personas que han contribuido a que estos cinco (o seis) años de vida queden plasmados en este trabajo.

Es evidente que si ahora mismo estoy escribiendo estas líneas es, sin lugar a duda, por la confianza que tanto la Dra. Amalia Molinero como el Dr. Juan Hidalgo pusieron en un alumno suyo que no paraba de hablar en las clases (cosas de las hormonas y la edad, supongo).

La verdad es que el trato recibido tanto por ellos como por la Dra. Mercè Giralt ha hecho que el laboratorio nunca me haya parecido un trabajo, sino más bien un juego, donde diversión y aprendizaje han ido de la mano. Gracias a ellos y a todos mis compañeros de grupo de MTs (especial mención a los veteranos como el Dr. Javier Carrasco por perder tiempo formándome), siempre me he sentido como en casa, como en una familia. Quisiera agradecer a todos y cada uno de vosotros el estar ahí, vuestra ayuda y el que me hayáis dejado imponer mi música en el laboratorio, aunque sepáis que yo tenía razón, que ya no hay música como los clásicos de los 70 y 80, en especial si viene de Dios, ya sabéis, Eric Clapton.

Quisiera agradecer tanto al Dr. Richard Palmiter como al Dr. Iain Campbell el haberme acogido en sus respectivos laboratorios. *Thank you very much for your help and for making me feel as part of your labs straightaway. I have really enjoyed having the possibility to stay with you and doing science in your labs.*

No quiero olvidar, por supuesto, toda la gente del departamento, me llevo vuestra amistad, los cafés, las risas y los buenos ratos y espero, que aunque sea para reiros, os acordéis de aquél que se pasaba todo el día cantando (a vuestro pesar).

Me gustaría agradecer a Olga el haber sido siempre tan atenta conmigo, sobre todo cuando le he pasado mil pedidos defectuosos y le he pedido mil favores y siempre ha estado ahí.

Mención especial a Raúl, un gran amigo tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias. Sólo puedo desearte lo mejor para ti, que te lo mereces y lo vales, de corazón. Sabes que nuestros caminos seguirán en contacto y que, nos quedan muchas laderas que *surfear*, así que a por ellas con una sonrisa en la cara.

No puedo olvidarme de mis amigos de toda la vida, que siempre han estado ahí, haciéndome creer en mí mismo y animándome siempre, tanto en lo bueno como en lo malo, siempre habéis estado a mi lado y sé que, cada paso que doy, estáis conmigo.

Gracias a mi familia, en especial a mis padres, porque sé los sacrificios que han hecho para verme cumplir mi sueño. Quiero que sepáis que, aunque no existe la manera de agradecerlos como se merece vuestra ayuda, esta tesis es más vuestra que mía. Con que sólo estéis orgullosos de mí una millonésima parte de lo que yo lo estoy de vosotros me sentiré enormemente recompensado.

Eli, no pensis que m'oblido de tu... Només volia dir-te que ja fa molt de temps que vam pujar en aquest vaixell i que cada cop veig més clar el rumb on ens porta la vida, i volia que sabessis que estic molt orgullós de poder fer-lo amb tu, em dones en un dia molt més del que et puc donar en tota la vida. Gràcies per fer-me tan feliç.

Por último, quería agradecer las becas recibidas para cumplir este sueño, pero he pensado que, como decían Tip y Coll, “**la semana que viene hablaremos del Gobierno**”.

Abreviaciones

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Célula presentadora de antígeno
APP	Proteína precursora amiloide
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
CSPG	Proteoglicanos de condroitín sulfato
EAE	Encefalitis autoinmune experimental
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EPO	Eritropoyetina
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GTP	Trifosfato de guanosina
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
ICE	Enzima convertidor de la Interleuquina-1 β
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
JAK	Quinasa Janus
KO	<i>Knock-out</i>
KSPG	Proteoglicanos de heparán sulfato
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfotoxina
MAP	Proteína activada por mitógeno
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMP	Metaloproteasa de matriz
MT	Metalotioneína
NGF	Factor de crecimiento neural
NFκB	Factor nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
NT-3	Neurotrofina-3
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
SNC	Sistema nervioso central
SOCS	Supresor de la señalización por citoquinas
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
TACE	Enzima convertidor de TNF- α
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptor Toll-like
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor de TNF
TRADD	Proteína asociada al dominio de muerte de TNF- α
TRAF	Factor asociado a TNFR
VIP	Péptido vasoactivo intestinal

Índice

I. Introducción	1
1. Particularidades inmunitarias del Sistema Nervioso Central	3
2. Control inmunitario en el Sistema Nervioso Central	4
2.1. Células residentes en el parénquima nervioso	5
2.1.1. Microglia	5
2.1.2. Astrocitos	6
2.2. Células circulantes	8
2.2.1. Sistema monocito/macrófago	8
2.2.2. Linfocitos	9
2.3. Consideraciones generales	10
3. Respuesta inflamatoria en el SNC	12
3.1. Reactividad glial	15
3.1.1. Microglia reactiva	15
3.1.2. Astrogliosis	20
3.2. Infiltración de células inmunitarias	24
4. Citoquinas en el SNC	29
4.1. Propiedades de las citoquinas	29
4.2. Clasificación de las citoquinas	30
4.2.1. Citoquinas de tipo I (hematopoyetinas)	31
4.2.2. Citoquinas de tipo II	33
4.2.3. Familia del TNF	34
4.2.4. Superfamilia de las inmunoglobulinas	34
4.2.5. Quimioquinas	35
5. Citoquinas y respuesta inflamatoria	35
5.1. TNF- α	39
5.1.1. Vías de señalización del TNF- α	39
5.1.2. Acciones del TNF α en el SNC	42
5.2. IL-6	45
5.2.1. Vías de señalización de IL-6	45
5.2.2. Acciones de la IL-6 en el SNC	46
5.2.3. Acción neuroprotectora de la IL-6	48
6. Metalotioneínas	49
7. La criolesión como modelo de lesión traumática	51
II. Objetivos	53
III. Resultados	55
Trabajo 1	59
Trabajo 2	77
Trabajo 3	97
Trabajo 4	115
Trabajo 5	131
Trabajo 6	157
IV. Discusión	171
1. Dinámica de la expresión génica en la criolesión	173
1.1. Selección de los genes	173
1.2. Caracterización del patrón temporal de expresión en la criolesión	174
2. El TNF α en el sistema nervioso central	176
2.1. Implicación del TNF- α en la actividad motora/exploratoria	176

2.2. Papel de los receptores del TNF- α en un modelo de lesión traumática.....	178
2.2.1. TNFR1 media la respuesta inflamatoria desencadenada por la criolesión.....	179
2.2.2. TNFR2 es el principal mediador de las acciones del TNF independientes de la inflamación.....	181
3. <i>Implicación de la IL-6 en el sistema nervioso central</i>	183
3.1. La señalización de la IL-6 en condiciones fisiológicas.....	183
3.2. Implicación de la IL-6 en el sistema nervioso central en un modelo de lesión traumática.....	184
3.2.1. La IL-6 modula la función neuronal.....	184
3.2.2. La IL-6 es proinflamatoria en la criolesión.....	186
3.2.3. La expresión de IL-6 promueve la supervivencia neuronal.....	187
4. <i>Implicación de las MTs en la respuesta a lesión traumática en el sistema nervioso central</i>	189
4.1. Los animales MTKO presentan una mayor predisposición a estrés oxidativo y muerte neuronal.....	190
4.2. La administración exógena de MT-I y II tiene una función neuroprotectora no dependiente de receptor.....	192
4.3. La administración de MT-III resulta perjudicial tras lesión al inhibir la síntesis de factores neurotróficos.....	194
5. <i>Conclusiones generales</i>	195
V. Bibliografía	197
VI. Anexos	229
<i>Anexo 1</i>	231

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Particularidades inmunitarias del Sistema Nervioso Central

Durante años se consideró al Sistema Nervioso Central (SNC -constituido por el encéfalo y la médula espinal-) como un conjunto de estructuras relativamente aisladas del resto del organismo, y en particular de la vigilancia del sistema inmunitario. Esta concepción se fundamenta en los trabajos de Medawar en los años 40, en los que se describe como alo-injertos colocados en el cerebro de un animal receptor presentan una mayor supervivencia (menor rechazo) que si son injertados en cualquier otra parte del organismo receptor. A partir de esta observación aparece el término de tejido “**inmuno-privilegiado**” para referirse a las particularidades del SNC (Medawar, 1948).

Medawar, como posible explicación, supuso que la ausencia de vasos linfáticos en el SNC impedía el drenaje de los alo-antígenos, siendo de esta forma secuestrados en el parénquima nervioso, evitando así una cascada de activación inmunitaria e inflamatoria clásica. Estudios posteriores, como los llevados a cabo por Streilein y colaboradores (1995), demostraron que más que un simple “secuestro” antigénico este estado de privilegio inmune es el resultado de múltiples mecanismos anatómicos, fisiológicos e inmunoreguladores dirigidos a restringir el reconocimiento en el SNC de moléculas exógenas, impedir la activación inmunitaria y desviar una respuesta inflamatoria nociva.

Se postula que la regulación diferencial de la inmunidad en el sistema nervioso central sería consecuencia obligada de la escasa (o nula) capacidad proliferativa y regenerativa de las neuronas, unidades funcionales y definitorias del sistema nervioso. Dado que la respuesta inflamatoria, asociada a la activación inmunitaria, implica la liberación de toda una pléyade de moléculas potencialmente nocivas para las células del tejido en que son secretadas, se explica la existencia de mecanismos de control específicos en tejidos especialmente sensibles (Nieder Korn, 2006).

El mecanismo de aislamiento más importante del parénquima nervioso, a parte de la aparente ausencia de drenaje linfático comentada anteriormente, es la existencia de la denominada **Barrera Hemato-Encefálica** (BHE). La BHE la forman, de manera principal, las uniones estrechas entre las células endoteliales que conforman los vasos que circulan por el SNC, de esta forma estos capilares son impermeables a la mayoría de moléculas y

sustancias circulantes, así como a células, aislando el SNC de la circulación periférica. Las particularidades de los capilares del sistema nervioso central vienen determinadas por un tipo de célula glial, los astrocitos, que mediante sus prolongaciones constituyen los denominados pies astrocitarios tapizando los capilares (de Boer y Gaillard, 2006).

Otro mecanismo importante de control de la función inmunitaria en el SNC es la reducida expresión de moléculas activadoras del sistema inmunitario tan importantes como el subtipo I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I), implicada en la presentación de antígenos víricos por parte de la célula infectada, provocando su lisis por parte de linfocitos T citotóxicos (Joly *et al.*, 1991). Por otra parte una serie de factores son producidos constitutivamente en el SNC e impiden el correcto funcionamiento de las células inmunitarias entre los más importantes podemos citar moléculas como Fas-ligando (FasL), factor inductor de la muerte celular por apoptosis en linfocitos T y neutrófilos (Choi Benveniste, 2004), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), péptido intestinal vasoactivo (VIP) o la hormona estimulante de melanocitos alfa (α -MSH), con marcadas acciones antiinflamatorias (Boche *et al.*, 2006, Delgado *et al.*, 2003, Ichiyama *et al.*, 1999, Rajora *et al.*, 1997).

2. Control inmunitario en el Sistema Nervioso Central

Pese a las particularidades descritas anteriormente, no debe pensarse que el SNC es una estructura que escapa de la vigilancia del sistema inmunitario. El tejido nervioso presenta una proporción reducida de leucocitos, tales como macrófagos y linfocitos, ya que, como se comentó anteriormente, su entrada en el parénquima nervioso está comprometida, y sin embargo, en situaciones de lesión o de invasión patógena en el sistema nervioso se activan señales que dan lugar a una respuesta inflamatoria. Por tanto, puede deducirse que este sistema posee una primera línea de defensa formada por células residentes, en concreto las células microgliales y los astrocitos, que serán las encargadas de reconocer situaciones de peligro para la integridad del tejido y facilitar la infiltración de células inmunitarias circulantes.

2.1. Células residentes en el parénquima nervioso

Las células gliales representan el 90% de células presentes en el sistema nervioso. Tanto la microglia como los astrocitos se enmarcan dentro de las denominadas células neurogliales. Este término fue acuñado por el científico alemán Rudolf Virchow (1846) para definir a todas aquellas células no neuronales del sistema nervioso a las que se les atribuyó un papel de soporte o de sostén, denominándolas *nervenkitt* (pegamento de los nervios), derivando posteriormente a glía, del vocablo griego *γλία* (pegamento, cola).

Como se ha esbozado anteriormente y se explicará más adelante, las células neurogliales son mucho más que un mero soporte para las neuronas, mostrándose vitales en la homeostasis del sistema nervioso central tanto en condiciones basales como después de lesión/daño o infección.

2.1.1. Microglia

Las células microgliales o microglia, representan el 10-20% de la población de células gliales. Fueron el penúltimo componente de la neuroglia identificado, en 1919, gracias a las investigaciones del histólogo Pío del Río-Hortega (recogidas en su trabajo de 1932) mediante el desarrollo de un método de impregnación argéntica con carbonato de plata amoniacal. Identificó estas células con “expansiones ramificadas liberales y con actividad migratoria y fagocítica” como el auténtico componente del denominado “tercer elemento” del SNC de Cajal (donde originalmente también se incluían los oligodendrocitos, que se identificarían con la misma técnica algo después), y observó que el origen de la microglia difería del resto de células gliales al ser mesodérmico en lugar de ectodérmico, sugiriendo que la microglia se formaría por migración, desde la piámadre al sistema nervioso, de corpúsculos embrionarios, similares a linfocitos, postulando que quizás se trataba de una célula derivada de monocitos circulantes.

Pese a que ha habido cierta controversia debida a la dificultad para seguir el desarrollo embrionario de las células microgliales, actualmente la visión predominante está de acuerdo con la hipótesis de del Río-Hortega, en cuanto a que son células relacionadas ontológicamente con el linaje de células mononucleares fagocíticas, en tanto en cuanto ambos tipos celulares (microglia y monocitos/macrófagos) comparten numerosos marcadores celulares (Kreutzberg, 1996, Stoll y Jander, 1999).

En condiciones basales, las células microgliales presentan una morfología ramificada. Se ha descrito que la interacción de CD200, una glicoproteína expresada en la membrana de neuronas funcionales, con su ligando CD200L, expresado en las células microgliales, mantiene a la microglia en este estado (Hoek *et al.*, 2000). Las células microgliales cubren con sus prolongaciones un territorio de unos 30-50µm y raramente muestran solapamiento entre ellas, pudiendo cubrir así la totalidad del parénquima nervioso (Raivich *et al.*, 1999), son consideradas el sensor SNC y están implicadas en su vigilancia (Kreutzberg, 1996). Contribuye a este papel de vigilancia el elevado grado de extensión y de retracción de sus prolongaciones (Cullheim y Thams, 2007). Las células microgliales por una parte expresan toda una variedad de moléculas tales como receptores para fragmentos del sistema de complemento (Stoll y Jander, 1999) o receptores para la región constante de las inmunoglobulinas G (FcγR) (Peress *et al.*, 1993), permitiendo de esta manera que puedan unirse a las inmunoglobulinas presentes, aunque en muy baja concentración, en el SNC (Raivich *et al.*, 1999). Por otra parte ya desde principios del siglo XX llamaron la atención las propiedades migratorias y fagocíticas de la microglia, así como su capacidad para pasar rápidamente de su forma ramificada a una morfología ameboide, semejante a macrófagos titulares, en respuesta a daño o infección. Esta capacidad fagocítica asociada a su capacidad de presentar antígenos en moléculas de histocompatibilidad de tipo II las convierte en las células presentadoras de antígenos (APC) del SNC (Stoll y Jander, 1999), iniciando por tanto la activación de la respuesta inmunitaria adquirida, aunque con menor eficiencia que las APC profesionales circulantes (Carson *et al.*, 2006).

2.1.2. Astrocitos

Se trata del tipo celular más abundante en el SNC. Si bien la microglia se sabe que es el tipo celular especializado en la vigilancia del SNC el papel de los astrocitos en el SNC, tanto en general como más concretamente en respuesta a daño, es aún controvertido.

La primera constancia de su existencia fue aportada en 1863 por Otto Dieters, discípulo de Virchow, y los denominó originalmente *Células de Dieters*, aunque debido a la apariencia estrellada por sus delgadas ramificaciones se acabaron denominando astrocitos. Clásicamente se clasificaron dos subtipos según su morfología: **fibrosos**, con pocas prolongaciones y alargadas, normalmente asociados a sustancia blanca, o **protoplasmáticos**, con multitud de ramificaciones cortas, normalmente asociados a sustancia gris, nomenclatura conservada en el

ámbito de la histología (Raivich *et al.*, 1999). Aunque estos subtipos son los mayoritarios, existen otras células astrogliales tanto en el SNC en desarrollo (glía radial) como en áreas concretas (glía de Müller en la retina, glía de Bergmann en el cerebelo y tanicitos en el suelo ventricular) (Ramirez-Exposito y Martinez-Martos, 1998).

La visión sobre el papel de los astrocitos en la fisiología del SNC ha variado notablemente. Sus funciones son diversas y de vital importancia. Anteriormente se ha comentado la íntima relación entre los capilares del SNC y las terminaciones (pies) astrocitarios y, aunque no hay evidencias concretas sobre el papel de los astrocitos en la formación de la BHE (Haseloff *et al.*, 2005), sí que está clara la influencia astrocitaria en el mantenimiento de las propiedades de la misma, así la expresión de TGF- β por los astrocitos afecta a la producción de proteínas anticoagulantes en las células endoteliales (Tran *et al.*, 1999) y la de factor neurotrófico derivado de la célula glial (GDNF) se ha sugerido que induce la funcionalidad de la barrera (Igarashi *et al.*, 1999). Por último los astrocitos o factores liberados por ellos también han sido propuestos como inductores de la expresión de moléculas antioxidantes en las células endoteliales, haciéndolas menos susceptibles a ellas, y por extensión al parénquima nervioso, al daño inducido por radicales libres (Schroeter *et al.*, 2001).

De la misma manera ha sido ampliamente descrita la implicación de los astrocitos en la homeostasis del espacio extracelular en el SNC, actuarían controlando la concentración de iones y el pH del medio (Sofroniew, 2005), y en la recaptación de neurotransmisores tales como glutamato y dopamina (He y Sun, 2007). Estas funciones se ven favorecidas por la elevada presencia de uniones comunicantes (*gap junctions*) en los astrocitos (Figiel *et al.*, 2007), permitiendo una redistribución de estas moléculas a áreas más lejanas y disminuyendo por tanto sus niveles locales.

Los astrocitos también participan en el establecimiento y maduración de las sinapsis (He y Sun, 2007) y cada vez existen más trabajos que sugieren a los astrocitos como células excitables químicamente, implicadas asimismo en la comunicación con células próximas, sobre todo con neuronas, dando lugar a la creación del término “**gliotransmisión**” (Volterra y Meldolesi, 2005).

Por último los astrocitos también participan en la neurogénesis y migración de neuronas. Las células madre (*stem cells*) neurales presentan marcadores celulares de astrocitos como la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y usan las vías migratorias formadas por un subtipo especial de astrocitos, la **glía radial** (He y Sun, 2007).

2.2. Células circulantes

Durante años se pensó que la presencia de células inmunitarias no residentes en el SNC era síntoma inequívoco de patología, ya que se creía que la BHE impedía la extravasación de células a un tejido sano. Sin embargo, se ha podido demostrar que este aserto si bien es cierto para el parénquima nervioso, no se corresponde totalmente con la realidad. Ya se ha comentado anteriormente que los vasos que circulan por el SNC están tapizados por los pies astrocitarios. Ambos tipos celulares presentan unas membranas basales que constituyen un espacio, denominado **espacio perivascular** (o espacio de Virchow-Robin en humanos), por el que fluye líquido cefalorraquídeo (LCR). En el interior de este espacio se encuentran diferentes tipos celulares, como son los pericitos, de origen mesenquimatoso; las células dendríticas, con reconocida actividad de APC así como los macrófagos perivasculares, fagocitos profesionales. Se ha descrito que estos tres tipos celulares son continuamente renovados en el SNC (Carson *et al.*, 2006) sugiriendo un tráfico constante de estas células a través de la BHE sin cambios detectables en su funcionalidad.

2.2.1. Sistema Monocito/Macrófago

El sistema monocito-macrófago pertenece al grupo de los denominados fagocitos mononucleares, elementos esenciales del sistema inmunitario (Figura 1), con capacidad para envolver bacterias, restos celulares y otras partículas, digerirlas y presentar partes de su estructura en moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC) tipo II, actuando por tanto como APC. Los monocitos se presentan como células circulantes con núcleo con forma de riñón y abundante citoplasma. No son muy abundantes en sangre, representando un 1-6% de los leucocitos totales, observándose que circulan alrededor de un día hasta establecerse en un tejido. Una vez establecidos en un tejido pasan a denominarse macrófagos (Parslow *et al.*, 2001).

En el SNC los monocitos son capaces de atravesar la BHE y de establecerse en los espacios perivasculares, siendo rara su presencia en el parénquima nervioso sano, probablemente por la falta de factores quimiotácticos (Stoll y Jander, 1999). Cuando un macrófago entra en contacto con mediadores inflamatorios, o cualquier otra señal de alteración del sistema, incrementa su tasa metabólica, su movilidad y su actividad fagocítica, siendo este proceso denominado **activación macrofágica** (Parslow *et al.*, 2001). Para esta

correcta activación los macrófagos disponen de una gran cantidad de receptores para quimioquinas, citoquinas y otros factores implicados en la respuesta inflamatoria aunque se observa una heterogeneidad en la expresión según el subtipo de macrófago (Gordon y Taylor, 2005) que es la que determinará su tejido diana preferencial así como su mecanismo de activación (Gordon, 2003).

2.2.2. Linfocitos

Los linfocitos son células pequeñas (5-12 μ m), redondeadas, con un núcleo esférico que ocupa casi la totalidad de la célula. Se conocen tres linajes de linfocitos, los linfocitos T, los linfocitos B y las células NK (natural killer), células que poseen características propias que las alejan de los otros dos. Los linfocitos son los elementos clave de la denominada respuesta inmune adquirida (Figura 1), siendo los linfocitos T el linaje más abundante en sangre, comprendiendo el 75% del total de linfocitos circulantes (Parslow *et al.*, 2001).

Los linfocitos B maduran en la médula ósea y son los encargados de la producción de inmunoglobulinas tras ser activados de manera específica por un antígeno o por linfocitos T colaboradores (*helper*), siendo los máximos exponentes de la respuesta humoral dentro de la respuesta inmune adquirida. Los linfocitos T por el contrario son los máximos implicados en la respuesta celular de la respuesta inmune adquirida. Este subtipo celular se produce en la médula ósea y madura en el timo, diferenciándose en dos posibles fenotipos, los **colaboradores** (del inglés *helper*) que expresan el marcador CD4 en su superficie, y los **citotóxicos**, expresando CD8 en su membrana. Los linfocitos T que no han sido activados (vírgenes) migran entonces a órganos linfoides secundarios (mayormente al bazo o a los ganglios linfáticos) donde esperarán ser activados de manera específica por una APC (Abbas *et al.*, 2000). En la figura 1 puede seguirse el patrón de activación de estas células y su implicación en la respuesta inmune.

Una vez activados, los linfocitos T proliferan y entran en la circulación general, desde donde patrullarán diferentes tejidos hasta dar de nuevo con el antígeno específico que reconocen e iniciar una respuesta inmune completa (Parslow *et al.*, 2001).

En cuanto a su capacidad de entrada en el SNC, se ha demostrado la entrada de linfocitos T activados en el SNC sin síntomas de neuropatología (Flugel *et al.*, 2001, Hickey *et al.*, 1991, Shrikant y Benveniste, 1996), por lo tanto pueden atravesar las células endoteliales sin afectar a las uniones estrechas mediante el proceso denominado transmigración celular, consistente

en la formación de una estructura transitoria con apariencia de poro que permite el paso del linfocito (Wolburg *et al.*, 2005). Otro mecanismo de entrada descrito está relacionado con la extravasación (diapédesis) a través del endotelio fenestrado de los plexos coroideos, de manera que a través del epitelio pasarían directamente al LCR (Ransohoff *et al.*, 2003).

2.3. Consideraciones generales

Tal y como hemos descrito en los puntos anteriores, el SNC está sometido a una estrecha vigilancia del sistema inmunitario, tanto por células residentes como por células inmunitarias circulantes. La infiltración de estas últimas en el SNC, aunque limitada, no está impedida, observándose un tráfico constante entre la circulación general y los espacios perivasculares. Sin embargo el parénquima nervioso está virtualmente libre de macrófagos y linfocitos circulantes, sugiriendo que son las condiciones locales del tejido y no la BHE *per se*, las que limitan su infiltración.

El parénquima nervioso, por otra parte, está estrechamente controlado por las células residentes del SNC, especialmente la microglia, que mediante sus ramificaciones puede vigilar la práctica totalidad del tejido nervioso. La activación de las células microgliales está inhibida también por las señales químicas presentes en un microambiente de SNC sano.

Queda claro, sin embargo, que en situaciones de infección o daño, donde se da una destrucción celular y tisular, se perderá la inhibición de las células encargadas de la primera línea de defensa del SNC, la microglia (y en menor medida los astrocitos), y por lo tanto serán estas células las que iniciarán la cascada de señales que favorecerá la infiltración masiva de células circulantes, principalmente macrófagos y linfocitos, dando lugar al establecimiento de la respuesta inflamatoria.

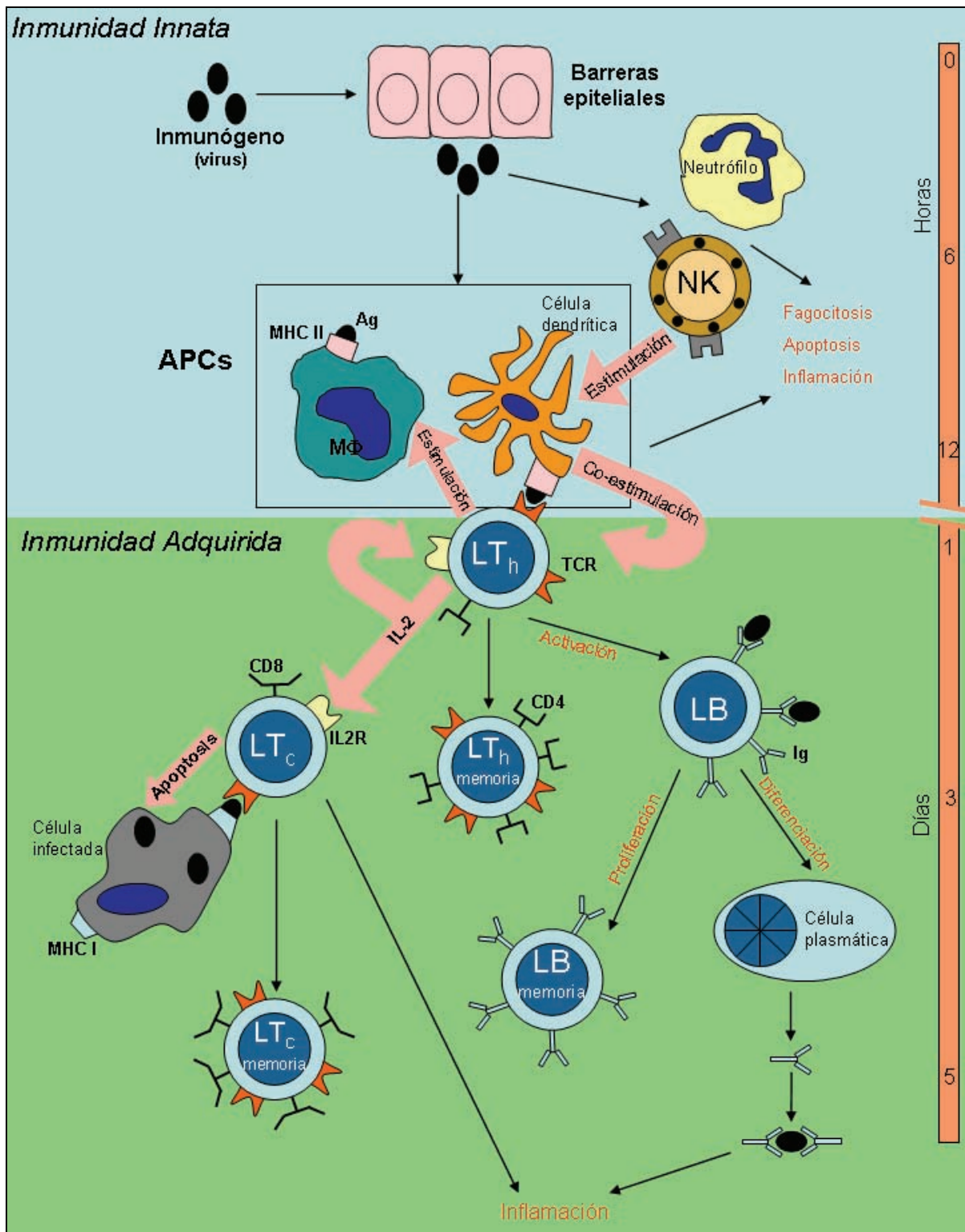


Figura 1: Secuencia de sucesos en una respuesta inmune prototípica.

Cuando un inmunógeno consigue cruzar las barreras epiteliales se inicia la respuesta inmune innata, en primer lugar con la activación de fagocitos (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas) así como células natural killer (NK) que inducirán la apoptosis de las células infectadas. Por otro lado, las células con capacidad APC procesarán el antígeno y lo presentarán en moléculas MHC-II a linfocitos T helper, que iniciarán la respuesta inmune adquirida, más tarde. Los LT helper activarán a macrófagos, a linfocitos B (LB)-que hayan reconocido el antígeno previamente- estimulando su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos, y a LT citotóxicos, que inducirán la muerte de células infectadas que muestren antígenos víricos en moléculas MHC-I. **Adaptado de Parslow et al., 2001 y de Abbas et al.,**

3. Respuesta inflamatoria en el SNC

Hemos descrito hasta ahora, tanto en la figura 1 como en el texto, cómo la respuesta inflamatoria está íntimamente ligada a la respuesta inmune, en tanto en cuanto las células del sistema inmunitario son las principales productoras de factores pro-inflamatorios.

Puede considerarse el proceso inflamatorio como una respuesta esencial de la defensa del huésped frente a agresiones tales como trauma, isquemia o infección, que acompaña la infiltración de las células inmunitarias (Parslow *et al.*, 2001). Esta respuesta tiene un componente local muy importante activando una serie de mecanismos que intentarán limitar el daño y eliminar los posibles patógenos (Correale y Villa, 2004, Schmidt *et al.*, 2005) y también suele generar una respuesta sistémica denominada **respuesta de fase aguda** que redundará en la limitación del daño (Gibson *et al.*, 2004), observándose activación de los ejes simpático-medulo-adrenal e hipotálamo-pituitario-adrenal y cambios conductuales como somnolencia, anorexia y, en caso de infección, fiebre. Otros signos y síntomas clásicos de la inflamación incluyen edema, rojez, sensación de quemazón en la zona afectada y en ocasiones dolor, relacionados con la liberación de mediadores inflamatorios tales como factores del complemento, proteínas de fase aguda y citoquinas, que serán producidos mayoritariamente por las células del sistema inmune que habrán sido reclutadas en respuesta al daño. La entrada de leucocitos en el SNC, sin embargo, es más lenta que en otros tejidos (Lucas *et al.*, 2006), debido a la existencia de las barreras físicas y químicas anteriormente descritas, y se compensa por la activación de la primera línea de defensa del SNC, microglia y astrocitos (Raivich *et al.*, 1999). Pese a esta diferencia en su dinámica de activación, la respuesta inflamatoria comparte múltiples coincidencias con la que se observa en el resto de tejidos del organismo. Los elementos clave de la respuesta inflamatoria en el parénquima nervioso serían los siguientes (Lucas *et al.*, 2006):

- **Activación glial**
 - a. Expresión de moléculas MHC
 - b. Activación del sistema de complemento
 - c. Expresión de moléculas de adhesión
- **Síntesis de mediadores inflamatorios**
 - a. Citoquinas, radicales libres y prostaglandinas

- **Invasión de células del sistema inmunitario**
 - a. Inflamación general
 - b. Síntesis de proteína de fase aguda
 - c. Edema

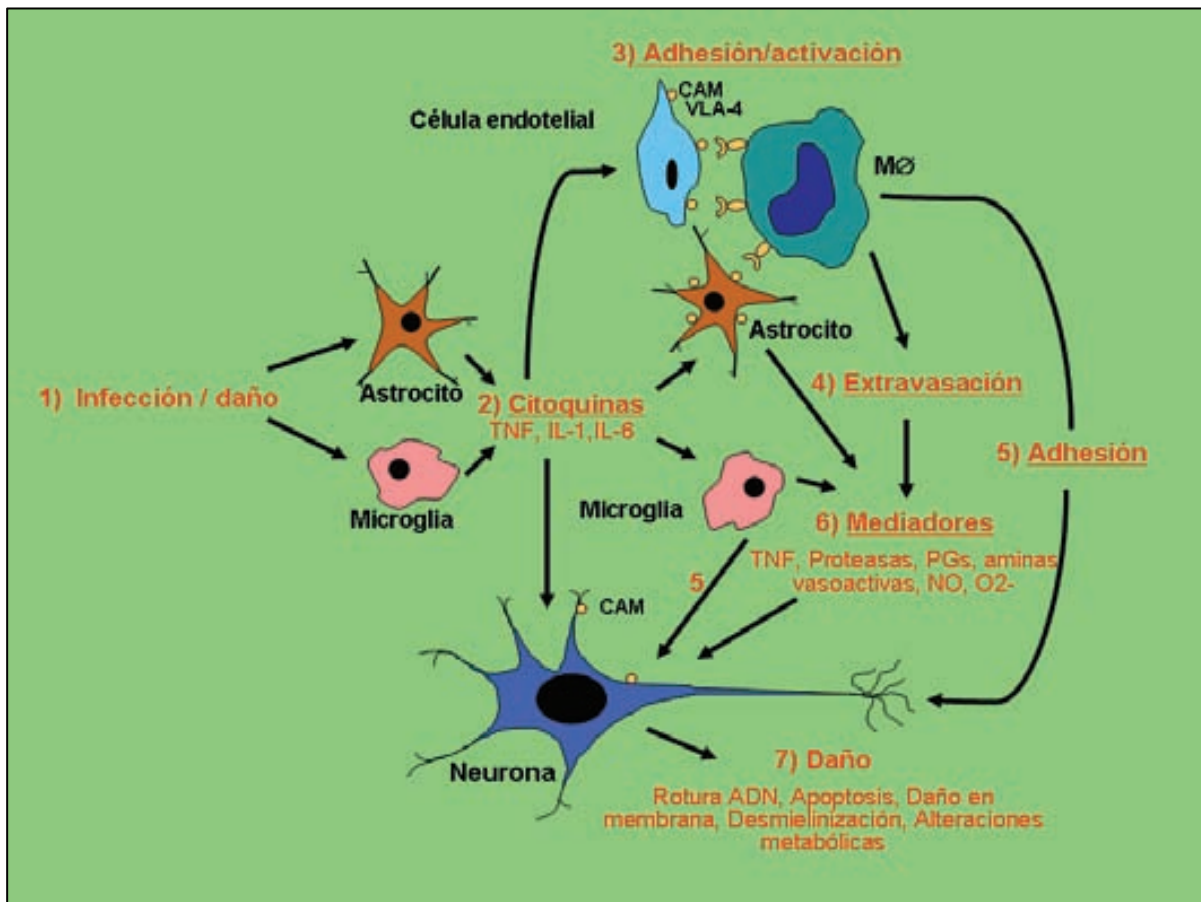


Figura 2: Cascada inflamatoria en el sistema nervioso central.

Cualquier daño ocasionado al sistema nervioso central (1) desencadena la respuesta tanto de microglia como de astrocitos, que liberarán citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 o IL-6 (2). Estos factores inducen la expresión de moléculas de adhesión como CAM tanto en células endoteliales y neuronas como en los propios astrocitos y microglia asociados a los espacios perivascuales (3). Las moléculas de adhesión promoverán la infiltración de macrófagos y linfocitos circulantes mediante la unión con VLA-4 o LFA-1 (4). Estas uniones dirigirán a los leucocitos a través del parénquima nervioso (5) y serán estos mediante la secreción de citoquinas los que exacerbarán la respuesta de los astrocitos y microglia, induciendo su migración, proliferación y activación, así como promoviendo que liberen aún más citoquinas con capacidad para estimular la actividad tanto de las células gliales como de macrófagos y linfocitos, promoviendo la liberación de mediadores inflamatorios tales como proteasas, aminas vasoactivas, prostaglandinas, óxido nítrico y radicales libres (6). Todos estos mediadores son capaces de amplificar la inflamación así como de contribuir directamente al daño en el parénquima nervioso por diferentes mecanismos (7). **Adaptado de Muñoz-Fernández y Fresno, 1998.**

Los elementos clave de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central responden a un patrón claramente definido tal y como puede observarse en la figura 2. Esta cascada sigue la misma dinámica independientemente del tipo de daño causado al SNC, ya sea infección, isquemia o trauma (Lucas *et al.*, 2006, Muñoz-Fernández y Fresno, 1998,

Schmidt *et al.*, 2005). Tanto astrocitos como microglia detectarán el daño primario ocasionado al parénquima nervioso, activándose y dando lugar a la respuesta conocida como **reactividad glial**. Las células gliales reactivas liberarán una serie de factores implicados en la respuesta inflamatoria, siendo los más importantes un grupo de citoquinas con marcado carácter pro-inflamatorio como son el **factor de necrosis tumoral alfa** (TNF- α), y las **interleuquinas (IL)-1** e **IL-6** (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998, Tonelli y Postolache, 2005, Truettner *et al.*, 2005). La expresión de estas citoquinas en el sistema nervioso sano es muy baja y sus funciones fisiológicas son relativamente pocas en comparación con su papel y su nivel de expresión frente a patología, demostrando la existencia de un importante sistema de regulación de su producción (Lucas *et al.*, 2006). Al ser liberadas, promoverán la expresión de toda una variedad de factores tales como moléculas de adhesión, anafilotoxinas del sistema del complemento o quimioquinas (Schmidt *et al.*, 2005) tanto por los mismos astrocitos y microglia como por otros tipos celulares como neuronas o células endoteliales (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998).

La cascada inflamatoria facilita la entrada de macrófagos y linfocitos a las zonas afectadas, promoviendo su adhesión y su activación, que vendrá a su vez asociada a la liberación de diferentes factores pro-inflamatorios como la caspasa-1 (o enzima convertidor de interleuquina-1 β), que promoverá el procesamiento del precursor de IL-1 β promoviendo su activación (Lindberg *et al.*, 2004), las metaloproteasas de matriz (MMP), que degradarán la matriz extracelular facilitando la penetración de las células inmunitarias (Romanic *et al.*, 1998, von Gertten *et al.*, 2003), se liberarán también prostaglandinas y aminas vasoactivas implicadas en la vasodilatación asociada a procesos inflamatorios y que dará lugar a edema (Lucas *et al.*, 2006). Tanto la vasodilatación como el edema facilitan nuevamente la infiltración de macrófagos y linfocitos. Se ha observado que en la vasodilatación cerebral las células endoteliales se retraen creando espacios entre ellas que son aprovechados por los leucocitos para infiltrarse (Zeng *et al.*, 2000). Por último, otros factores liberados: el óxido nítrico y los radicales libres (Hendriks *et al.*, 2005, Munoz-Fernandez y Fresno, 1998), producidos por diferentes células activadas, darán lugar a muerte neuronal por diferentes mecanismos, (v.g. daño en el ADN, rotura de la membrana neuronal, desmielinización o apoptosis por cualquier otra causa) sobre todo en los alrededores de la zona dañada primariamente, conocida como zona de penumbra, aunque puede darse también en zonas distantes pero que estén conectadas con la zona lesionada (Block *et al.*, 2005). El proceso de muerte celular causado por la respuesta inflamatoria desencadenada por el insulto primario se conoce como muerte celular secundaria. Además, a este daño secundario contribuye de

manera importante el glutamato liberado a partir de células muertas por necrosis, que provocará, mediante el incremento en los niveles de calcio intracelular la muerte por excitotoxicidad de células no dañadas primariamente (Lo *et al.*, 2005). En este sentido, el bloqueo de la respuesta inflamatoria es neuroprotector e incrementa la neurogénesis tanto *in vitro* (Chechneva *et al.*, 2006) como *in vivo* (Monje *et al.*, 2003).

Si bien la inflamación, tal y como se ha acaba de describir, puede considerarse como un mecanismo con un marcado componente nocivo, no deja de tener como función principal el limitar y controlar posibles daños así como eliminar en algunos casos las causas del mismo (Correale y Villa, 2004). En este sentido, durante la respuesta inflamatoria también se producen factores tróficos y de supervivencia neuronal (Morrison *et al.*, 2000). Este fino equilibrio entre los aspectos nocivos y los protectores es el que determinará el destino de la zona dañada (Wang y Shuaib, 2002).

Como se describirá a continuación, tanto las células gliales reactivas como las células inmunitarias que se infiltren jugarán un papel esencial en el equilibrio en función de los estímulos locales que reciban en la zona afectada.

3.1. Reactividad Glial

3.1.1. Microglia Reactiva

La capacidad de la microglia para retraer progresivamente sus ramificaciones hasta llegar a una morfología amebode y, como puede observarse en la figura 3A, semejante a la de los macrófagos titulares, ya era conocida desde principios del siglo pasado (Kreutzberg, 1996). Esta activación microglial es rápida y posee unas etapas claramente definidas tanto desde un punto de vista morfológico como molecular (Figura 3B y Tabla 1).

Cuando la microglia detecta la existencia de una agresión del SNC, como por ejemplo por acción de IL-1 (Gibson *et al.*, 2004) o por la rotura de la BHE (Stoll y Jander, 1999), se observa una primera fase de activación denominada **estado de alerta (estadio 1)**. Esta respuesta se da en las primeras 24 horas después de la agresión, el cambio más evidente es la retracción de las ramificaciones acompañada por una hipertrofia del soma, dando lugar a una apariencia más robusta de la célula (Raivich *et al.*, 1999).

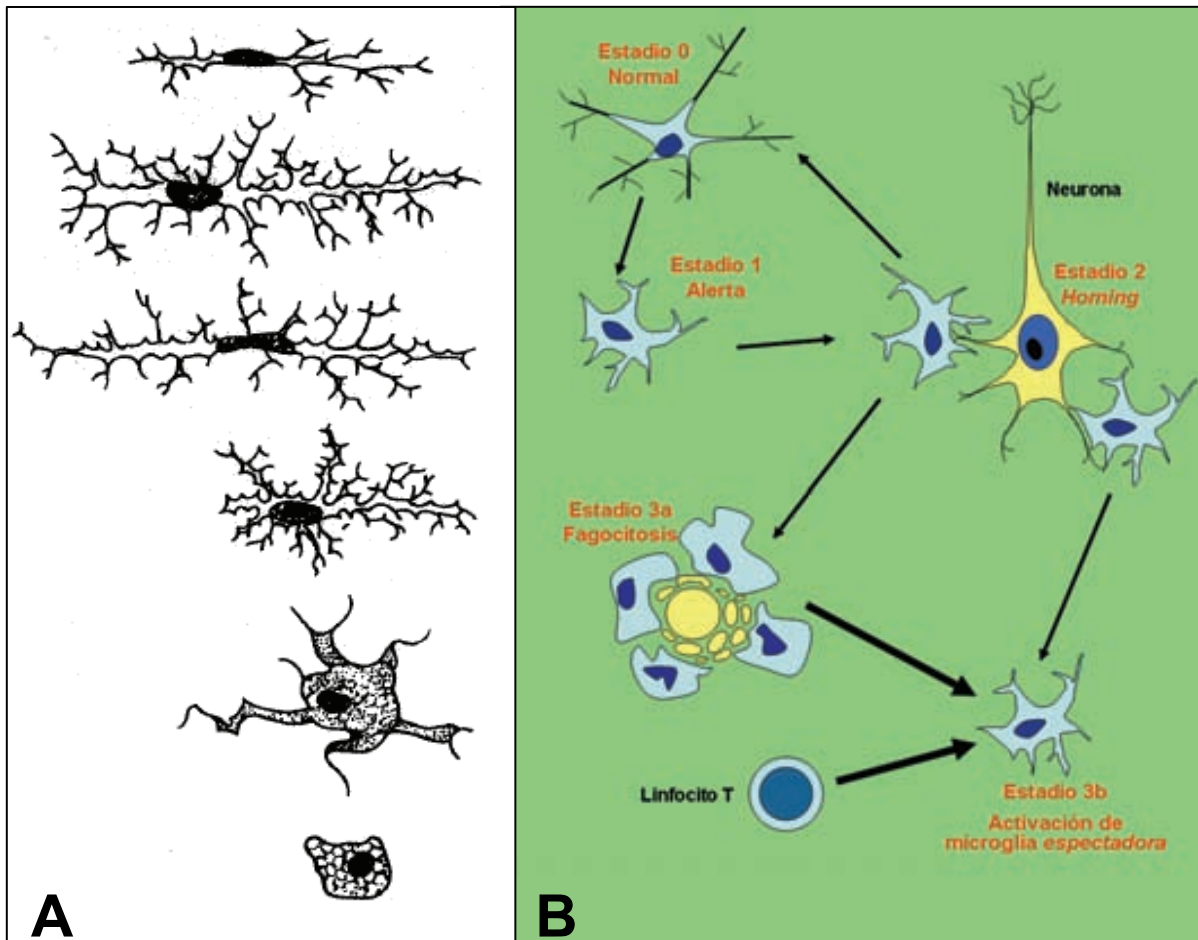


Figura 3: Activación de las células microgliales

A) Dibujo de A.M. Jakob (1927) donde se describen los cambios morfológicos que sufren las células microgliales. Se observa una progresión desde un estado ramificado (reposo), pasando por un retracción e hipertrofia de las prolongaciones hasta llegar a una morfología amebioide con capacidad fagocítica. **Extraído de Kreutzberg, 1996.** B) Visión actual de las fases de activación de las células microgliales. La microglia ramificada, en reposo (estadio 0: normal) responderá a daño en el neuropilo con un rápido cambio en la forma, pasando a ser una célula más robusta con ramificaciones más cortas (estadio 1: estado de alerta). Estas células se distribuirán alrededor de células dañadas (estadio 2: *homing*), pero si no existe un daño adicional volverán gradualmente al estado de reposo. Si existe muerte celular, la microglia se transforma en una célula amebioide fagocítica (estadio 3a: fagocitosis). Estos focos fagocíticos pueden activar a células microgliales cercanas no-fagocíticas (estadio 3b: activación de microglia espectadora – bystander-). Linfocitos T reactivos también pueden activar a células microgliales. **Adaptado de Raivich et al., 1999.**

Los cambios morfológicos suceden aunque la síntesis proteica esté inhibida (Kurpius *et al.*, 2006), comprobándose que, sin embargo, existe un incremento asociado en la expresión de moléculas con función inmune tales como inmunoglobulinas (Ig) G, trombospondina, proteína de matriz extracelular que podría estar implicada en la migración de la microglia y su unión a neuronas dañadas (Moller *et al.*, 1996) o el receptor para el producto 3ib del complemento, también conocido como la integrina- α M β 2 (Kloss *et al.*, 1999). ICAM1, molécula implicada en la adhesión celular de diferentes tipos de leucocitos (Abbas *et al.*, 2000), y de la proteína precursora amiloide (APP) en microglia en estadio 1. Esta molécula puede contribuir a procesos degenerativos como la enfermedad de Alzheimer u otras demencias (Banati *et al.*, 1993). En este sentido, se ha observado que la proteína amiloide

(A β), producto del procesamiento anómalo de APP, inhibe la formación y el mantenimiento de las uniones comunicantes entre astrocitos, impidiendo por tanto la comunicación entre estos y suprimiendo de manera notable su papel neuroprotector (Meme *et al.*, 2006). En esta fase inicial puede empezar a observarse la expresión de MHC-II, que se mantendrá durante todas las fases de activación, y que las convertirá en células APC (Raivich *et al.*, 1999), aunque mucho menos eficientes que otras APC profesionales como las células dendríticas (Becher *et al.*, 2006, Carson *et al.*, 2006).

La segunda etapa de activación microglial se caracteriza por el proceso de **extensión (*homing*)** y adhesión a estructuras lesionadas (Figura 3B), por lo que es lógico que se observe un incremento en la expresión de integrinas, centrándonos en el ratón, se trata de las integrinas α 1 β 5 y α 6 β 1 (Tabla 1). También se observa una reducción aún más marcada de las ramificaciones (Kurpius *et al.*, 2006), lo que implica cambios en la expresión de moléculas implicadas en el citoesqueleto como la vimentina (Graeber *et al.*, 1988) o la actina (Christensen *et al.*, 2006). Todos estos cambios facilitarán la unión a las células dañadas. Los mecanismos por los cuales la microglia activa se dirige hacia estas zonas distan de estar elucidados pero la existencia de un gradiente de quimioquinas es la explicación más plausible al presentar la microglia receptores para múltiples quimioquinas (Farber y Kettenmann, 2005) y, en este sentido, se ha descrito que la expresión por parte de las neuronas dañadas tanto de fractalquina (Harrison *et al.*, 1998) como de la quimioquina de tejido linfoide secundario (SLC) (Biber *et al.*, 2001) promueve la migración microglial, otros factores como las purinas han sido también propuestos como factores implicados en el proceso de *homing* (Kurpius *et al.*, 2007).

Tabla 1: Marcadores moleculares de la activación microglial en ratón. Adaptado de Raivich et al, 1999

Grado de Activación	Tipo de respuesta	Marcadores específicos
Estadio 0	Cerebro normal	Fc γ R (d), IgG (d), α M β 2 (d)
Estadio 1	Estado de alerta	IgG (m), α M β 2 (f), ICAM1 (f)
Estadio 2	<i>Homing</i>	α 5 β 1 (f), α 6 β 1 (f), MCSFR (s), MHC-I (d), B7.2 (d), IgG (m)
Estadio 3a	Fagocitosis	MHC-I (f), B7.2 (f), α X β 2 (f), α M β 2 (f), α 5 β 1 (f), α 6 β 1 (f), ICAM1 (f), IgG (f), ED1 (f)
Estadio 3b	Activación <i>bystander</i>	MHC-I(m), B7.2(m), α 4 β 1(m), α M β 2 (m), ICAM1(m), IgG(m)
Estadios 1-3	Respuesta mediada por el sistema inmunitario	MHC-II (f), iNOS (f)
Abreviaciones	d: débil m: moderado f: fuerte	

La fase de activación microglial cumple una función esencial en procesos de axotomía, en los que se observa como la microglia se dispone en íntimo contacto con las neuronas dañadas y participa en la separación de los elementos pre-sinápticos de los post-sinápticos existentes tanto en el soma como en las dendritas de las células afectadas. Este mecanismo es conocido como *synaptic stripping* (Cullheim y Thams, 2007). El proceso se produce de manera predominante en las sinapsis glutamatérgicas respecto a las GABAérgicas, sugiriendo que se trata de un mecanismo que promueve minimizar la excitación de las neuronas dañadas (Linda *et al.*, 2000).

Se ha descrito que la proliferación de la microglia asociada al proceso de *stripping* es máxima entre los 2 y 4 días después de la axotomía (Cullheim y Thams, 2007), habiéndose observado la liberación de mitógenos como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-SCF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) por parte de la microglia (Nakajima *et al.*, 2006). Estos factores actuarían de manera autocrina o paracrina ya que la activación microglial se acompaña de un incremento de los receptores para estos mitógenos (Raivich *et al.*, 1999).

Por otra parte en esta etapa se incrementa la expresión de MHC-I en la microglia, habiéndose asociado un papel activo de este factor en el proceso de *stripping*, sugiriéndose que el reconocimiento de este factor entre microglia y neuronas es imprescindible para el mantenimiento de las sinapsis (Cullheim y Thams, 2007). Sin embargo, no debe descartarse un papel más clásico de esta molécula en la presentación de antígenos a linfocitos infiltrados, puesto que también se observa un incremento en la expresión de moléculas inmunoaccesorias como B7.2 (Bohatschek *et al.*, 2004).

La activación de la microglia no es un proceso irreversible, por lo que si no existe un daño adicional se observa una disminución del número de células activadas, perdiendo progresivamente marcadores de activación (Tabla 1) hasta volver a un estado ramificado (estadio 0). La presencia de muerte celular, sin embargo, induce el cambio de morfología de la microglia hacia un fenotipo ameboide con capacidad **fagocítica (estadio 3a –Figura 3B-)**, cuya función sería pues la de eliminar los restos celulares causados al hacer frente a agresiones físicas o a determinadas patologías (Langmann, 2007, Liu y Hong, 2003, Schwab *et al.*, 2001).

A nivel molecular, el estado de fagocitosis comporta un incremento de la expresión de la mayoría de marcadores ya presentes en fases anteriores, incluyendo moléculas de adhesión celular tales como las integrinas $\alpha 1\beta 5$, $\alpha X\beta 2$ y $\alpha 6\beta 1$, trombospondina o ICAM1, que participarán en el reconocimiento e internalización de los diferentes componentes de los

restos celulares (Raivich *et al.*, 1999). También se ve incrementada la expresión de moléculas con funciones inmunitarias, tales como el receptor para Fc γ , B7, MHC-I y MHC-II, y aparece también marcaje para ED1, presente en los fagolisosomas característicos de este estadio de activación (Stoll y Jander, 1999). La participación de todas estas moléculas sugiere el importante papel de este estadio de la microglia en la presentación de antígenos específicos a linfocitos T, activándose de esta forma la respuesta inmune adquirida (Raivich y Banati, 2004, Remington *et al.*, 2007), otros trabajos sugieren que el papel de la microglia como célula APC es mucho menor que el de las células dendríticas o monocitos circulantes que se infiltran en el SNC (Becher *et al.*, 2006, Miller *et al.*, 2007), por lo que su función, de ser cierto, podría estar más implicada en el fortalecimiento de las uniones entre linfocitos y células APC. En este sentido, la integrina α X β 2 ha sido descrita como facilitadora de las uniones con linfocitos cuando se expresa en células dendríticas (Raivich *et al.*, 1998).

Por último cabe destacar que el proceso de fagocitosis induce una activación en la microglia adyacente (**estadio 3b: activación de microglia bystander o espectadora –Figura 3B-**), observándose un incremento en la expresión de MHC-I, B7.2, y de las integrinas α 4 β 1 y α M β 2. Las células microgliales no adoptan una morfología ameboide ni presentan actividad fagocítica, disponiéndose de manera concéntrica al nódulo fagocítico. Este hecho, sumado a que a medida que aumenta la distancia respecto al centro disminuye su expresión, sugiere un gradiente de citoquinas y quimioquinas solubles liberadas por la microglia fagocítica (Kim y de Vellis, 2005, Raivich *et al.*, 1999). Como puede observarse en la tabla 1, en este estadio la expresión de marcadores de superficie se encuentra reducida en comparación con la microglia fagocítica. Este hecho unido a la ausencia de la integrina α X β 2 sugiere que las uniones con linfocitos podrían estar disminuidas y por tanto no ser activados de la misma manera que cuando entran en contacto con microglia fagocítica, de manera que podría tratarse de un mecanismo de modulación de la respuesta inmune adquirida. La modulación funcionaria de manera bidireccional, puesto que la producción de IFN- γ por parte de linfocitos activados induce la producción de la MHC-II y de la enzima sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) en múltiples especies (Raivich *et al.*, 1999), aunque no en microglia humana (Kim y de Vellis, 2005). Esta enzima está implicada en la producción de óxido nítrico (NO), que reaccionará con radicales superóxido para formar peroxinitrito, compuesto oxidante extremadamente agresivo que inducirá daños en cada una de las macromoléculas biológicas pudiendo llegar a causar la muerte celular, predominantemente en neuronas (Brown y Bal-Price, 2003), sin embargo en determinadas patologías como la encefalitis

autoinmune experimental se ha señalado un papel protector de la iNOS microglial (Fenyk-Melody *et al.*, 1998, Sahrbacher *et al.*, 1998). Finalmente se ha descrito otro mecanismo de control de la función inmunitaria de la microglia que vendría dado por el papel inhibitor de las neurotrofinas NGF, BDNF y NT-3 en la expresión de MHC-II microglial (Neumann, 2001).

3.1.2. Astrogliosis

La respuesta al daño por parte de los astrocitos más demostrada y caracterizada es el incremento en la expresión de filamentos intermedios, en especial de la proteína glial fibrilar ácida (**GFAP** por sus siglas en inglés), aunque también se observa expresión de otros filamentos como la vimentina (Pekny y Nilsson, 2005). Este incremento está mediado por la expresión de citoquinas, habiendo sido descrito el papel esencial tanto de la IL-6 (Chiang *et al.*, 1994) como de la vía TGF- α / EGFR (Rabchevsky *et al.*, 1998) en esta respuesta. Por el contrario, la expresión de TGF- β inhibe la reactividad astrogliar (Vergeli *et al.*, 1995).

Los cambios en las proteínas del citoesqueleto provocarán una evidente hipertrofia en los astrocitos, que puede ir acompañada de proliferación o de migración en casos de daño severo (Silver y Miller, 2004, Sofroniew, 2005). De la misma forma, los astrocitos reactivos reducen sus funciones de soporte y comunicación para adquirir nuevas funciones más acordes con la situación de daño que sufre el tejido (Correa-Cerro y Mandell, 2007). En este sentido ya hemos comentado anteriormente el papel de la microglia reactiva en la reducción de las uniones comunicantes entre astrocitos (Meme *et al.*, 2006), alterando, por tanto, la capacidad tamponadora de los mismos. El hecho de que los astrocitos puedan adquirir funciones esenciales tras el daño se deben a que se trata de células mucho más resistentes a lesiones o situaciones hipóxicas que las neuronas o las células endoteliales, debido a que pueden incrementar su capacidad glicolítica y así generar suficiente ATP mediante glicólisis anaeróbica, lo que asegurará la supervivencia celular, seguirán por tanto participando en la recaptación de glutamato que es liberado al espacio extracelular en condiciones hipóxicas y/o de daño y que contribuye a la muerte celular excitotóxica (Haseloff *et al.*, 2005). Sin embargo, existe un delicado equilibrio en este mecanismo, se ha descrito una disminución de los transportadores de glutamato tras lesión, que puede revertirse mediante la acción de los factores de crecimiento EGF, TGF- α , FGF o PDGF (Figiel *et al.*, 2007). Además los astrocitos reactivos sintetizan gran variedad de factores, tanto tróficos como potencialmente

proinflamatorios y/o tóxicos (Suzumura *et al.*, 2006). Este ejemplo muestra claramente el importante papel que los diferentes estímulos que reciben las células, es decir, el microambiente que las rodea, juegan en la determinación de los mecanismos de muerte o de supervivencia celular subsecuentes.

La función, sin embargo, más extensamente descrita de los astrocitos reactivos es la formación de la denominada **cicatriz glial** (Silver y Miller, 2004, Sofroniew, 2005). La cicatriz glial tiene como función principal el aislamiento físico de la zona lesionada y por tanto su separación del resto de tejido sano y la reparación de la barrera hematoencefálica, con lo que tiene un papel beneficioso en el bloqueo del daño, observándose que la inhibición de la cicatriz glial induce un incremento de la infiltración leucocitaria y de la degeneración neuronal (Bush *et al.*, 1999). En ese mismo trabajo Bush y colaboradores (1999) describen, sin embargo, que el bloqueo de la cicatriz glial favorece el crecimiento de neuritas, por lo que puede deducirse que si bien se trata de un mecanismo que promueve la supervivencia neuronal, impide la regeneración axonal a través de la zona dañada.

La cicatriz glial está formada por astrocitos reactivos, que envolverán, como se ha dicho, la zona dañada y producirán moléculas de matriz extracelular como los proteoglicanos, que jugarán un papel esencial en el aislamiento del tejido (Silver y Miller, 2004). Los proteoglicanos tienen una gran capacidad inhibidora sobre el crecimiento de las neuritas, y son ellos y no la barrera de astrocitos *per se* (que se formará más adelante) los que impiden la regeneración neuronal (Busch y Silver, 2007). Asimismo, en el SNC se han descrito otras moléculas inhibidoras del crecimiento axonal, como la mielina, que por acción de Nogo-A, una molécula asociada a ella, jugará un papel esencial en situaciones de muerte de oligodendrocitos o destrucción de vías nerviosas como es el caso de enfermedades desmielinizantes (Fontoura y Steinman, 2006).

La formación de la cicatriz glial se inicia como respuesta a la rotura de la BHE, que propicia la entrada de moléculas externas al SNC en el parénquima nervioso, siendo directamente proporcional la activación de la barrera, el nivel de rotura de la BHE y la infiltración leucocitaria (Preston *et al.*, 2001). Los macrófagos activados inducen la migración de los astrocitos desde el foco de la lesión a los alrededores de la misma, facilitando así la formación de la cicatriz y la síntesis de proteoglicanos. Sin embargo, esta migración astrocitaria puede tener otras consecuencias perniciosas como son la axotomía secundaria y la formación de uniones glía-neurona aberrantes (Silver y Miller, 2004).

Existe una heterogeneidad en los componentes de la cicatriz glial, que viene determinada por el grado de afectación del tejido, en todos los casos, sin embargo, se observa

infiltración de macrófagos y liberación de proteoglicanos (condroitín sulfatos –CSPGs- o queratán sulfatos – KSPGs-) (figura 4). En lesiones en las que se produce una afectación

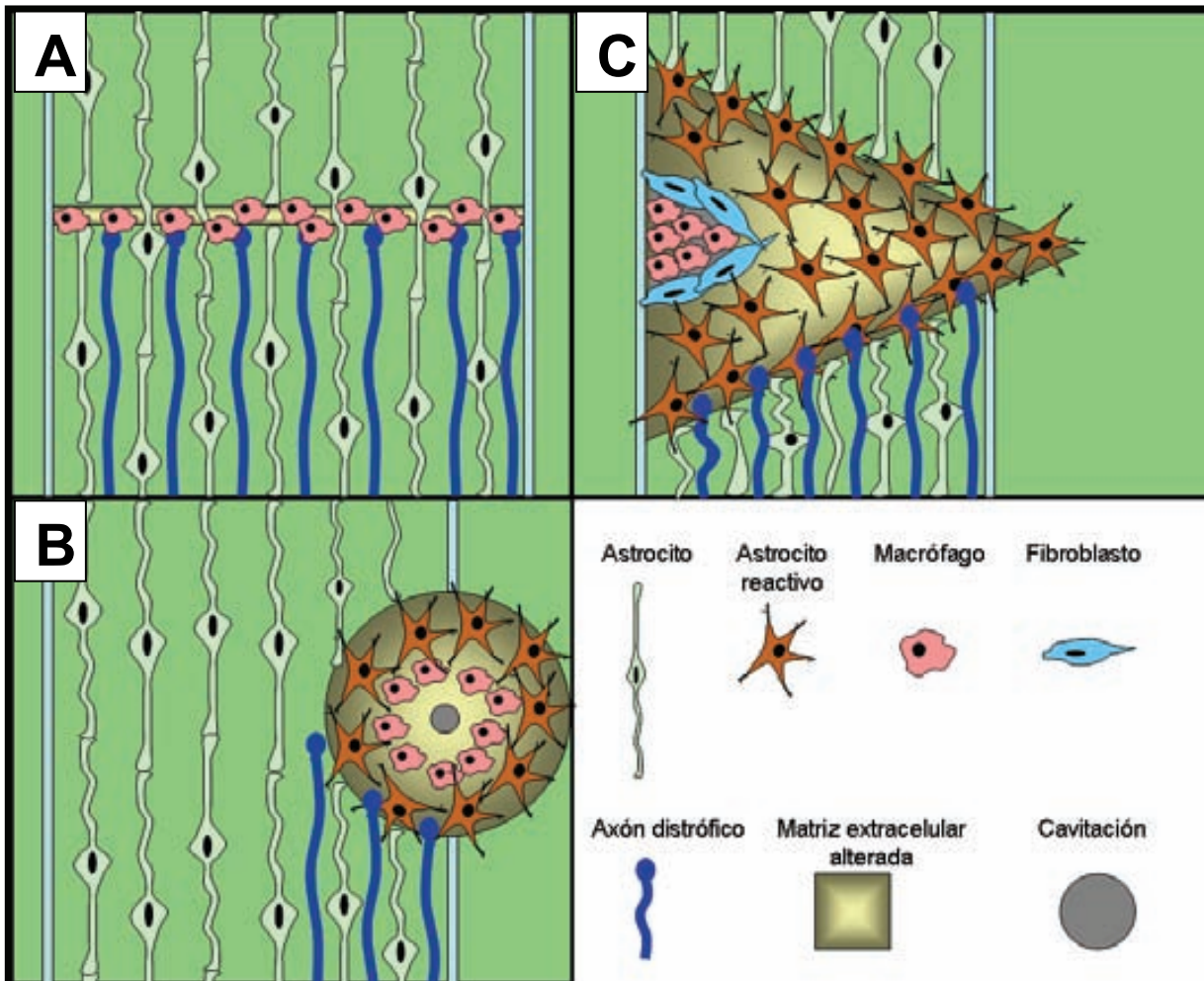


Figura 4: Representación esquemática de tres lesiones estereotípicas del SNC

Los tres tipos de lesión se observa como fenómenos comunes la infiltración de macrófagos y la inducción y liberación de proteoglicanos, fundamentalmente proteoglicanos del condroitín sulfato (CSPGs) y del heparán sulfato (KSPGs).

A) Microlesión. No se observa alteración en la alineación de los astrocitos debida a la lesión, pero los axones son incapaces de regenerar a través de la zona lesionada. **B) Lesión contusiva.** No se observa rotura de las meninges, pero produce cavitación del tejido así como deposición de proteoglicanos. Los axones son incapaces de regenerar a través de la lesión, aunque puede existir algún axón en zonas distales a la lesión. **C) Lesión incisiva.** Se observa penetración en las meninges y permite la infiltración de fibroblastos. El gradiente existente de CSPGs y KSPGs provoca la repulsión de los axones, aunque otros factores inhibidores y repulsares son producidas por acción de los fibroblastos en este tipo de lesión, predominantemente en el centro (*core*) de la lesión. **Adaptado de Silver y Miller, 2004.**

mínima de la BHE (figura 4A) se observa una producción de CSPGs y KSPGs a lo largo del área dañada por parte de los astrocitos, aunque éstos siguen manteniendo su alineación normal. Esta liberación de proteoglicanos es suficiente para inhibir la regeneración axonal más allá del punto de la lesión, el cual será invadido por macrófagos.

En casos más severos, como una contusión (Figura 4B), se observa rotura de la BHE pero la integridad de las meninges se mantiene. En esta situación, los macrófagos se infiltran en la zona lesionada mientras que los astrocitos se disponen alrededor de la misma, dándose

un proceso de reactividad e hipertrofia (Miyake *et al.*, 1988). Este movimiento celular induce la cavitación en el epicentro de la lesión, y al mismo tiempo los astrocitos reactivos producen un gradiente de CSPGs y KSPGs desde la zona alrededor de la lesión (*penumbra*) hasta el centro de la lesión. Nuevamente los axones que encuentren este microambiente serán incapaces de atravesarlo, si bien pueden encontrarse axones que hayan conseguido rodear el fuerte componente inhibitorio de la lesión.

Si el daño es tan grave como para producir rotura de meninges (como sería en una lesión por incisión cortante – Figura 4C-) además de los procesos descritos anteriormente, como son la infiltración de macrófagos en la zona dañada, la alineación de astrocitos alrededor de la zona lesiona, la liberación de proteoglicanos y cavitación de la zona lesionada, debe añadirse la entrada de fibroblastos, la cual inducirá en los astrocitos reactivos la expresión de TGF, ephrin-B2 y de proteínas de la familia Slit. TGF- β 2 actuará incrementando la producción de proteoglicanos en los astrocitos (Asher *et al.*, 2000, Lagord *et al.*, 2002). Ephrin-B2 se unirá a su receptor EPHB2, expresado en fibroblastos, y mediará en la segregación de ambos tipos celulares en la zona de la lesión, creándose capas separadas de fibroblastos y astrocitos (Bundesen *et al.*, 2003). Por último, las proteínas Slit han sido caracterizadas como reguladores del crecimiento axonal y de la migración celular (Brose y Tessier-Lavigne, 2000). Los fibroblastos asimismo influyen directamente en la inhibición de la regeneración axonal al expresar moléculas repelentes del crecimiento axonal como la semaforina 3A (SEMA3A) (Pasterkamp *et al.*, 2001). SEMA3A se une a neuropilina 1, que se induce en neuronas distróficas, inhibiendo de manera notable la penetración de neuritas a través de la barrera de fibroblastos en la zona lesionada (Silver y Miller, 2004).

No todos los tipos neuronales responden igual a la inhibición axonal mediada por los proteoglicanos y el resto de factores anteriormente comentados. Además, los astrocitos reactivos también producen determinados factores como la laminina y la fibronectina que pueden favorecer la migración de determinados tipos de axones (Kawaja y Gage, 1991) o factores tróficos como NGF, NT-3 o GDNF, cuyo papel facilitador de la regeneración axonal ha sido demostrado (Blesch y Tuszynski, 2001, Ramer *et al.*, 2000).

Puede observarse, por tanto, como la reactividad astrogliar juega un doble papel esencial, por un lado limitando el daño e impidiendo su extensión, aún con un elevado coste que se traduce en la inhibición/reducción del potencial de regeneración axonal y por otro en el control de la supervivencia de las células no afectadas en primera instancia por la lesión mediante la producción de una compleja serie de factores protectores y/o perniciosos.

3.2. Infiltración de células inmunitarias

La infiltración masiva de leucocitos en el SNC es uno de los signos más evidente de la respuesta inflamatoria. Tal y como se ha comentado anteriormente la entrada mayoritariamente de neutrófilos, macrófagos y linfocitos ha sido extensamente descrita en multitud de procesos lesivos o infecciosos del SNC. El grado de infiltración, por otra parte, responde directamente a la severidad del daño (Raivich *et al.*, 1999), propiciando la liberación de las citoquinas TNF- α , IL-1 e IL-6 por parte de microglia y astrocitos que promueven la expresión de moléculas de adhesión y de quimioquinas en determinados tipos celulares, incluyendo las células endoteliales, facilitando así la entrada de células leucocitarias (Konsman *et al.*, 2007, Munoz-Fernandez y Fresno, 1998).

En la migración leucocitaria las quimioquinas, que son una familia de citoquinas, desempeñan un papel esencial. Han sido descritas unas 50 quimioquinas, repartidas en 4 familias en función de la conservación estructural de residuos de cisteína específicos (Charo y Ransohoff, 2006). Existe una cierta especificidad en el reclutamiento leucocitario de cada una de las quimioquinas, debido en gran parte a la expresión diferencial de receptores en cada tipo celular, ya que normalmente las quimioquinas pueden unirse a más de un tipo de receptor. En la tabla 2 se especifican las cuatro familias así como las principales quimioquinas para cada tipo de leucocito. Los receptores de las quimioquinas son proteínas ancladas en la membrana plasmática asociadas a proteínas G. Cuando existe interacción entre el ligando y su receptor específico se pone en marcha la cascada de señalización, siendo la acción mejor descrita el incremento en la avidéz y afinidad de las integrinas leucocitarias por sus receptores endoteliales, y jugando por tanto un papel esencial en la migración de leucocitos al SNC y hacia las áreas de inflamación o daño (Rebenko-Moll *et al.*, 2006), así como modulando repuestas biológicas tales como la secreción enzimática, adhesión celular, citotoxicidad, crecimiento tumoral, degranulación y activación de linfocitos T (Mennicken *et al.*, 1999). También se las ha implicado en la comunicación entre neuronas y glía (Adler *et al.*, 2005).

La entrada de neutrófilos vendrá inducida, mayoritariamente, por la expresión de las quimioquinas CXCL8 (IL-8), CXCL1 (GRO- α /KC) y CXCL2 (MIP-2) (Charo y Ransohoff, 2006, McColl *et al.*, 2007). Confirmando este papel, se ha descrito que la entrada y activación de neutrófilos están inhibidas en animales knock-out para los receptores CXCR1 y CXCR2, responsables de la señalización de estos factores (Del Rio *et al.*, 2001, Godaly *et al.*, 2000)

Los neutrófilos poseen una gran capacidad fagocítica, y juegan un papel esencial en la degradación de tejidos mediante la liberación de diferentes factores como la metaloproteinasas

Tabla 2: Familias de quimioquinas y principales atractores de leucocitos. Adaptado de Rebenko-Moll et al, 2006.

Familia	Receptores	Ligandos
Quimioquinas CC	CCR1-CCR10	CCL1-CCL28
Quimioquinas CXC	CXCR1-CXCR6	CXCL1-CXCL16
Quimioquinas CX ₃ C	CX ₃ CR1	CX ₃ CL1
Quimioquinas XC	XCR1	XCL1-XCL2

Tipo Celular	Receptores	Ligandos
Monocitos	CCR1, CCR5 CCR2	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8 CCL2, CCL12
Linfocitos T	CCR7 CCR5 CXCR3	CCL19, CCL21 CCL5 CXCL9, CXCL10, CXCL11
Linfocitos B	CXCR4, CXCR5	CXCL12, CXCL13
Células NK	CX3CR1	CX3CL1
Neutrófilos	CXCR1 CXCR2	CXCL8, CXCL6 CXCL8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6

Nota: Cabe destacar que aún siendo ésta la nomenclatura convencional, todavía puede observarse en algunas publicaciones los nombres clásicos de cada uno de estos factores. En el texto se usan ambos al describirse algún factor importante. Asimismo, en el anexo 1 puede consultarse una lista con los diferentes sinónimos.

de matriz MMP-9 (Justicia *et al.*, 2003), una de las endopeptidasas implicadas en la degradación de la BHE y de la matriz extracelular en procesos lesivos (Cunningham *et al.*, 2005). En patologías como la encefalitis autoinmune experimental (EAE), modelo animal de la esclerosis múltiple, se ha demostrado que los neutrófilos contribuyen en el proceso patológico al inhibir la actividad de los linfocitos T supresores (Zehntner *et al.*, 2005). Por último, la entrada y activación de neutrófilos comportará una entrada asociada a ellos de granulocitos, con lo que se liberarán mediadores tales como histamina y otras aminas vasoactivas que promoverán la vasodilatación y edema, facilitando la extravasación de más leucocitos (Charo y Ransohoff, 2006).

Los neutrófilos a su vez son fuente de quimioquinas que propiciarán la migración de monocitos/macrófagos, siendo las más importantes CCL2 (MCP-1) y CCL3 (MIP-1 α) tanto en procesos autoinmunes (Nygardas *et al.*, 2000) como en lesiones traumáticas (Yamagami *et al.*, 1999), sugiriendo una entrada secuencial de los diferentes tipos leucocitarios, aunque también contribuyen a esta migración otras quimioquinas tales como CCL4 (MIP-1 β), CCL5

(RANTES), CCL8 (MCP-2) y CCL12 (MCP-5), expresadas tanto por células residentes como por leucocitos infiltrados, mostrando un papel esencial de los receptores CCR1, CCR2 y CCR5 en la migración de monocitos (Charo y Ransohoff, 2006, Rebenko-Moll *et al.*, 2006).

En este sentido, los ratones deficientes en CCL2 muestran una menor infiltración de macrófagos en un modelo de esclerosis múltiple (Huang *et al.*, 2001) y en procesos isquémicos (Minami y Satoh, 2003), observándose los mismos efectos en ratones deficientes para CCR2 (Babcock *et al.*, 2003, Fife *et al.*, 2000), se ha descrito que la expresión de CCR2 en las células endoteliales facilita la migración transendotelial de macrófagos, pese a que existen otros mecanismos independientes de CCR2, probablemente vía CCR5 (Dzenko *et al.*, 2005).

La entrada de macrófagos se considera un proceso beneficioso en las primeras fases de diferentes modelos experimentales. Estaría implicada en la fagocitosis de residuos celulares, permitiendo la remodelación y regeneración de la zona lesionada (Schwartz *et al.*, 1999), probablemente mediante la liberación de factores tróficos tales como IGF-I (O'Donnell *et al.*, 2002) o bFGF (Frautschy *et al.*, 1991), y participaría en la recirculación de lípidos necesarios para la formación de nuevas membranas (Schwartz, 2003). Cabe destacar, sin embargo, que tanto la tasa de migración como la capacidad fagocítica de los macrófagos que se infiltran en el SNC está disminuida en comparación con los que se infiltran en lesiones del sistema nervioso periférico (SNP), lo que puede contribuir a explicar el porqué de la menor regeneración observada en el SNC (Schwartz *et al.*, 1999, Stoll y Jander, 1999).

Pese al papel beneficioso de los macrófagos, por su misma naturaleza fagocítica y de eliminación de patógenos, producen al ser activados una gran variedad de factores potencialmente neurotóxicos. Entre ellos se encuentran los constituyentes del denominado estrés oxidativo: las especies reactivas del oxígeno (EROs) y el óxido nítrico. Las EROs, que incluyen los radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno, son producidas en niveles fisiológicos como producto de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, teniendo las células toda una batería de factores antioxidantes para combatirlos. Durante la respuesta inflamatoria, sin embargo, son liberadas elevadas cantidades de radicales libres por parte de los macrófagos, pudiendo producir daños en lípidos, ácidos nucleicos y proteínas y activando mecanismos apoptóticos en las células afectadas (Hendriks *et al.*, 2005). Las EROs, por otra parte, pueden conjugarse con el óxido nítrico (NO), que en condiciones normales actúa como neuromodulador y/o vasodilatador. En la inflamación el NO ve incrementada su producción debido a la inducción de su sintasa (sintasa inducible de óxido nítrico, o iNOS, por sus siglas en inglés) en macrófagos y también en microglia (Lewen *et al.*, 2000),

pudiendo reaccionar con los radicales superóxido para formar peroxinitrito, compuesto altamente reactivo, que provoca alteraciones en las macromoléculas celulares, induciendo la muerte celular apoptótica, posiblemente al inhibir la función mitocondrial (Stewart *et al.*, 1998).

El glutamato, que es el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC, es otro de los factores implicados en el papel neurotóxico de los macrófagos, ya que pueden liberar grandes cantidades de este factor (Hendriks *et al.*, 2005). Su exceso causa la muerte neuronal por excitotoxicidad asociada a la entrada de iones calcio, activando diferentes mecanismos intracelulares que culminarán en daño neuronal causado por diferentes factores, entre ellos proteasas como la **calpaína**, que impide la eliminación del calcio intercelular, pero también otros como el **ácido araquidónico**, la **fosfolipasa A₂**, el **óxido nítrico** y las **EROs** (Bano y Nicotera, 2007, Dugan *et al.*, 1995). Si a ello le sumamos que tanto NO como las EROs pueden inhibir la recaptación de glutamato extracelular en astrocitos y oligodendrocitos, tenemos su doble contribución en el proceso de muerte neuronal (Werner *et al.*, 2001).

El bloqueo de la migración de macrófagos al SNC se ha mostrado, por lo explicado anteriormente, suficiente para evitar los signos neuropatológicos en un modelo animal de esclerosis múltiple (Huitinga *et al.*, 1990). Este claro efecto puede deberse a la capacidad de los macrófagos de atraer y facilitar la activación de los linfocitos, y por ende de la respuesta inmune adaptativa, que juega un papel vital en este modelo (Fife *et al.*, 2000). Las diferentes, y opuestas, acciones de los macrófagos podrían explicarse por las diferentes señales que reciben y que inducen su activación, habiéndose descrito a nivel periférico una notable heterogeneidad en las poblaciones de los macrófagos, pudiendo ser bien **pro-inflamatorios y citotóxicos** o, por el contrario, **neuroprotectores** (Gordon, 2003), aunque no se haya podido establecer todavía la frecuencia e incidencia de cada una de estas poblaciones en patologías del SNC.

Por último, también desempeña un papel importante la entrada de linfocitos en el SNC. La migración de linfocitos, tal y como puede observarse en la tabla 2, viene dada por la señalización a través de los receptores CCR5, CCR7 y CXCR3 para linfocitos T y por CXCR4 y CXCR5 para linfocitos B (Rebenko-Moll *et al.*, 2006). Los macrófagos pueden promover la entrada de linfocitos mediante la expresión de CXCL13 (BCA-1), aunque se ha descrito la expresión de muchos de estos factores en células residentes del parénquima nervioso así como en células endoteliales (Calderon *et al.*, 2006, Krumbholz *et al.*, 2006).

Los linfocitos, por formar parte de la respuesta inmune adquirida están implicados por tanto en las respuestas dirigidas por antígenos, ya sean patógenos (infección) o propios

(respuestas autoinmunes). Si bien la respuesta inmune adquirida ya ha sido explicada anteriormente en respuesta a infecciones, no está tan clara la participación de cada uno de los tipos linfocitarios en procesos autoinmunes. En uno de los modelos más extensamente estudiados, la EAE, se ha observado un papel esencial de los linfocitos T en el desarrollo de la patología, siendo los linfocitos helper (CD4+) los principales inductores de la enfermedad, concretamente el subtipo Th₁, que, una vez activados por APCs profesionales, probablemente células dendríticas o macrófagos, iniciarían la respuesta patológica mediante la síntesis de las citoquinas IFN- γ y IL-2, atrayendo tanto a linfocitos T citotóxicos (CD8+) que atacarán a las células mediante la liberación de sus gránulos (Gold *et al.*, 2006), como a un subtipo de linfocitos T recientemente descrito, los Th₁₇ (Komiyama *et al.*, 2006), que mediante la síntesis de IL-17 atraerán más neutrófilos a la vez que potencian el proceso inflamatorio (Ruddy *et al.*, 2004). Este proceso marcadamente neuropatológico, como es de suponer, dispone de un sistema de regulación, mediante las acciones antiinflamatorias del subtipo Th₂, que libera IL-4 e IL-10, así como de un subtipo de linfocitos T, los denominados reguladores, que bloquearán directamente las acciones de los LT inflamatorios (Kasper *et al.*, 2007).

Cabe destacar, sin embargo, que la implicación relativa de cada uno de los subtipos varía según la patología. En pacientes con esclerosis múltiple se postula una acción predominante de los LT citotóxicos (Friese y Fugger, 2005) y de los linfocitos B, al haberse encontrado anticuerpos contra proteínas de la mielina en plasma (Vojdani *et al.*, 2003) y LCR (Olsson, 1994), contrariamente a lo observado en la EAE, donde los linfocitos B desempeñarían un papel secundario o en todo caso regulador (Mizoguchi y Bhan, 2006), al ser posible inducir la EAE en animales sin LB (Eugster *et al.*, 1998). Por otra parte, el subtipo Th₂ parece ser el implicado en la patogénesis de algunos tipos de síndrome nefrótico (Maier *et al.*, 2007) así como en la respuesta alérgica en las vías respiratorias (Kearley *et al.*, 2007). La extrema complejidad de estas respuestas queda demostrada al haberse observado que los LT Th₂ son suficientes para provocar la EAE en animales que no disponen de LT Th₁ (Gold *et al.*, 2006).

En situaciones traumáticas o de isquemia se ha descrito la infiltración de linfocitos, tanto B como T (Penkowa *et al.*, 2003a), contribuyendo a los procesos patogénicos. La rotura de la BHE incrementa la accesibilidad de determinados antígenos protegidos del CNS, contribuyendo a la respuesta inflamatoria de una manera similar a la descrita para la EAE, sobre todo mediante la liberación de los gránulos de LT citotóxicos (Arumugam *et al.*, 2005). Se ha postulado, sin embargo, que el papel de estos linfocitos infiltrados en lesiones

traumáticas es justamente el contrario, inhibir la aparición de posibles respuestas autoinmunes mediante la potenciación del subtipo Th₂ de LT (Gee *et al.*, 2007).

4. Citoquinas en el SNC

4.1. Propiedades de las citoquinas

En los capítulos anteriores hemos descrito el proceso inflamatorio desde el punto de vista de las células implicadas, quedando de manifiesto por una parte la variedad de factores liberados por los diferentes tipos celulares que inician y/o contribuyen significativamente en la respuesta inflamatoria subsiguiente a daño en el SNC y por otra parte como las citoquinas son los factores implicados en la comunicación entre el sistema inmunitario y el nervioso.

En el sentido estricto de la palabra, una citoquina es una molécula producida por una célula y que tiene un efecto en otra, de manera general han sido consideradas como los factores de crecimiento y hormonas del sistema inmunitario y del hematopoyético (Ozaki y Leonard, 2002). En sentido práctico bajo el término citoquina se engloba un heterogéneo grupo de factores que, por motivos históricos, presenta una nomenclatura diversa y poco esclarecedora, bien basada en el tipo celular en la que fueron inicialmente aisladas (v.g. monoquinas, linfoquinas) o bien por la primera acción descrita para cada una de ellas (v.g. oncoestatina, factor de necrosis tumoral, linfoquinas), y que no siempre se corresponde con su acción principal (Kushner, 1998). Una vez se observó que la misma citoquina podía ser producida por diferentes leucocitos y que participaban normalmente en la comunicación entre leucocitos se optó por denominarlas interleuquinas y, aunque posteriormente se identificó la expresión de citoquinas por células no leucocitarias, permitió una cierta homogeneidad en la nomenclatura, siendo este término usado para las nuevas citoquinas (Abbas *et al.*, 2000)

Pese a la complejidad y diversidad existente entre citoquinas, sí que se han podido establecer unas características generales, que, aún existiendo excepciones, ayudan a definir qué factores pueden considerarse citoquinas, diferenciándolos de otros tipos de mediadores solubles como las hormonas.

Las citoquinas son **proteínas** generalmente **secretadas**, de bajo peso molecular y que son **producidas de novo** en respuesta a un estímulo inmune y su secreción es un **acontecimiento breve**. Normalmente se encuentran a **concentraciones muy bajas**, aunque

en determinados casos puedan incrementarse notablemente los niveles en respuesta a agresiones. Su acción es en general **autocrina** o **paracrina** (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998) aunque en casos en los cuales existe una concentración elevada pueden actuar de manera **endocrina**. De igual forma que otros factores peptídicos, las citoquinas inician sus acciones mediante la unión a receptores de membrana específicos, habitualmente con una gran afinidad (K_d típica en el rango de $10^{-10}M$ o $10^{-12}M$), lo que explica que se necesiten cantidades muy pequeñas para producir un efecto biológico (Abbas *et al.*, 2000). Es también muy habitual que una misma citoquina presente diversas acciones (**pleyotropismo**) así como que se den acciones **redundantes** entre diferentes citoquinas, sobre todo *in vitro*. El pleyotropismo puede explicarse por la existencia de receptores para una misma citoquina en diferentes tipos celulares y/o por la existencia de diferentes cascadas de señalización intracelular. La redundancia puede ser explicada, por lo menos en parte, por la existencia de receptores o vías de señalización compartidos por diferentes citoquinas (Ozaki y Leonard, 2002). En este sentido es importante comentar que la activación de las vías de señalización de las citoquinas viene determinada por el agrupamiento de receptores inducido por el ligando, lo que inducirá a su vez la agrupación de las porciones citoplasmáticas de dos o más moléculas receptoras promoviendo el reclutamiento de los factores de señalización intracelular (Abbas *et al.*, 2000). Por último, como consecuencia de toda esta variedad en la señalización, es muy habitual encontrar casos de **antagonismo** o **sinergismo** en las acciones de diferentes pares de citoquinas (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998).

4.2. Clasificación de las citoquinas

La diversidad de las citoquinas, así como su redundancia y pleyotropismo, no han ayudado en exceso a su clasificación, existiendo incluso discrepancias entre qué factores pueden ser considerados citoquinas, un ejemplo lo tenemos en la clasificación o no de los factores de crecimiento como citoquinas, pese a mostrar algunos de ellos receptores homólogos a los de algunas citoquinas (Kushner, 1998). Es quizás por estos motivos que existen diferentes clasificaciones para las citoquinas, desde las basadas en el origen celular a otras que toman en consideración las acciones biológicas de cada una de ellas (Abbas *et al.*, 2000). La dificultad para discernir la relación estructural entre diferentes citoquinas contribuyó a que no apareciera una clasificación más coherente. No fue hasta la identificación y caracterización de los receptores de las citoquinas que se observaron semejanzas

estructurales en los dominios extracelulares de unión a citoquinas lo que permitió la clasificación más aceptada actualmente (Boulay *et al.*, 2003) y según la cual, excluyendo los factores de crecimiento, se caracterizan 5 grandes familias:

- Receptores de **citoquinas de tipo I** (hematopoyetinas)
- Receptores de **citoquinas de tipo II** (interferones y la familia de IL-10)
- Receptores del **TNF**
- Receptores de la **superfamilia de las Inmunoglobulinas (Ig)**
- Receptores de **siete hélices alfa transmembrana** (Quimioquinas)

En la figura 5A pueden observarse de manera esquemática las características de las diferentes familias de receptores.

4.2.1. Citoquinas de tipo I (Hematopoyetinas)

Las citoquinas de este numeroso grupo actúan a través de receptores que contienen una o más copias de un dominio con cuatro cisteínas conservadas (C4) en el extremo N-terminal y una secuencia proximal a la membrana de dos dobletes triptófano-serina (WSXWS), donde X es cualquier aminoácido. Esta región de 200 aminoácidos, que deriva filogénicamente de dominios similares a fibronectina, se ha denominado dominio del receptor de la hematopoyetina, dando nombre al grupo (Boulay *et al.*, 2003). Las citoquinas que se unen a estos receptores presentan un plegamiento de cuatro hélices alfa. La especificidad para cada una de ellas viene determinada por los residuos de aminoácidos, diferentes de un receptor a otro (Abbas *et al.*, 2000), habiéndose descrito tres (o cuatro para determinados autores) subgrupos o **familias**:

- Familia de receptores de la **IL-6** (subunidad gp130 común/neuropoyetinas)
- Familia de receptores de la **IL-2** (cadena γ común)
- Familia de receptores del **GM-CSF** (cadena β común)

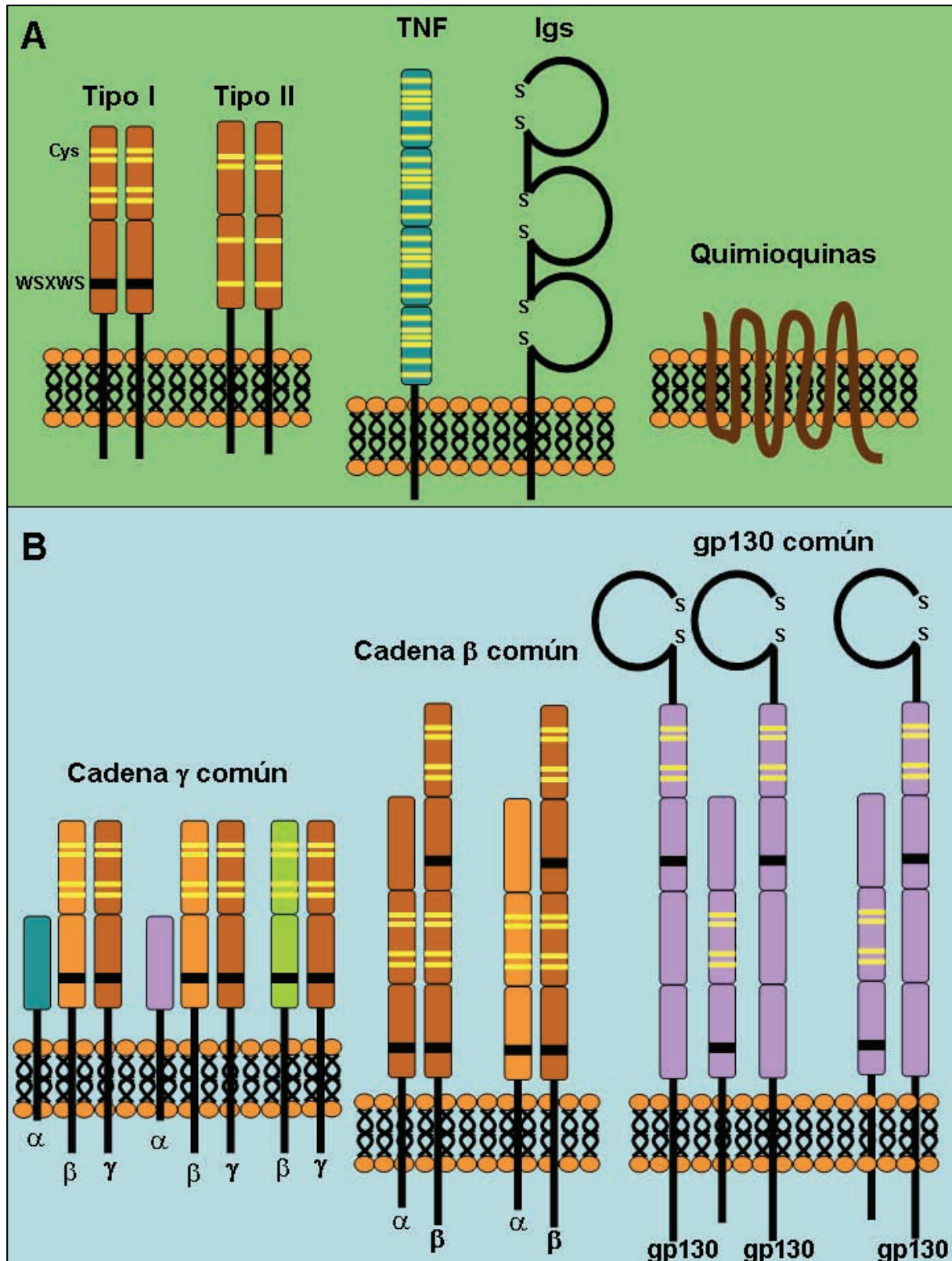


Figura 5: Estructura de los receptores de citoquinas

A) Familia de receptores de citoquinas: Los receptores para las diferentes citoquinas se agrupan en familias en función de las estructuras de dominios celulares conservadas. **Cys:** Cisternas conservadas. **WSXWS:** triptófano-serina-X-triptófano-serina. **B) Composición de subunidades de las familias de receptores de las citoquinas tipo I:** Están formados por cadenas de unión al ligando específicas de la citoquina unidas de manera no covalente a subunidades de señalización que son compartidas por los receptores para diversidad citoquinas. **Cadena γ común** (familia de la IL-2): IL-2, IL-15, IL-4. **Cadena β común** (familia del GM-CSF): GM-CSF, IL-5. **Cadena gp130 común** (familia de la IL-6): IL-6, IL-11. Adaptado de Abbas et al., 2000.

Las características esquemáticas de la estructura de cada una de estas familias están representadas en la figura 5B, pudiéndose observar que están formadas por una a varias cadenas de unión al ligando unidas a subunidades de señalización compartidas por receptores de diferentes citoquinas. En este sentido se han descrito cadenas de unión a ligando solubles que pueden interactuar con cadenas de señalización presentes en células que en principio no presentaban receptores completos para esa citoquina, en un proceso denominado **trans-señalización** (Rose-John *et al.*, 2007). La señalización de estas cadenas se da a través de la fosforilación de diferentes factores de transcripción, los STAT (*signal transducer and activator of transcription*) mediada por quinasas de la familia Janus (JAK-*Janus Kinases*-) con actividad tirosina-quinasa (Abbas *et al.*, 2000).

Los miembros más significativos de la familia de la IL-6 serían, además de la IL-6, la IL-11, el factor inhibidor de leucemia (LIF), la oncostatina M, cardiotrofina 1 y el factor neurotrófico ciliar (CNTF). Otras citoquinas incluidas en este grupo serán la IL-12, IL-23 e IL-27, aunque en algunas clasificaciones aparecen como una familia aparte (Goriely y Goldman, 2007).

La familia de receptores de la IL-2 (cadena α común) está implicada en la señalización de citoquinas como la IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, mientras que las citoquinas que usan receptores de la familia del GM-CSF (cadena β común) incluyen, además del GM-CSF, a la IL-3 y la IL-5.

Otros factores tales como la eritropoyetina, la prolactina o la leptina, pese a que no pueden considerarse puramente citoquinas, sí que se ha observado que señalizan por receptores con una elevada homología a los de las hematopoyetinas (Boulay *et al.*, 2003)

4.2.2. Citoquinas de tipo II

Los receptores de las citoquinas de tipo II son muy similares a los de tipo I, ya que también poseen dos dominios con citoquinas conservadas en sus porciones extracelulares, aunque no presentan el motivo WSXWS descrito en los del tipo I.

Estos receptores forman heterodímeros entre una cadena de unión al ligando y la cadena de transducción de señales, que de la misma manera que en los receptores del tipo I, implica la vía de señalización JAK/STAT (Abbas *et al.*, 2000, Langer *et al.*, 2004).

Dentro de este grupo se encuentran las siguientes familias:

- Receptores de la familia del **Interferón tipo I**
- Receptores de la familia del **Interferón tipo II**
- Receptores de la familia de la **IL-10**
- Receptores de la familia de la **IL-28** (del interferón λ)

Los receptores de la familia del interferón tipo I incluyen a las citoquinas INF- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- τ , mientras que la familia del interferón tipo II está formada únicamente por el IFN- γ .

La familia de la IL-10 cuenta entre sus miembros, además de a ella, a la IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26, mientras que la familia de la IL-28 está formada por IL-28A, IL-28B, IL-29 (también denominadas IFN- λ 1-3) (Langer *et al.*, 2004).

4.2.3. Familia del TNF

Los receptores de la familia del TNF presentan dominios extracelulares conservados ricos en cisteína. La llegada del ligando induce la activación de proteínas intracelulares que estimularán la expresión génica y/o vías apoptóticas (Abbas *et al.*, 2000). Esta familia de receptores no utiliza la vía de JAK/STAT sino que las proteínas intracelulares son de la familia TRAF (TNF receptor associated factor) y TRADD (TNF receptor associated death domain) que convergen en la activación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 o en la activación de caspasas que dirigirán la célula a la muerte por apoptosis.

Entre los miembros más destacados de esta familia encontramos al TNF- α , LT- α (TNF- β), LT- β , ligando de CD40 y ligando de FAS (Hehlgans y Mannel, 2002).

4.2.4. Superfamilia de las inmunoglobulinas

La particularidad de esta familia de receptores es la presencia de dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (Figura 5A), y la existencia de diversos mecanismos de señalización. Se pueden encontrar receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca o en los que se necesite la unión de proteínas adaptadoras. Los miembros más conocidos del

primer caso serían tanto M-CSF como SCF, mientras que como ejemplo de citoquina que requiera proteínas adaptadoras para iniciar la señalización se encuentra la IL-1 (Abbas *et al.*, 2000).

4.2.5. Quimioquinas

Las quimioquinas, tal y como se ha comentado anteriormente, son un grupo de citoquinas implicadas primordialmente en la migración/atracción de células leucocitarias, siendo este el motivo por el que clásicamente se han presentado con cierta independencia del resto de citoquinas. Pese a que sus funciones como factores quimiotácticos han sido extensamente probadas, la existencia de receptores en neuronas ha permitido que se postule también una posible implicación en la comunicación entre neuronas y glía (Adler *et al.*, 2005).

Los receptores de las quimioquinas son diferentes a los del resto de citoquinas ya que se trata de receptores clásicos de unión a proteínas G, con siete dominios hélice alfa transmembranales. Las respuestas de estos receptores son rápidas y están mediadas por la señalización a través de $G\alpha\cdot GTP$ y del dímero $G\beta\text{-}G\gamma$ (Abbas *et al.*, 2000).

5. Citoquinas y respuesta inflamatoria

El papel esencial de las citoquinas en la respuesta inflamatoria ya ha sido comentado anteriormente, mostrando las diferentes y complejas acciones que desarrollan en el SNC. En la figura 6 puede observarse la implicación de diversas citoquinas (y quimioquinas) en diferentes fases de la respuesta inmunitaria. El papel de las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF- α es esencial, sobre todo en la respuesta inmune innata, que será la que permitirá el inicio de la respuesta inmune adquirida (Borish y Steinke, 2003).

Estas tres citoquinas han sido extensamente estudiadas y clasificadas clásicamente como citoquinas pro-inflamatorias, sin embargo actualmente tan solo IL-1 es considerada como una citoquina inflamatoria prototípica (Lucas *et al.*, 2006), habiéndose descrito acciones tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias para IL-6 y para TNF- α (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998).

Tanto IL-6 como TNF- α , al ser el objeto de estudio del presente trabajo, serán extensamente tratadas en los apartados siguientes, por lo que en este apartado se comentarán algunas de las acciones de la IL-1 en el SNC, en especial en relación con la respuesta inflamatoria.

El término IL-1, aunque sería más correcto hablar de la familia de la IL-1, incluye a tres proteínas estrechamente relacionadas pese a ser productos de genes diferentes, IL-1 α y IL-1 β y IL-1ra. A pesar de compartir solamente un 25% de homología a nivel de estructura primaria, sus conformaciones tridimensionales son muy similares, uniéndose a los mismos receptores. Los tres factores se sintetizan como polipéptidos precursores de unos 31.5 KDa, aunque solamente IL-1b requiere proteólisis para ser activo. El enzima convertidor de interleuquina 1 β (ICE), también denominado caspasa-1, es el implicado en el procesamiento de la pro-IL1 β , generando un péptido activo de 17KDa (Rothwell y Luheshi, 2000). También procesa la pro-forma de la IL-18, emparentada con la IL-1 (Rowe *et al.*, 2002).

De estos tres factores de la familia de la IL-1, tanto IL-1 α como IL-1 β son considerados agonistas, habiéndose sugerido a IL-1 α como la forma primordialmente unida a membrana mientras que IL-1 β sería el factor secretado más abundante (Zheng *et al.*, 1995), sin embargo recientemente se ha postulado que IL-1 α no desempeñaría una función remarcable en la interacción neuro-inmune (Gosselin y Rivest, 2007). Ambos factores ejercen sus acciones a través de la unión con un receptor de la superfamilia de las Igs de 80KDa (**IL-1RI**). La unión del ligando con el receptor induce la unión de una proteína accesoria (**MyD88**) implicada en la transducción de la señal a través de NF κ B (Li y Qin, 2005, Rothwell, 2003). Se ha sugerido a este receptor como pieza fundamental en la correcta activación de la respuesta frente a daño, al activar la microglia e inducir la síntesis de mediadores pro-inflamatorios (Basu *et al.*, 2002). Pese a que la expresión de IL-1 en condiciones normales es muy baja (Lucas *et al.*, 2006) también se le han asignado funciones a nivel fisiológico como regulador de la actividad de las neuronas piramidales hipocampales (Friedman, 2001).

Se ha descrito la existencia de un segundo receptor, **IL-1RII**, capaz de ligar IL-1 β con elevada afinidad pero al que le falta un dominio citoplasmático con lo cual no inicia la transducción de señales (Rothwell y Luheshi, 2000), como la expresión de este receptor se ha visto incrementada en microglia después de la administración de LPS, se ha sugerido una función reguladora de la acción de IL-1 β por parte del receptor (Pinteaux *et al.*, 2002). Los avances en biología molecular han permitido identificar nuevos receptores de la familia de la

IL-1, aunque todavía no se les conoce ligando o no están totalmente caracterizados. Se ha observado que los receptores de esta familia presentan homología con los toll-like receptores (TLRs), piezas claves en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) así como patrones asociados a daño celular (DAMPS), activando por tanto la respuesta inmune innata. Esta homología confirmaría un papel esencial de la IL-1 en el inicio de la respuesta inmune (Li y Qin, 2005).

Las acciones de la IL-1 β a nivel basal son reducidas, habiéndose observado su expresión sólo en determinadas poblaciones neuronales (Lemke et al 1999), sin embargo en situaciones de daño, lesión y/o infección, su expresión se ve incrementada tanto en células gliales (Penkowa *et al.*, 2000b) como en macrófagos (West *et al.*, 1999), siendo considerado un potente activador de las respuestas inflamatorias (Rothwell y Luheshi, 2000). La activación de IL-1 β en microglia puede ser bloqueada por TGF-B1 (Basu et al, 2002b) mientras que en otras células como los astrocitos puede regularse mediante IL-4 e IL-10 (Pousset et al., 1999). En este sentido, la expresión de IL-1 β contribuye de manera fundamental al establecimiento de la denominada **conducta de enfermedad** (*sickness behaviour*), término que comprende tanto la anorexia, como la letargia y fiebre observadas en alteraciones de la homeostasis del organismo. Participa asimismo en la estimulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Zheng *et al.*, 1995), en la síntesis de factores de crecimiento, la reducción de la liberación de glutamato y el incremento de los efectos del GABA (Lucas *et al.*, 2006). La IL-1 β es capaz de inducir la expresión de TNF- α y de IL-6 (Norris *et al.*, 1994), y se ha visto que afecta a la función neuronal (Friedman, 2001), habiéndose descrito una disminución de la potenciación a largo plazo en neuronas hipocámpales (Rothwell y Luheshi, 2000).

El incremento en la expresión de IL-1 β se ha correlacionado con una mayor muerte neuronal, así como con una exacerbación del daño al SNC, sin embargo, se ha descrito que la IL-1 β no induce de manera directa la muerte neuronal si no que requiere de la presencia de astrocitos *in vitro*, sugiriendo que son éstos los que producen los mediadores neurotóxicos en respuesta a la IL-1 β (Rothwell, 2003).

Por último destacar que aunque el papel pro-inflamatorio de la IL-1 β está fuera de toda duda, no está asociado necesariamente con daño. Si bien se ha determinado la expresión de IL-1 β en las placas seniles tanto en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer como en muestras humanas (Mehlhorn *et al.*, 2000, Munch *et al.*, 2003), la sobreexpresión de esta citoquina en animales transgénicos para la proteína precursora amiloide (APP) humana se ha mostrado como protectora, pudiendo ser una explicación a los recientes resultados

negativos de la terapia anti-inflamatoria para la enfermedad de Alzheimer (Shaftel *et al.*, 2007). En este sentido, se ha descrito que la administración de IL-1 β en cultivos puros neuronales es neuroprotectora, probablemente por la inducción de la expresión del factor de crecimiento neuronal (NGF) (Rothwell, 2003).

El tercer miembro de la familia de la IL-1, denominado antagonista del receptor (**IL-1ra**) quizás sea el mecanismo más importante de regulación de la señalización de IL-1. Se trata de un antagonista competitivo muy selectivo que es capaz de unirse a IL-1RI pero sin conseguir la asociación del complejo con MyD88, por lo que está implicado en el bloqueo de las acciones de IL-1 α y sobre todo IL-1 β . Se ha observado que ratones que sobreexpresan este factor presentan una menor hemorragia y edema tras daño isquémico (Masada *et al.*, 2001).

5.1. TNF- α

5.1.1. Vías de señalización del TNF- α

La señalización de TNF- α se produce a través de la unión del ligando con dos receptores que dan nombre a toda una superfamilia de receptores, **TNFR1** y **TNFR2**, que presentan cuatro dominios extracelulares ricos en cisteínas (**CRDs**), en otros miembros de esta superfamilia de receptores del TNF pueden encontrarse de uno a seis CRDs (Chan, 2007). El TNF- α se produce como un precursor unido a membrana de 26KDa, que mediante la acción de una metaloproteinasa **ADAM** (*a disintegrin and metalloproteinase*, también conocida como *TNF alpha converting enzyme* – **TACE**-) es procesada a la forma soluble de 17KDa (Baud y Karin, 2001). Mientras que la forma soluble es la principal activadora de TNFR1 y TNFR2, la asociada a membrana parece presentar una mayor afinidad para TNFR2, participando en la señalización de TNF- α entre células vecinas (Ruuls *et al.*, 2001), recientemente se ha sugerido que esta forma unida a membrana podría funcionar como receptor por ella misma, en un proceso de **señalización reversa transmembranal**, contribuyendo en los mecanismos de retroalimentación (Eissner *et al.*, 2004).

TNFR1 y TNFR2 presentan solamente un 28% de homología en sus porciones extracelulares, mientras que ésta es casi inexistente entre los dominios citoplasmáticos (MacEwan, 2002).

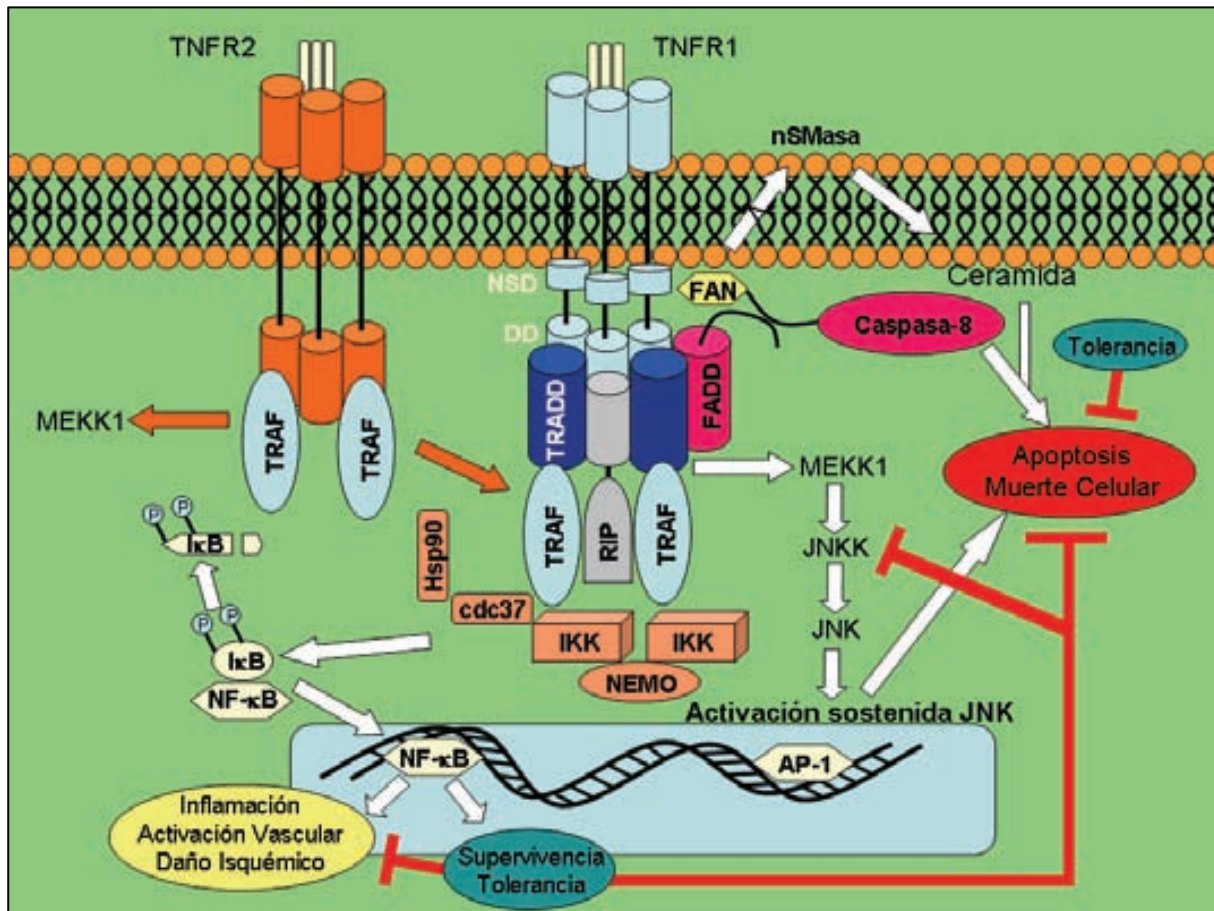


Figura 7: Señalización de TNF- α . **Vía del TNFR1:** La unión del TNF a TNFR1 promueve la liberación de la proteína SODD (no representado), permitiendo que TRADD se una al receptor en la secuencia *death domain* (DD). TRADD recluta a las proteínas RIP, TRAF y FADD. Caspasa-8 es reclutada por FADD, activándose e iniciando una cascada de señalización que dirigirá a apoptosis. Por otro lado, una multiproteína, el complejo I κ B quinasa (IKK) compuesto por las subunidades catalíticas IKK- α/β y la reguladora NEMO es reclutado por TNFR1, interactuando con RIP y TRAF y con cdc37 y hsp90. IKK fosforilará al inhibidor de NF κ B (I κ B), promoviendo su degradación, permitiendo que NF κ B transloque a núcleo, se una al ADN e inicie la transcripción. TRAF también activa a MEKK1, iniciando la vía MAPK que finalizará en activación sostenida de AP-1 por JNK, dirigiendo a la célula a apoptosis. El dominio para la esfingomielinasa neutra del TNFR1 recluta a FAN, que activa a la esfingomielinasa neutra, produciendo ceramida promoviendo la apoptosis, aunque a niveles bajos podría producir tolerancia. **Vía del TNFR2:** Al no disponer de dominio DD al unirse el ligando se observa la unión de TRAF directamente con el receptor, iniciando las vías IKK/NF κ B y MEKK1/AP1. **Modificado de Hallenbeck, 2002.**

Las moléculas de TNF- α forman homotrímeros, por lo que para poder señalar los receptores deben constituir igualmente un homotrímero. Un dominio de ensamblaje independiente de ligando (PLAD), presente en la porción extracelular más distal de la cadena del receptor, es el encargado de inducir la trimerización del receptor (Chan, 2007, Hallenbeck, 2002). La unión del ligando con el receptor desencadenará el acoplamiento de proteínas accesorias en la porción citoplasmática del receptor, siendo éstas las encargadas de iniciar la cascada de señalización (Baud y Karin, 2001) ya que los receptores no disponen de actividad metabólica propia (MacEwan, 2002).

La mayoría de los efectos biológicos conocidos del TNF- α son mediados por TNFR1, que se expresa constitutivamente en una gran variedad de células (Shen y Pervaiz, 2006). Este

receptor, también denominado **p55** en ratón o **p60** en humanos presenta una secuencia de 80 aminoácidos en su porción citoplasmática designada dominio de muerte (*death domain -DD-*), relacionándolo así con otros miembros de la familia de los denominados receptores de muerte. Si no hay estimulación del receptor esta región permanece inaccesible por acción del factor **SODD** (*silencer of death domain*), pero la unión entre ligando y receptor provoca la disociación de SODD, permitiendo la unión de proteínas accesorias a este dominio de muerte (Shohami *et al.*, 1999).

La primera proteína accesoria reclutada es **TRADD** (*TNFR1 associated death domain protein*), que servirá como plataforma para otras proteínas como son **RIP** (*receptor interacting protein*), **FADD** (Fas-associated death domain protein) y **TRAF2** (*TNF-receptor-associated factor 2*) (Baud y Karin, 2001). El reclutamiento de FADD inducirá a su vez la activación de pro-caspasa 8, dirigiendo la célula a apoptosis. La interacción TRADD-TRAF2-RIP inducirá la formación de un complejo con actividad quinasa (**IKK**), que fosforilará el inhibidor del factor de transcripción NFκB (**IκB**), dirigiendo a IκB hacia la vía del proteasoma y liberando a NFκB, que translocará al núcleo activando genes tanto pro-inflamatorios como implicados en la supervivencia celular. TRAF2 también activa la vía de las **MAPK** que convergen en la activación de JNK y p38 que a su vez activarán al factor de transcripción AP-1, el cual inducirá la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria y, si se mantiene su inducción, también en la apoptosis (Hallenbeck, 2002). Por último la unión del TNF-α con TNFR1 activa la esfingomielinasa neutra, induciendo la síntesis de ceramidas con acciones tanto apoptóticas como de tolerancia (Shohami *et al.*, 1999).

El receptor 2 del TNF (**TNFR2**, también denominado **p75** en ratones o **p80** en humanos), por el contrario, no presenta la secuencia DD en su porción citoplasmática, con lo que no puede reclutar a TRADD, por lo que la unión de TNF-α con TNFR2 induce el reclutamiento directo de TRAF2, este factor presenta una mayor afinidad por TRADD que por TNFR1 o TNFR2, lo que puede explicar porqué TNF-α es mejor activador de TNFR1 que de TNFR2 (Baud y Karin, 2001). Además, la expresión de este receptor a nivel basal es menor, viéndose inducido en determinados tipos celulares, mayoritariamente linfocitos T (Zheng *et al.*, 1995), en respuesta a daño (Lucas *et al.*, 1997).

Por tanto, aunque con menor afinidad, el receptor TNFR2 puede activar tanto a NFκB como AP-1 de la misma manera que TNFR1, pudiendo inducir también tanto estímulos apoptóticos como de supervivencia (Baud y Karin, 2001). De la misma forma, pese a no

disponer de DD, se ha descrito que FADD es un factor necesario para algunos tipos de muerte celular dependiente de TNFR2 *in vitro* (Depuydt et al., 2005), lo que muestra la complejidad de la señalización iniciada por el TNF- α , donde el resultado vendrá determinado por el equilibrio de las interacciones entre las diferentes vías activadas en la célula (Hallenbeck, 2002) así como del microambiente que rodea a la célula (Janes *et al.*, 2006). Un posible mecanismo para explicar el predominio de una vía de señalización sobre otra ha sido descrito para TNFR1 en un modelo de lesión traumática, existiendo una redistribución diferencial para diversas proteínas accesorias de este receptor en microdominios de membrana donde está presente TNFR1, lo que facilitaría la interacción con el receptor de los factores reclutados respecto a otros (Lotocki *et al.*, 2004).

5.1.2. Acciones del TNF- α en el SNC

El TNF- α es un factor altamente pleiotrópico, del que se han descrito acciones tanto beneficiosas como citotóxicas no sólo en el SNC sino también a nivel sistémico. Si bien en este capítulo nos centraremos en el papel de este factor en el SNC no se debe olvidar que el TNF- α ejerce funciones muy relevantes a nivel sistémico. Además del importante papel de esta citoquina en situaciones inflamatorias (Burger y Dayer, 2002, Masson *et al.*, 2004) se ha descrito que la producción de TNF- α en adipocitos está implicada en la resistencia a la insulina y obesidad (Bastard *et al.*, 2006, Dyck *et al.*, 2006) y en la pérdida de masa muscular asociada a la edad (Dirks y Leeuwenburgh, 2006),

En el SNC se han observado acciones de esta citoquina tanto en condiciones basales como frente a daño. A nivel fisiológico, el TNF- α glial juega un papel esencial en el mantenimiento sináptico (Stellwagen y Malenka, 2006) y como neuroprotector en la dependencia a metanfetamina, probablemente incrementando la recaptación de dopamina (Nakajima *et al.*, 2004). En línea con el papel del TNF- α en la plasticidad sináptica, se ha observado que la sobreexpresión de TNF- α afecta al patrón conductual en ratones (Fiore *et al.*, 1998) y que, tras su unión a TNFR1, actuaría como regulador negativo de la neurogénesis hipocampal en adulto (Iosif *et al.*, 2006), sugiriendo un importante papel durante el desarrollo y en procesos de aprendizaje.

Si bien el TNF- α participa activamente en estados fisiológicos no es menos cierto que la mayoría de acciones descritas describen su importancia en respuesta a daño, habiéndose

observado como el TNF- α puede mostrarse tanto neuroprotector como neurotóxico, dependiendo del tipo de lesión y/o del estadio de la misma, propiciando la aparición del concepto de **papel dual** de esta citoquina (Shohami *et al.*, 1999). La respuesta inflamatoria, en sí misma, presenta también esta dualidad, siendo un proceso protector, limitando el daño y evitando su progresión, pero al mismo tiempo promoviendo la síntesis de factores neurotóxicos (Correale y Villa, 2004, Rothwell, 2003).

Está ampliamente descrita la capacidad del TNF- α para inducir la síntesis de diversas quimioquinas y citoquinas, entre las que se incluye él mismo, sobre todo en astrocitos y microglia, actuando así como amplificador de la respuesta inflamatoria (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998, Wright *et al.*, 2004), participa en la rotura de la BHE estimulando la síntesis de MMP-9 y facilitando la infiltración de neutrófilos y linfocitos T (Shohami *et al.*, 1999), inhibe el crecimiento de neuritas hipocampales (Neumann *et al.*, 2002) e impide la regeneración axonal tras lesión, además induce tanto apoptosis como necrosis mediada entre otros por glutamato y óxido nítrico (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998). Su expresión en neuronas después de lesión traumática se ha propuesto como causante de disfunción neuronal (Knoblach *et al.*, 1999), en este sentido se ha observado que TNF- α está implicado en la inducción de las respuestas de miedo, ansiedad y estrés tras administración de enterotoxina A (Rossi-George *et al.*, 2005). La sobreexpresión crónica de TNF- α en astrocitos provoca meningoencefalitis y parálisis (Campbell *et al.*, 1997), y el bloqueo de sus receptores reduce los síntomas en un modelo animal de enfermedad de Parkinson (Sriram *et al.*, 2006), sugiriendo un papel neurotóxico para el TNF- α en procesos neurodegenerativos. Se ha observado también un papel negativo de esta citoquina en la enfermedad de Alzheimer (Cacquevel *et al.*, 2004) y en la EAE, donde la inhibición de la señalización del TNF- α es positiva. Sorprendentemente se ha observado el efecto contrario en pacientes con esclerosis múltiple (Raivich y Banati, 2004).

Un importante mecanismo para explicar algunas de las acciones negativas de TNF- α podría ser la generación de radicales libres y, en consecuencia de estrés oxidativo (Van Herreweghe *et al.*, 2002), que además de su capacidad nociva *per se*, bloquearían la vía de las MKP, fosfatasa reguladoras de la fosforilación de JNK, que activa AP-1, dando lugar a una acción sostenida de este factor de transcripción que acabará induciendo vías apoptóticas (Kamata *et al.*, 2005, Schwabe y Brenner, 2006).

La producción de TNF- α , sin embargo, también muestra acciones dirigidas a la neuroprotección del tejido. En este sentido se ha observado como el tratamiento de ratas y

ratones con TNF- α antes de una isquemia reduce el daño de la misma (Shohami *et al.*, 1999), posiblemente mediante el incremento en la expresión neuronal del transportador para glutamato EAAT3 (Pradillo *et al.*, 2006) así como por su capacidad para inducir la síntesis de NGF, BDNF y CNTF (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998). En concordancia con estos resultados, ratones knock-out para TNFR1 y TNFR2 presentan un tamaño de lesión superior después de isquemia (Bruce *et al.*, 1996).

La contribución relativa de TNFR1 y TNFR2 en estas respuestas es compleja, dependiendo en muchos casos del tipo de lesión y, aunque clásicamente se había implicado a TNFR1 como el encargado de promover las acciones neurotóxicas mientras que TNFR2 lo sería de las de supervivencia, actualmente se considera que la relación entre los dos receptores y el resultado final de la estimulación por TNF- α son mucho más complejos.

El papel pro-inflamatorio así como pro-apoptótico del TNFR1 se ha observado en múltiples patologías, en la EAE este receptor es el implicado en el desarrollo de la enfermedad, mientras que TNFR2 estaría implicado en la remisión de los síntomas (Suvannavejh *et al.*, 2000). Confirmando esta implicación, la administración de un superantígeno permite inducir la EAE en animales resistentes por una vía mediada por TNFR1 (Eugster *et al.*, 2001). Una acción antagónica entre los dos receptores se ha descrito también en isquemia de la retina, volviendo a ser el TNFR1 el mediador del daño (Fontaine *et al.*, 2002), a la vez que también está implicado en la inducción de ICAM-1, asociado con el daño cerebral en procesos isquémicos (Yin *et al.*, 2004). Otra demostración de su potencial neurotóxico es su capacidad para inducir apoptosis en células precursoras neuronales (Sheng *et al.*, 2005). TNFR2, por el contrario, inhibe las convulsiones epilépticas inducidas por ácido cáinico (Balosso *et al.*, 2005).

Como ejemplos de acciones perjudiciales del TNFR2 encontramos su papel esencial en el desarrollo de la glomerulonefritis (Vielhauer *et al.*, 2005), así como su correlación con la severidad en infecciones fúngicas (Corvino *et al.*, 2007). Por último, se han observado acciones beneficiosas mediadas por TNFR1, como la mediación de tolerancia a isquemia cerebral a través de la inducción de EAAT3 (Pradillo *et al.*, 2006) así como la inducción de la expresión de **SOCS1** (*silencer of cytokine signalling 1*), proteína implicada en inhibición de las acciones pro-apoptóticas de las citoquinas, en hígado (Sass *et al.*, 2005).

5.2. IL-6

5.2.1. Vías de señalización de IL-6

La IL-6 señala a través de un receptor de tipo I, del subtipo con cadena **gp130** común (Figura 5B). La unión de la IL-6 a su receptor (**IL-6R**), como ya se ha comentado, se produce a nivel de membrana celular, activando el reclutamiento de la unidad con capacidad transcripcional, gp130 (Heinrich *et al.*, 2003). A continuación ocurre la homodimerización de gp130 y se da la activación de las tirosina quinasas de la familia JAK asociadas a las cadenas de gp130, que fosforilarán múltiples residuos de tirosina (Y) altamente conservados localizados en los dominios citoplasmáticos de gp130 (Abbas *et al.*, 2000).

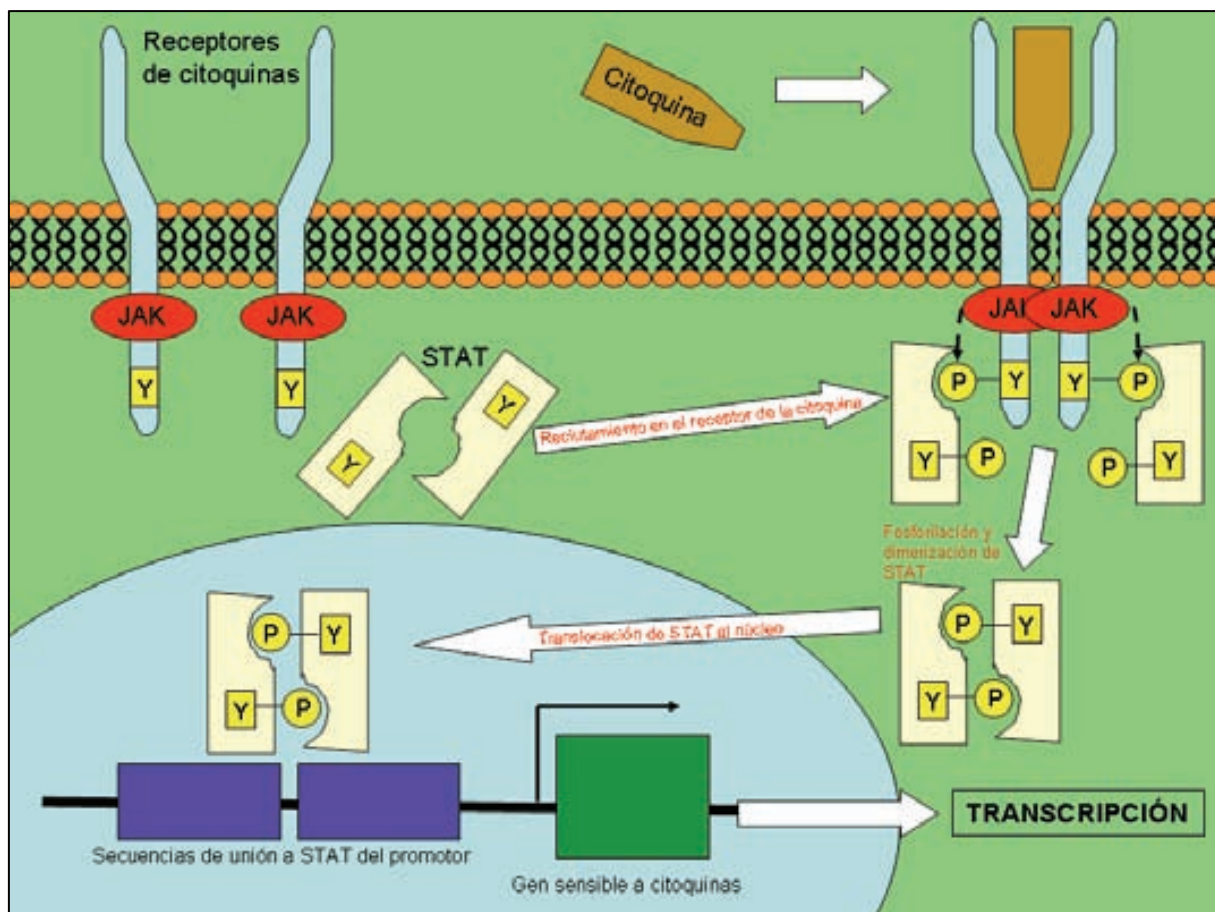


Figura 8: Señalización por JAK/STAT: Las enzimas JAK inactivas se encuentran unidas laxamente a las cadenas citoplasmáticas del receptor. Al darse la unión a ligando dos moléculas del receptor se unen, las JAK asociadas se activan por transfosforilación y fosforilan residuos de tirosina en los receptores, siendo reconocidas por dominios SH2 de las proteínas STAT que se unen a los receptores, siendo fosforiladas por JAK. Las proteínas STAT fosforiladas pueden entre ellas, disociándose del receptor y translocar a núcleo, uniéndose a secuencias de respuesta a STAT, iniciando la transcripción. **Adaptado de Abbas, 2003.**

Esta fosforilación induce el reclutamiento del factor de transcripción **STAT3**, que mediante un dominio de homología a *Src* (*Src 2 homology domain – SH2-*) se unirá a los residuos de fosfotirosina de gp130. STAT3 pertenece a una familia constituida por siete factores de transcripción denominados STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6 (Lutticken *et al.*, 1994, Stahl *et al.*, 1994). La cadena gp130 fosforilada puede atraer, además de STAT3 a STAT1, aunque de manera minoritaria. Ambos factores son fosforilados por las tirosina quinasas JAK, induciendo la disociación de los STATs de la cadena gp130. Estos STATs fosforilados formarán homo o heterodímeros que translocarán al núcleo celular, regulando la transcripción génica, como puede observarse esquemáticamente en la figura 8 (Abbas *et al.*, 2000).

La fosforilación de gp130 también induce la unión de la tirosina fosfatasa **SHP-2**, aunque el residuo de fosfotirosina que reconoce es diferente a los de los STATs, dando lugar a la activación de la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (**MAPK**) (Kim y Baumann, 1999, Takahashi-Tezuka *et al.*, 1998).

Mientras que la activación de la vía JAK-STAT se cree que está relacionada con las acciones pro-inflamatorias de la IL-6, la vía SHP2-MAPK podría estar implicada en las funciones sobre el crecimiento celular y supervivencia descritos para esta citoquina, aunque los dos sistemas no son excluyentes, habiéndose observado regulación cruzada entre ellos (Ernst *et al.*, 2001, Ohtani *et al.*, 2000), pudiendo compensar una de las vías un déficit en la otra. Tanto el papel de STAT3 como el de SHP2 han sido extensamente caracterizados y son considerados factores fundamentales en la señalización de la IL-6 (Hodge *et al.*, 2005, Kishimoto *et al.*, 1995, Suzumura *et al.*, 2006), pero no así STAT1, que parece tener un papel minoritario y poco relevante (E Sanz y IL Campbell, no publicado).

5.2.2. Acciones de la IL-6 en el SNC

La IL-6 pertenece, como se ha comentado anteriormente, a la familia de las neuropoyetinas, entre las que se encuentran otros factores como la oncostatina M, la IL-11, LIF o CNTF (Bauer *et al.*, 2007). Estas citoquinas comparten la subunidad gp130 como cadena de transducción de señales, mientras que la cadena α es la de unión al ligando. Se ha observado que tanto la subunidad α del receptor de la IL-6 así como la del receptor de CNTF pueden ser procesadas y secretadas, formando complejos ligando-cadena α soluble, que puede interactuar con células que presenten cadenas gp130 en la membrana. Esta acción puede motivar respuestas diversas en diferentes células (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998).

De la misma manera que el TNF- α , la IL-6 desarrolla notables funciones fisiológicas a nivel sistémico. Desempeña una acción importante en el metabolismo energético, se expresa en adipocitos y participa en el control del peso corporal (Wallenius *et al.*, 2002). En el tejido muscular se expresa en respuesta a ejercicio participando en la regulación de la movilización de ácidos grasos y glucosa, contrarrestando, en parte, las acciones del TNF- α (Pedersen y Fischer, 2007), aunque también muestra efectos de manera central (Wallenius *et al.*, 2002). En el SNC algunas de sus funciones en situación fisiológica se observan durante el desarrollo participando en la regulación de la neurogénesis, en el destino de las células madre neurales y en la plasticidad sináptica, contribuyendo en la modulación de diferentes patrones conductuales (Bauer *et al.*, 2007). En este sentido, animales knock-out para la IL-6 muestran una mayor conducta emotiva (Armario *et al.*, 1998) y una afectación de los procesos de memoria en adultos (Braidá *et al.*, 2004), mientras que ratones que sobre-expresan IL-6 en astrocitos muestran una menor neurogénesis en el hipocampo (Vallieres *et al.*, 2002). Interviene, asimismo, en el control del eje HPA (Chesnokova y Melmed, 2002) y de la termogénesis (Chai *et al.*, 1996).

Después de lesión la IL-6 participa activamente en la respuesta inflamatoria, contribuyendo al daño secundario y a la respuesta de fase aguda (Ishihara y Hirano, 2002, Muñoz-Fernandez y Fresno, 1998, Raivich *et al.*, 1999), actuando en diversos tipos celulares así como reclutando leucocitos mediante la inducción de la expresión de quimioquinas como CXCR4 en astrocitos (Odemis *et al.*, 2002). La ausencia de IL-6 causa una respuesta inflamatoria deficiente frente a infecciones víricas o bacterianas (Kopf *et al.*, 1994), siendo esta observación consistente con los incrementos de IL-6 que se observan en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con infecciones víricas, habiéndose descrito que tanto las células microgliales como los astrocitos infectados por virus la expresan (Muñoz-Fernandez y Fresno, 1998). La ausencia de IL-6 confiere resistencia frente a la inducción de la EAE, por un mecanismo no totalmente elucidado pero que evita la infiltración de macrófagos y linfocitos T autoreactivos (Eugster *et al.*, 1998, Okuda *et al.*, 2000, Samoilova *et al.*, 1998). De la misma manera, la microgliosis está reducida en animales IL6KO en respuesta a la toxina de neuronas dopaminérgicas MPTP, aunque la muerte neuronal está incrementada (Cardenas y Bolin, 2003), sugiriendo estas observaciones un papel pro-inflamatorio a la par que protector para esta citoquina. Esta doble función se ha observado en modelos de lesión traumática, con una menor respuesta inflamatoria acompañada de una reducción en la tasa de recuperación en animales IL6KO, probablemente por un mayor estrés oxidativo y apoptosis

(Penkowa *et al.*, 1999b, Swartz *et al.*, 2001), así como después de lesión en la raíz dorsal (Murphy *et al.*, 2000) o de administración de la gliotoxina 6-AN (Penkowa y Hidalgo, 2000a).

La sobreexpresión de IL-6, por el contrario, exagera la respuesta inflamatoria y la gliosis, dando lugar, si se expresa de manera crónica, a neuroinflamación, neurodegeneración y formación aberrante de vasos sanguíneos con rotura de la BHE (Brett *et al.*, 1995, Campbell *et al.*, 1993). Se ha descrito el papel de la IL-6 en el desarrollo de procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, probablemente por su acción en la función glial (Kim y Joh, 2006, Munoz-Fernandez y Fresno, 1998). Cabe destacar, no obstante, que aunque la expresión crónica de IL-6 tiene efectos devastadores sobre la integridad del parénquima nervioso, confiere una protección frente a la gliotoxina 6-AN (Penkowa *et al.*, 2003b, Penkowa *et al.*, 2004) así como una menor muerte celular y mayor tasa de recuperación en respuesta a lesiones traumáticas (Penkowa *et al.*, 2003c, Swartz *et al.*, 2001).

La IL-6, muestra, por tanto, un marcado carácter neuroprotector en diversas situaciones patológicas, lo que la convierte en un factor esencial en los procesos inflamatorios. Se han establecido diferentes mecanismos que describimos a continuación mediante los cuales podría estar actuando esta citoquina.

5.2.3. Acción neuroprotectora de la IL-6

Se han descrito diferentes mecanismos de neuroprotección para explicar las acciones de la IL-6 en la supervivencia neuronal. Es importante aclarar que algunos de ellos son comunes a otros miembros de la familia de las neuropoyetinas, como LIF o CNTF, sugiriendo la existencia de patrones generales en la señalización mediante el factor gp130 (Bauer *et al.*, 2007).

Uno de los mecanismos descritos se basa en la capacidad de la IL-6 para inducir la síntesis de factores de crecimiento. La IL-6 estimula la producción de BDNF tanto en un modelo de axotomía como *in vitro*, promoviendo la supervivencia neuronal (Murphy *et al.*, 2000). El BDNF pertenece a la familia de las neurotrofinas, y ha sido descrito como un factor de vital importancia en diferentes patologías como la enfermedad de Huntington, en la que su deficiencia contribuye a la muerte neuronal que desencadenará la sintomatología (Zuccato y Cattaneo, 2007). El BDNF, por otra parte, promueve la supervivencia y diferenciación de

diferentes poblaciones neuronales y ha sido implicado en procesos de aprendizaje y memoria (Pezet y Malcangio, 2004).

Otros mecanismos propuestos implicarían la inducción de diferentes genes por parte de IL-6. Entre estos genes cabe destacar el papel de la familia de los *supressors of cytokine signalling* (SOCS), en especial SOCS3, que actúan como inhibidores de la señalización por gp130, pudiéndose considerarse como neuroprotectores en diferentes tipos de procesos patológicos centrales o periféricos, como en la modulación de las convulsiones y daño hipocampal tras administración de litio-pilocarpina (Rosell *et al.*, 2003) o en la artritis reumatoide (Ishihara y Hirano, 2002). La observación de que la LIF puede inducir la expresión de SOCS3 y limitar el daño desmielinizante refuerza el papel neuroprotector de las neuropoyetinas (Emery *et al.*, 2006). Se ha descrito a la IL-6 como el mayor inductor de SOCS3 en hígado tras administración de LPS (Yang *et al.*, 2005).

Por último, diversos laboratorios han observado un mayor estrés oxidativo en animales IL6KO (Penkowa *et al.*, 1999b, Swartz *et al.*, 2001), sugiriendo un papel de esta citoquina en el control de la producción de radicales libres. Las Metalotioneínas (MTs), proteínas con una elevada capacidad antioxidante y antiapoptótica, son inducidas por la IL-6, por lo que se ha sugerido que jugarían un papel relevante en la acción de regulación de los niveles de EROs que ejerce la IL-6 (Hidalgo *et al.*, 2001).

6. Metalotioneínas

Las metalotioneínas (MTs) son una superfamilia de proteínas ricas en cisteína, de bajo peso molecular con una gran capacidad para unir metales como Cobre y Zinc en condiciones fisiológicas aunque pueden ser desplazados por otros metales pesados como Cadmio o Mercurio si estos se encuentran a una elevada concentración en el medio (Hidalgo *et al.*, 2001, Kagi y Kojima, 1987).

Se han establecido 15 familias de MTs, englobando la primera las MTs de vertebrados. Esta familia comprende a su vez varias subfamilias, de las que cuatro pertenecen a mamíferos (mMT1-mMT4). Mientras que en humanos se han descrito diferentes miembros de una misma subfamilia, en ratón sólo existe una isoforma de cada una, MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV. Tanto MT-I como MT-II fueron descubiertas en 1957, su expresión es ubicua y coordinada. MT-III y MT-IV, caracterizadas posteriormente, muestran una expresión más

restringida, localizándose mayoritariamente en el sistema nervioso central y en epitelio estratificado, respectivamente

Las isoformas que se expresan en el SNC son la MT-I, MT-II y MT-III. La MT-I y la MT-II en células endoteliales, plexo coroideo, aracnoides, pia madre y en astrocitos, particularmente protoplasmáticos, en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo (Hidalgo *et al.*, 2001). Sin embargo no se observa expresión en neuronas, oligodendrocitos o microglia (Carrasco, 2000) salvo en situación de lesión cerebral (Leyshon-Sorland *et al.*, 1994, Vela *et al.*, 1997). La localización de la MT-III, por el contrario, presenta ciertas discrepancias. Se ha descrito la presencia del transcrito en neuronas (Masters *et al.*, 1994b) aunque la proteína ha sido detectada mayoritariamente en astrocitos (Inuzuka *et al.*, 1996) y si se detecta en neuronas es en menor medida (Yamada *et al.*, 1996).

La expresión de las MTs presenta múltiples mecanismos de regulación, por una parte, pese a encontrarse las cuatro isoformas de ratón formando un locus, sólo la MT-I y MT-II tienen una expresión ubicua y coordinada, habiéndose descrito la existencia de **regiones de control de locus** (LCR), implicadas en el control de la actividad transcripcional de un segmento de ADN, flanqueando los genes *Mt2* y *Mt1* (Palmiter *et al.*, 1993), lo que explicaría la regulación diferencial de estas dos isoformas respecto a las otras dos. Por otra parte, los promotores de las MTs muestran una amplia presencia de elementos de respuesta a diferentes factores tales como antioxidantes (ARE *antioxidant response element*), glucocorticoides (GRE), metales (MRE) así como elementos de respuesta a IL-6, donde se unen los factores STAT, y lugares de unión para los factores de transcripción AP-1, AP-2 y Sp1, (Carrasco, 2000, Lee *et al.*, 1999). En el promotor del gen *Mt3* se encuentra una región con múltiples repeticiones CTG, que podrían participar en el control de la transcripción de la MT-III (Carrasco, 2000). Toda esta riqueza de elementos de respuesta en el promotor tiene como consecuencia que tanto *Mt1* como *Mt2* sean genes altamente inducibles (Tabla 3), aunque paradójicamente *Mt3* no responde a estos estímulos (Hidalgo *et al.*, 2001)

La naturaleza altamente inducible de MT-I y MT-II por metales, explica que estén implicadas en la homeostasis de cobre y zinc en situaciones fisiológicas y en la detoxificación de metales pesados en situaciones no fisiológicas (Coyle *et al.*, 2002). También se ha observado que muestran una elevada capacidad antioxidante posiblemente relacionada con su elevado número de tioles y con la elevada afinidad con la reaccionan con radicales hidroxilo (Thornalley y Vasak, 1985), asimismo presentan actividad anti-inflamatoria (Miesel *et al.*, 1990) y neuroprotectora (Chung *et al.*, 2003). MT-I y MT-II se inducen en respuesta a diferentes situaciones patológicas y neurodegenerativas (Hidalgo *et al.*, 2001), habiéndose

observado que su deficiencia incrementa el estrés oxidativo y la muerte celular, empeorando la recuperación en lesiones traumáticas (Penkowa *et al.*, 1999a, Penkowa *et al.*, 2000a, Penkowa *et al.*, 2006), frente a agentes epileptogénicos (Carrasco *et al.*, 2000) o en patologías neurodegenerativas como la EAE (Penkowa *et al.*, 2001). Por el contrario, la sobreexpresión de MTs (Penkowa *et al.*, 2003a, Penkowa *et al.*, 2005) o la administración exógena (Chung *et al.*, 2003, Penkowa y Hidalgo, 2000b) da lugar un efecto neuroprotector y a una reducción del daño.

Tabla 3: Agentes inductores de la MT-I y MT-II . Adaptado de Carrasco, 2000

<u>Metales</u> Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi	<u>Antibióticos</u> Estreptozotocina, Ciclohexamida
<u>Hormonas y factores de crecimiento</u> Glucocorticoides, Progesterona, Estrógenos Glucagón, Insulina, Angiotensina II, IGF-I, EGF	<u>Agentes citotóxicos</u> Hidrocarburos, Etanol, Isopropanol, Cloroformo Tetracloruro de carbono, EDTA, Acetaminopteno
<u>Agentes inflamatorios y citoquinas</u> LPS, Dextrano, Turpentina, IL-1, IL-6, IFN- α IFN-g, TNF- α	<u>Agentes estresantes</u> Deprivación, Inflamación, Irradiación Inmovilización

La MT-III, como se ha comentado anteriormente, no es inducible por los mismos factores que MT-I y MT-II. Este factor se identificó inicialmente en extractos cerebrales de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, sugiriendo que desempeñaba un papel inhibitor del crecimiento neuronal (Uchida *et al.*, 1991). Dicho papel se ha confirmado en un modelo de lesión traumática cerebral observándose un descenso de MT-III en lesiones traumáticas seguido de una inducción una vez la cicatriz glial está establecida (Penkowa *et al.*, 2000a). En este mismo modelo la deficiencia de MT-III indujo la expresión de neurotrofinas y de factores de rebrotamiento axonal (Carrasco *et al.*, 2003) y lo mismo se ha descrito en un modelo de lesión de nervio periférico, donde los ratones MT3KO presentan una mayor regeneración axonal (Ceballos *et al.*, 2003)

7. La criolesión como modelo de lesión traumática

Las lesiones traumáticas representan una de las principales causas de discapacidad y muerte, siendo especialmente preocupantes en edades jóvenes.

Resulta fundamental el estudio de los mecanismos implicados en la respuesta inflamatoria, determinando el papel de cada uno de los mediadores, con el fin de esclarecer la

dinámica de la respuesta e identificar las causas de la componente negativa de la inflamación y por qué en determinados casos predomina sobre la positiva.

Con este fin en este trabajo se ha utilizado un modelo de lesión traumática, la criolesión, consistente en la aplicación durante 30 segundos de un *pellet* de nieve carbónica (a una temperatura de -78°C) de 0.4 mm de diámetro sobre el hueso frontoparietal derecho del animal anestesiado. Este modelo ha sido descrito con anterioridad (Cook *et al.*, 1998, Chan *et*

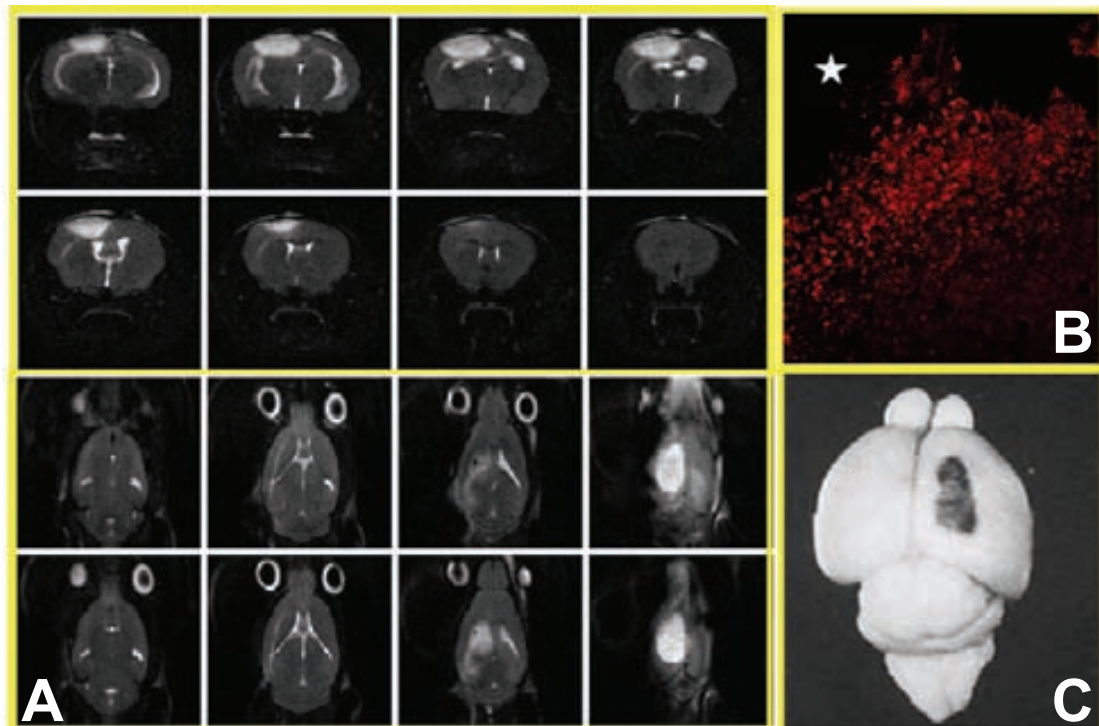


Figura 9. Signos característicos de la criolesión. A) Resonancia magnética nuclear (evaluación T2) de un ratón lesionado. Puede observarse el edema (áreas contrastadas) tanto a en cortes coronales como en sagitales, así como la localización y características de la lesión. **Colaboración con el SeRMN-UAB.** **B) Microglia reactiva /macrófagos en el borde de la lesión.** Tinción para la lectina, mostrando la presencia de microglia ameboide/macrófagos en el borde de la lesión (estrella). **C) Rotura de la barrera hematoencefálica.** Obsérvese la hemorragia en la zona de la lesión. **Extraído de Penkowa y Moos, 1995.**

al., 1991, Knerlich *et al.*, 1999, Murakami *et al.*, 1999, Penkowa y Moos, 1995), mostrando todas las características descritas anteriormente y esperables en una lesión como son la rotura de la BHE, edema, gliosis, reclutamiento de células inflamatorias, muerte necrótica y apoptótica e inducción de genes implicados en la supervivencia neuronal (Figura 9).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

- 1. Determinar los cambios en la expresión génica producidos durante la respuesta inflamatoria desencadenada por la criolesión.**
- 2. Establecer el papel del TNF- α en la respuesta inflamatoria tras criolesión, evaluando la implicación de cada uno de sus dos tipos de receptor.**
- 3. Analizar los cambios que la deficiencia o la sobre-expresión de IL-6 tienen en la expresión génica tras criolesión.**
- 4. Determinar los posibles mecanismos mediante los que las Metalotioneínas ejercen sus efectos neuroprotectores en la criolesión.**

III. RESULTADOS

Trabajo 1

El receptor 1 del TNF- α está implicado en la respuesta inflamatoria temprana en un modelo de lesión traumática del SNC.

Differential role of Tumor Necrosis Factor receptors in mouse brain inflammatory responses in cryolesion brain injury.

Journal of Neuroscience Research 82:701-716 (2005)

Differential Role of Tumor Necrosis Factor Receptors in Mouse Brain Inflammatory Responses in Cryolesion Brain Injury

Albert Quintana,¹ Mercedes Giralt,¹ Santiago Rojas,¹ Milena Penkowa,² Iain L. Campbell,³ Juan Hidalgo,¹ and Amalia Molinero^{1*}

¹Institute of Neurosciences and Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Animal Physiology Unit, Faculty of Sciences, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

²Department of Medical Anatomy, The Panum Institute, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

³School of Molecular and Microbial Biosciences, University of Sydney, Sydney, Australia

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is one of the mediators dramatically increased after traumatic brain injury that leads to the activation, proliferation, and hypertrophy of mononuclear, phagocytic cells and gliosis. Eventually, TNF- α can induce both apoptosis and necrosis via intracellular signaling. This cytokine exerts its functions via interaction with two receptors: type-1 receptor (TNFR1) and type-2 receptor (TNFR2). In this work, the inflammatory response after a freeze injury (cryolesion) in the cortex was studied in wild-type (WT) animals and in mice lacking TNFR1 (TNFR1 KO) or TNFR2 (TNFR2 KO). Lack of TNFR1, but not of TNFR2, significantly decreased the inflammatory response and tissue damage elicited by the cryolesion at both 3 and 7 days postlesion, with decreased gliosis, lower IL-1 β immunostaining, and a reduction of apoptosis markers. Cryolesion produced a clear induction of the proinflammatory cytokines interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α ; this induction was significantly lower in the TNFR1 KO mice. Host response genes (ICAM-1, A20, EB22/5, and GFAP) were also induced by the cryolesion, but to a lesser extent in TNFR1 KO mice. Lack of TNFR1 signaling also affected the expression of apoptosis/cell death-related genes (Fas, Rip, p53), matrix metalloproteinases (MMP3, MMP9, MMP12), and their inhibitors (TIMP1), suggesting a role of TNFR1 in extracellular matrix remodeling after injury. However, GDNF, NGF, and BDNF expression were not affected by TNFR1 deficiency. Overall, these results suggest that TNFR1 is involved in the early establishment of the inflammatory response and that its deficiency causes a decreased inflammatory response and tissue damage following brain injury. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: traumatic brain injury; knockout type-1 TNF receptor; knockout type-2 TNF receptor; gene expression; apoptosis

Several CNS pathologies involve inflammatory mediators, including stroke, brain trauma, seizures, ischemia (Olanow, 1993; Yankner, 1996; Price et al., 1998; Penkowa et al., 1999, 2000a; Carrasco et al., 2000), and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases (for review see Campbell, 1998; Culpán et al., 2003; Ethell and Buhler, 2003; McGeer and McGeer, 2003; Eissner et al., 2004). Inflammation may be a protective mechanism that isolates the injured area, destroys affected cells, and repairs the extracellular matrix; however, chronic presence of inflammatory mediators may be followed by increased oxidative stress and cell death (for review see Muñoz-Fernandez and Fresno, 1998; Hicks et al., 1999; Shohami et al., 1999; Sayer et al., 2002; Rothwell, 2003). The inflammatory response is orchestrated, in part, by relevant proinflam-

Contract grant sponsor: Ministerio de Ciencia y Tecnología and Feder SAF; Contract grant number: 2002-01268; Contract grant sponsor: Ministerio de Ciencia y Tecnología and Feder SAF; Contract grant number: 2005-00671; Contract grant sponsor: Direcció General de Recerca; Contract grant number: 2001SGR 00203; Contract grant sponsor: NIH; Contract grant number: NS36979; Contract grant number: MH62231; Contract grant sponsor: The Lundbeck Foundation; Contract grant sponsor: Kathrine og Vigo Skovgaard's Fond; Contract grant sponsor: Toyota Fonden; Contract grant sponsor: Dir. Ib Henriksens Fond; Contract grant sponsor: The Danish Medical Association Research Fund; Contract grant sponsor: Fru Lily Benthine Lunds Fond; Contract grant sponsor: Dagmar Marshalls Fond; Contract grant sponsor: Dir. Jacob Madsen's Fond; Contract grant sponsor: Eva og Henry Fränkels Mindefond.

*Correspondence to: Amalia Molinero, Institute of Neurosciences and Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Animal Physiology Unit, Faculty of Sciences, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: amalia.molinero@uab.es
Received 6 July 2005; Revised 13 September 2005; Accepted 13 September 2005

Published online 2 November 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.20680

matory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), which may be produced by and/or act on various cell types, lymphocytes, endothelial cells, and macrophage/microglia, producing secondary damaging effects that in turn lead to lymphocyte recruitment and activation and may cause neuronal cell death (Blüthmann et al., 1994; Lee and Benveniste, 1999; Lee and Chau, 2002; Hansson and Ronnback, 2003; Raivich et al., 2003).

TNF- α is a pleiotropic cytokine whose action is not restricted to the periphery but extends to important physiological and pathophysiological roles in the CNS (Gregersen et al., 2000). Upon CNS injury, TNF- α is dramatically up-regulated and is involved in the activation, proliferation, and hypertrophy of mononuclear, phagocytic cells and gliosis and eventually in the initiation of apoptosis. This cytokine exerts its biological functions via interaction with two receptors, the 55-kDa type-1 receptor (TNFR1) and the 75-kDa type-2 receptor (TNFR2), which seem to mediate significantly different functions in several diseases (MacEwan, 2002a,b) as well as in animal models (Rothwell and Hopkins, 1995; Probert and Akassoglou, 2001). TNFR1 belongs to the so-called TNFR superfamily of death receptors, which also includes Fas/APO-1/CD95, that have a homologous cytoplasmic domain known as the death domain (DD; for review see Debatin, 2004). TNFR2, although not possessing a DD sequence, can also lead to apoptosis via adaptor proteins and has been involved in the control of cell proliferation and in the elimination of autoreactive effector cells in an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) paradigm (Suvannavejh et al., 2000).

Traumatic brain injury initiates a complex sequence of pathophysiological responses at the lesion site. The study of the sequence of inflammatory cascade activation and the role of each mediator in the regulation of this process may provide some insight into when and why the damaging role of inflammation overrides the protective role. Cryolesion of the parietal cortex is an established experimental model (Chan et al., 1991; Cook et al., 1998; Knerlich et al., 1999; Murakami et al., 1999) that features a standardized focal blood-brain barrier (BBB) disruption, massive brain edema, gliosis, recruitment of inflammatory cells, necrotic and apoptotic death, and up-regulation of a number of genes attempting to increase neuronal survival and promoting the regeneration of brain parenchyma. We have used the cryolesion model successfully for several years, and, provided that care is taken to blind the analyses, the results obtained are highly reproducible (Penkowa et al., 1999, 2000a; Giralt et al., 2002). This makes this model particularly appealing for exploring the role of TNF signaling in the CNS response to traumatic brain injury, and in this study we provide insight into the putative differential role of TNFR1 and TNFR2 in this scenario.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Breeding pairs of homozygous TNFR1 and TNFR2 null mice (TNFR1 KO and TNFR2 KO, respectively) were

kindly provided by Horst Blüthmann (Hoffmann-la Roche), and maintained on the inbred C57BL/6 genetic background. Control wild-type (WT) mice (C57BL/6) were used in all experiments. All mice were kept under constant temperature and with free access to food and water. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of the Comissió d'Experimentació animal del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

Cryolesion Procedure

Female adult mice (3–4 months age) were lesioned under tribromoethanol anesthesia. The skull over the right frontoparietal cortex was exposed, and a focal cryoinjury was carried out as previously described (Penkowa and Moos, 1995; Penkowa et al., 1999). Animals were allowed to recover and returned to the animal room and were subsequently killed at four time points after cryolesion: 8 or 24 hr postlesion (hpl; $n = 5-8$) for RNase protection assay studies (RPA) and 3 or 7 days postlesion (dpl; $n = 2-3$) for immunohistochemistry studies. Unlesioned WT, TNFR1 KO, and TNFR2 KO mice were also included. Furthermore, sham-operated mice ($n = 4$ per group) were sacrificed at 24, 48, or 72 hpl (not shown).

Different procedures were followed for the conservation of brain depending on the technique used, so the ipsilateral cortex was dissected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for the RNase protection assay (RPA) technique, and complete brains were fixed on 4% paraformaldehyde for immunohistochemistry (see below for further details).

RPA

Total RNA of injured ipsilateral cortex was isolated following standard methodology (Chomczynski and Sacchi, 1987), using commercial TriPure Isolation Reagent Kit (Roche). We used the whole ipsilateral cortex rather than attempting to use the damaged area only. This was done because cryolesion produces a large lesion, but to determine the limits of the lesion by eye when carrying out the dissection is not straightforward, so to eliminate the risk of incurring significant errors from animal to animal the entire cortex was removed. We acknowledge, nevertheless, that this causes a diluting effect that decreases sensitivity in the assay and may cause the loss of significant changes in low-expression genes.

Multiprobe RPA sets were constructed to detect either cell death-associated (Fas, Fas-L, RIP, P53, ICE, Bcl-2) or neurotrophin (BDNF, NGF, CNTF, GDNF, NT-3) mRNAs. Briefly, target sequences were synthesized by RT-PCR, cloned into the pGEM-4Z vector (Promega, Madison, WI), and verified by sequence analysis using methods described previously (Stalder et al., 1999). The targeted sequences for the cell-death-associated probes were: FAS, nucleotides (nt) 721–1021 (GenBank accession No. M83649); FASL, nt 188–473 (GenBank accession No. U10984); RIP, nt 101–351 (GenBank accession No. U25995); P53, nt 871–1096 (GenBank accession No. X00741); ICE, nt 1602–1802 (GenBank accession No. U04269); and Bcl-2, nt 1841–1991 (GenBank accession No. M16506). The neurotrophin multiprobe RPA set comprised of the following probes: NGF, nucleotides (nt) 432–612 (GenBank accession No. M17298); GDNF, nt 60–377 (GenBank accession

No. U37459); NT-3, nt 637-866 (GenBank accession No. X53257); BDNF, nt 531-778 (GenBank accession No. X55573); and CNTF, nt 1404-1603 (GenBank accession No. U05342). The construction and characterization of the other multiprobe sets for cytokines (LT- α , IL-4, IL-5, IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α) host-response (iNOS, Mac1, A20, ICAM 1, EB22/5, GFAP), matrix metalloproteinases (MMP11, MMP-10, MMP-7, MMP-12, MMP-9, MMP-3, MMP-13, MMP-14, MMP-2), and their inhibitors (TIMP-3, TIMP-1, TIMP-2, α 2-M) were described elsewhere (Hobbs et al., 1993; Campbell et al., 1994; Chiang et al., 1994; Pagenstecher et al., 1997).

For the synthesis of a radiolabeled antisense RNA probe set, the final reaction mixture contained 120 μ Ci, UTP (3,000 Ci/nmol; Amersham, Arlington Heights, IL) UTP (73 pmol), GTP, ATP, CTP (2.5 mmol each), DTT (100 nmol), transcription buffer (1 \times), Rnasin (20 U), T7 polymerase (10 U; all from Promega), and an equimolar pool of EcoRI-linearized templates (150 ng total). Dried probe was then dissolved (2.2×10^5 cpm/ μ l) in hybridization buffer and added to 10 μ g of total RNA from brain, and the samples were overlaid with mineral oil, heated to 96°C, and then incubated at 56°C for 12-16 hr. Single-stranded RNA was digested with RNases A and T1. Hybridized RNA remained RNase protected. RNA duplexes were purified, precipitated, and resolved on 5% acrylamide/7 M urea TBE sequencing gel. Dried gels were placed on XAR film (Kodak, Rochester, NY) with intensifying screens, and films were exposed at -70°C during 16-72 hr, depending on the probe set. The intensity of the bands was measured densitometrically (only for low-expression genes) and/or (in most cases) by phosphorimaging and normalized with L32 mRNA levels.

Immunohistochemistry

Fixed brains were dehydrated and embedded in paraffin according to standard procedures and cut in serial, coronal, 3- μ m sections. Sections were rehydrated and underwent heat-induced antigen retrieval by boiling sections in citrate buffer, pH 9.1 or pH 6.0, in a microwave oven for 10 min. Afterward, the sections were incubated in 1.5% H₂O₂ in TBS/Nonidet to quench endogenous peroxidase, followed by 10% goat serum (In Vitro; code 04009-1B) or donkey serum (The Binding Site; code BP 005.1) to block nonspecific binding. Sections to be immunostained with monoclonal mouse-derived primary antibodies were in addition incubated with Blocking Solutions A + B from the HistoMouse-SP Kit (Zymed, South San Francisco, CA; code 95-9544) to quench endogenous mouse IgG.

Primary antibodies. Sections were incubated overnight at 4°C with the following antibodies: rat anti-mouse F4/80 1:25 (Serotec, Bicester, United Kingdom; code MCA 497; marking monocytes/macrophages); rabbit anti-cow GFAP 1:250 (Dakopatts, Glostrup, Denmark; code Z334; marking astrocytes); 1:50 mouse anti-rat CD3 (Serotec; code MCA 772; marking T cells); mouse anti-IL-1 β 1:50 (Biogenesis; code 5375-4329); rabbit anti-NIT 1:100 (Alpha Diagnostics; code NITT 12-A; a marker for peroxynitrite-induced nitration of tyrosine residues); mouse anti-8-oxogua-

nine 1:100 (Chernicon U.K.; code MAB-3560; marking oxidative DNA damage); and rabbit anti-human (activated/cleaved) caspase-3 1:50 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA; code 9661).

Secondary antibodies and detection systems. Sections were incubated for 30 min at room temperature with the following secondary antibodies: biotin-conjugated anti-rabbit IgG 1:400 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; code B3275) or biotin-conjugated anti-mouse IgG 1:200 (Sigma-Aldrich; code B8774) or biotin-conjugated anti-rat IgG 1:1500 (Amersham Biosciences; code 1005); or biotin-conjugated anti-mouse IgM 1:20 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; 115-065-020). All the secondary antibodies were detected by StreptABCComplex/HRP, followed by biotinylated tyramide and streptavidin-peroxidase complex (tyramide signal amplification, TSA indirect; NEN, Life Science Products, Boston, MA; code NEL700A) prepared following the manufacturer's recommendations. The immunoreaction was visualized by using diaminobenzidine (DAB) as a chromogen.

Controls. To evaluate the extent of nonspecific binding of the antisera in the immunohistochemical experiments, 1:100-1:1,000 of normal goat or donkey serum was substituted for the primary antibody step described above. Other control sections were incubated with isotypic IgG instead of the primary antibody. Results were considered only if these controls were negative.

In Situ Detection of DNA Fragmentation

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end labelling (TUNEL) was performed using the Fragment End Labeling (FragEL) Detection Kit (Calbiochem, La Jolla, CA; code QIA33). The FragEL kit contains all the materials used below, and each step was performed according to the manufacturer's recommendations. The tissue was processed and rehydrated as mentioned above, and sections were incubated with 20 μ g/ml proteinase K for 20 min to strip off nuclear proteins. After immersion in equilibration buffer for 20 min, sections were incubated with TdT and biotin-labeled deoxynucleotides (dNTP-biotin) in a humidified chamber at 37°C for 1.5 hr. Wash buffer and the stop solution for 5 min at room temperature to stop the reaction followed this. After being washed in TBS and incubated in blocking buffer for 10 min, the sections were incubated with peroxidase-streptavidin for 30 min, and, afterward, DAB was used as chromogen. The sections were counterstained with methyl green. Negative control sections were treated similarly but incubated in the absence of TdT enzyme or dNTP-biotin or peroxidase-streptavidin. We also compared our sections with positive control slides provided in the FragEL Detection Kit. Furthermore, TUNEL was compared with staining for the apoptotic marker caspase-3. TUNEL⁺ and caspase-3⁺ cells also displayed morphological criteria for apoptosis (cell shrinkage, formation of apoptotic bodies, and compaction of chromatin into uniformly dense masses) after H-E staining.

Cell Counts

In addition to morphological evaluation, the number of stained cells was quantified in a blind manner in matched

704 Quintana et al.

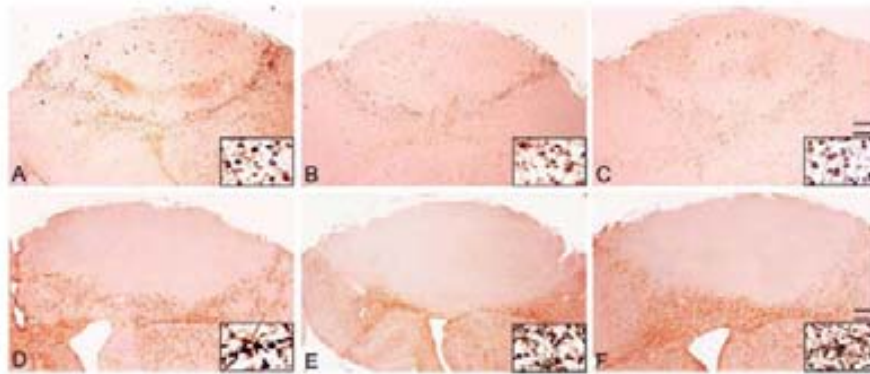


Fig. 1. A-F: Role of TNF receptors on cryolesion induced gliosis. Blood borne macrophages were readily identified by F4/80 immunohistochemistry (top), and reactive astrocytosis was demonstrated by GFAP immunostainings (bottom) in the areas surrounding the necrotic tissue. Both immunostainings tend to be decreased in TNFR1 KO mice (B-E), while only F4/F80 immunostaining tends

to be decreased in TNFR2 KO mice too (C-F) compared with WT mice (A-D). Prototypical reactive morphology for microglia/macrophages (rounded) and astrocytes (hypertrophic) are visible in the lesioned area (insets). Stainings are representative of two or three animals per group. Scale bars — 200 μm in A-F; 72 μm in insets to A-C; 89 μm in insets to D-F.

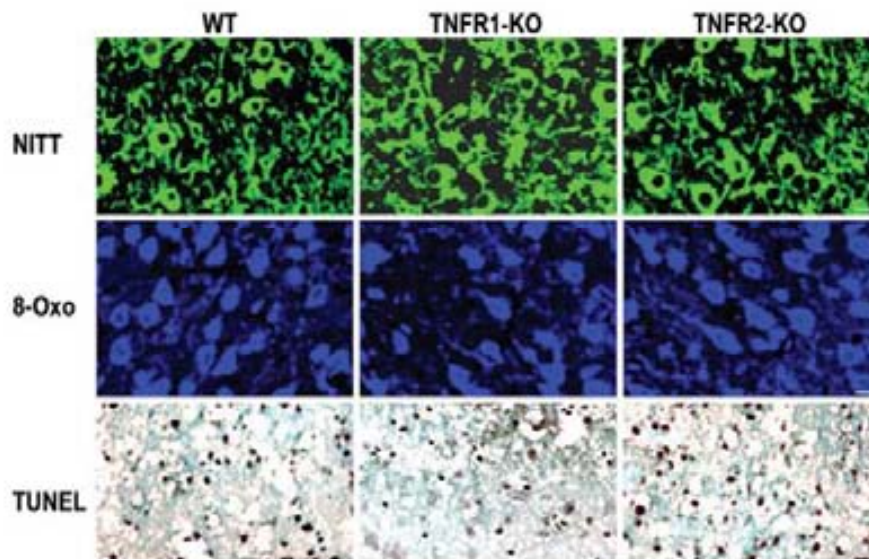


Fig. 2. Oxidative stress and apoptosis in the brain tissue surrounding the injured area. The oxidative stress markers NITT and 8 oxo were dramatically high in lesioned brains (almost no signal is seen in unlesioned animals; not shown), but there were no differences between strains. TUNEL positive cells are shown at the bottom; it is clear that TNFR1 KO mice showed fewer Tund positive cells. Scale bar — 44 μm .

0.5-mm² areas at the border of the lesion. Cell counts were performed from three sections per mouse in all mice. Positively vs. negatively stained cells were previously demonstrated in detail (Carrasco et al., 2003; Penkowa et al., 2003).

Statistical Analysis

Weight differences between strains were evaluated by Student's *t*-test. Gene expression results and also immunohistochemical results were evaluated by two-way analysis of variance (main factors: cryolesion and strain), after checking the homogeneity of variances. The interactions, when significant, were decomposed by using Bonferroni post-test. All data in the text and figures are given as the arithmetic mean (\pm SEM).

RESULTS

TNFR1 but Not TNFR2 Deficiency Alters the Response of the Brain to Injury

TNFR1 KO and TNFR2 KO mice developed normally, with no visible neurological deficits. The histopathological analyses revealed that only TNFR1 deficiency made a difference regarding the response of the CNS to the cryoinjury, showing that the TNFR2 KO mice manifest essentially the same responses as WT mice (Figs. 1-3). The results for unlesioned animals are not shown for the sake of clarity, but there were no evident differences among the three strains. Having these results in mind, we focused our analysis of gene expression pat-

terns in the TNFR1 KO mice. It is important to acknowledge that unlesioned animals were not sham operated, thus they are naïve animals. Results from our group show that the anesthesia and surgical procedures used do not affect the expression of the genes analyzed up to 72 hr postlesion (data not shown).

Gliosis and Cytokine Expression Are Affected by TNFR1 Deficiency

As expected, we observed the prototypical response at 3–7 dpl in response to cryolesion: a necrotic area was produced in the cortex, infiltration by inflammatory cells (macrophages, T cells) was clear, and a pronounced gliosis was evident in the areas surrounding the necrotic tissue, where active apoptosis was ongoing (Figs. 1–3). Activated microglia/macrophages were evident both in the border of the lesion and within the necrotic tissues, many of which were of blood origin as revealed by F4/F80 immunostaining. CD3-positive T cells were also present in the lesioned mice. Reactive, hypertrophic astrocytes were also clearly observed in the border of the lesion by means of GFAP immunostaining. Compared with WT mice, TNFR1 KO mice showed a clear reduction of these responses, suggestive of a decreased inflammatory response. Nevertheless, this reduction was statistically significant only for GFAP immunostaining ($P = 0.026$), although it was close to significance for F4/F80 ($P = 0.054$). The numbers of F4/F80- and GFAP-positive cells in unlesioned mice were about six and eight, respectively, in the three strains.

An altered inflammatory response in the TNFR1 KO mice was further demonstrated by analysis of the gene expression of several cytokines (Fig. 4a,b). Thus, the expression of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-1 (α and β) was strongly induced at 8 hpl, returning to almost basal levels at 24 hpl for all cytokines except IL-1 α , whose expression had completely returned to basal levels (Fig. 4a,b). These responses were significantly blunted in TNFR1 KO mice. In accordance with these results, IL-1 β immunostaining was reduced in TNFR1 KO mice at 3 dpl, an effect becoming more evident at 7 dpl (Fig. 3). IFN- γ and LT- α also tended to be up-regulated by the cryolesion (Fig. 4a), but the signal was too low for accurate measurements.

The inflammatory status was also evaluated by analyzing several host-responsive genes (Fig. 5a,b). GFAP gene expression was in accordance with the GFAP immunostainings, showing a dramatic up-regulation in the lesioned cortex that was partially blunted in the TNFR1 KO mice. Mac-1 expression, a marker of microglia/macrophages, was not significantly altered by injury at the time points studied (it takes a few days normally), but it is worthwhile to mention that TNFR1 KO mice presented lower mRNA levels than WT mice (Fig. 5b), which is reminiscent of the F4/F80 IHC results (see above). The EB22/5 (an acute-phase response gene) gene expression pattern was similar to that

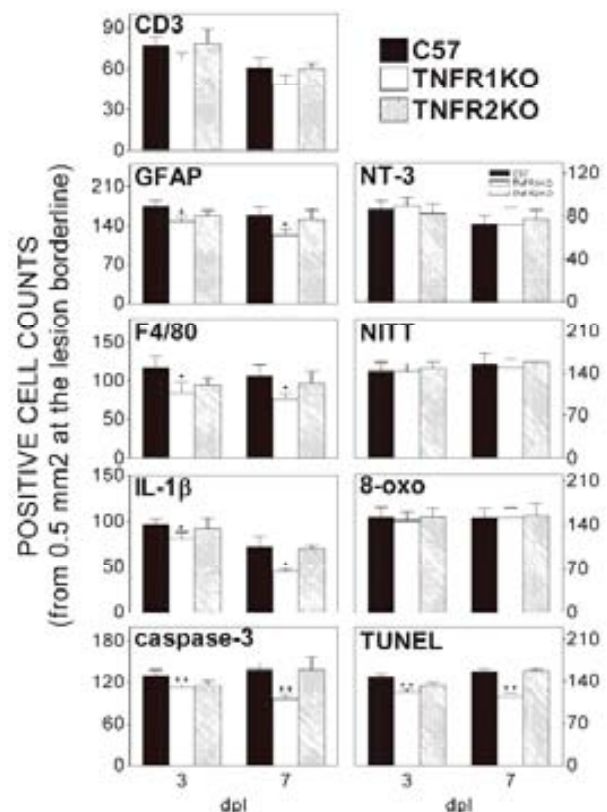


Fig. 3. Cell counts for GFAP-, NT-3-, F4/80-, NIT1-, IL-1 β -, 8-oxo-, caspase-3-, and TUNEL-positive cells in the border of the lesion. The number of immunoreactive cells (mean \pm SD, $n = 2-3$) was measured in a 0.5-mm² area surrounding the lesion, as described in Materials and Methods. The TNFR1 KO mice showed a significantly decreased number of GFAP⁺ astrocytes, caspase-3⁺ cells, and TUNEL relative to WT mice (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$) and a clear tendency for the number of F4/80⁺ macrophages ($P = 0.054$). No effect of TNFR2 absence was noted in these parameters in response to cryolesion.

of GFAP, whereas the patterns of ICAM-1 (involved in cell adhesion with roles in inflammation, proliferation, migration, and angiogenesis) and A20 (an antiapoptotic zinc finger protein) were similar to those of the cytokines, with prominent up-regulation at 8 hpl and a clear tendency to return to basal levels at 24 hpl. In all cases, TNFR1-null mice had a lower expression of these genes compared with their WT controls, which is again suggestive of a decreased inflammatory response after cryolesion.

Apoptosis, but Not Oxidative Stress, Is Reduced in TNFR1 KO Mice

As expected, many apoptotic cells were detected in the border of the lesion, as judged from caspase-3

706 Quintana et al.

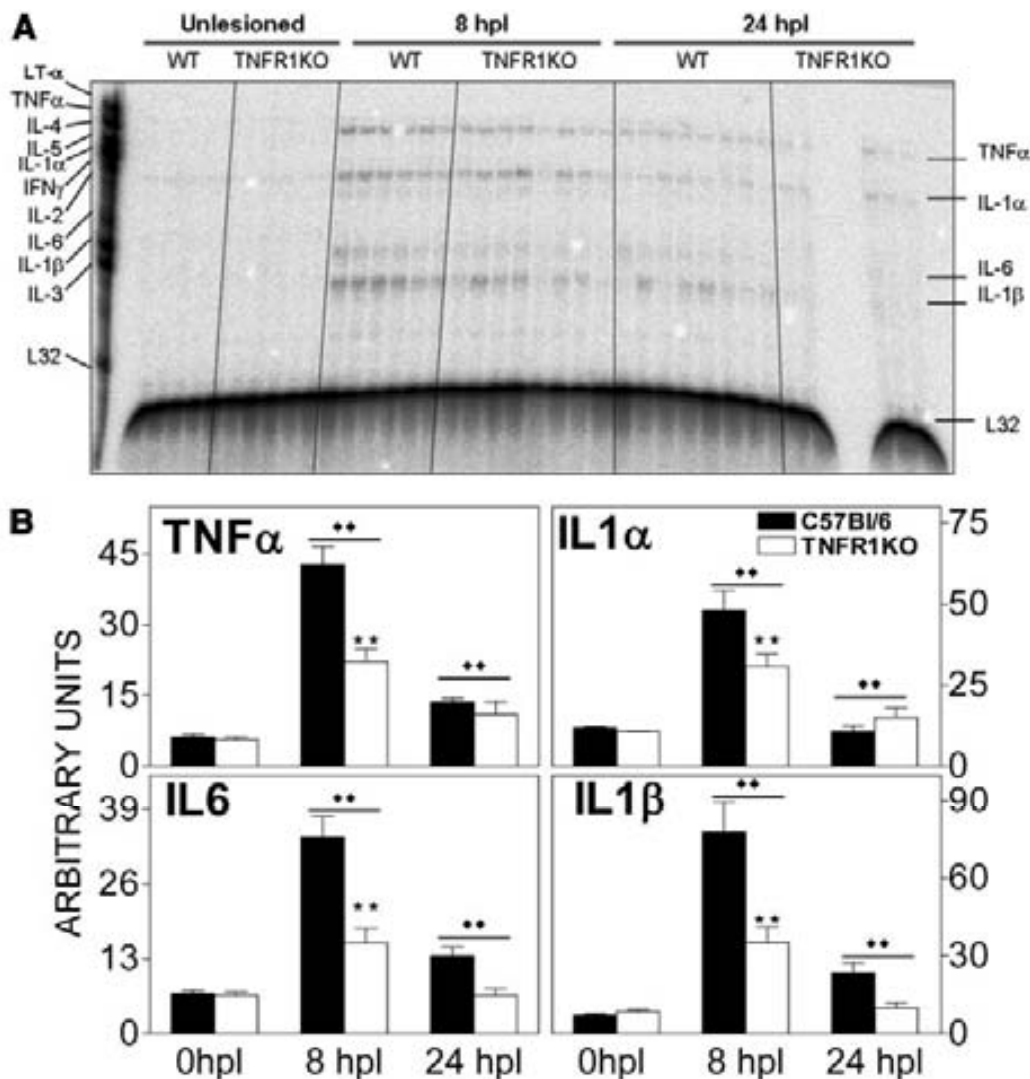


Fig. 4. Analysis of cytokine gene expression. Wild type (C57Bl/6) and TNFR1 KO mice were subjected to a cryolesion of the left cortex and killed after 8 or 24 hr after the lesion (8 and 24 hpl, respectively). Unlesioned mice from both strains were also killed (0 hpl). mRNA levels of several cytokines were analyzed by RNase protection assay (RPA; A). mRNA levels were quantitated by phosphorimaging and normalized with L32 mRNA levels (B). Results (abi

trary units; mean \pm SEM; $n = 5-8$) were evaluated by using two way ANOVA with cryolesion and strain as the main factors. $^{***}P < 0.01$ vs. unlesioned mice; $^{**}P < 0.01$ vs. wild type mice. The image shown here is that produced by the phosphorimaging system; the images shown for the other RPA sets (Figs. 5-9) are from autoradiographic films, and quantification was by phosphorimaging.

immunostainings and TUNEL-positive cells (Figs. 2, 3). These apoptotic markers were reduced in animals lacking TNFR1, which is consistent with the symptoms of a decreased inflammatory response. NIT2 and 8-oxoguanine immunostainings, markers of oxidative stress, were dramatically increased in the lesioned animals compared with unlesioned mice (not shown), but, somewhat surprisingly, they were not diminished in TNFR1 KO ani-

mals (Figs. 2, 3), suggesting that the diminished cell death observed in these mutant mice is not caused by an alteration of oxidative stress levels. To explore other possibilities, we evaluated a number of apoptosis-related genes (Fig. 6a,b). RIP, a factor involved in TNFR1 apoptotic pathway, was up-regulated by the cryolesion, peaking at 24 hpl, and, as could be expected, such a response was basically absent in the TNFR1 KO mice.

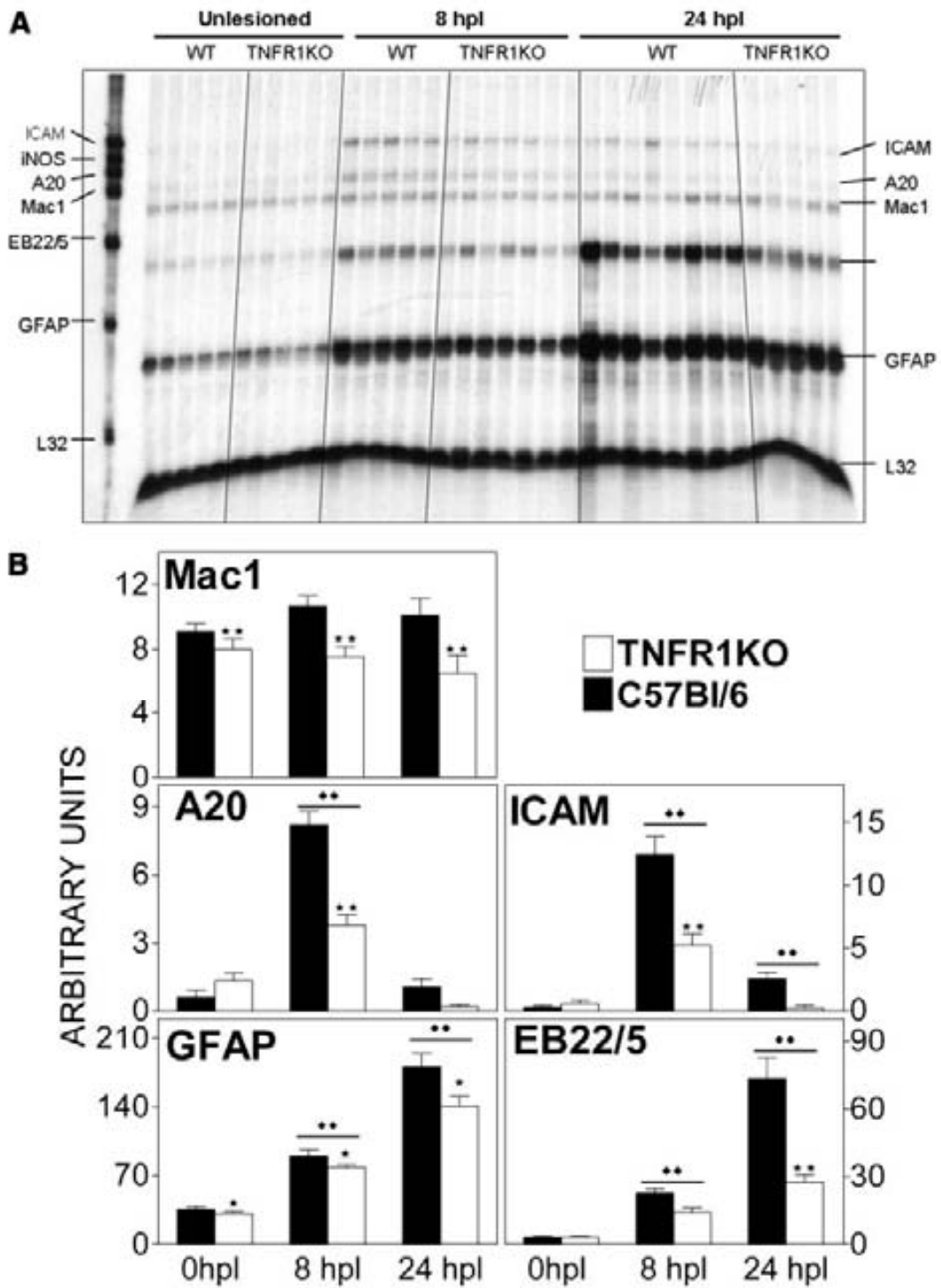


Fig. 5. Analysis of host response gene expression (see Fig. 4 legend for details). mRNA levels were analyzed by RPA (A) and were quantitated and normalized with L32 mRNA levels (B). ****** $P < 0.01$ vs. unlesioned mice; ***** $P < 0.05$, ****** $P < 0.01$ vs. wild type mice.

708 Quintana et al.

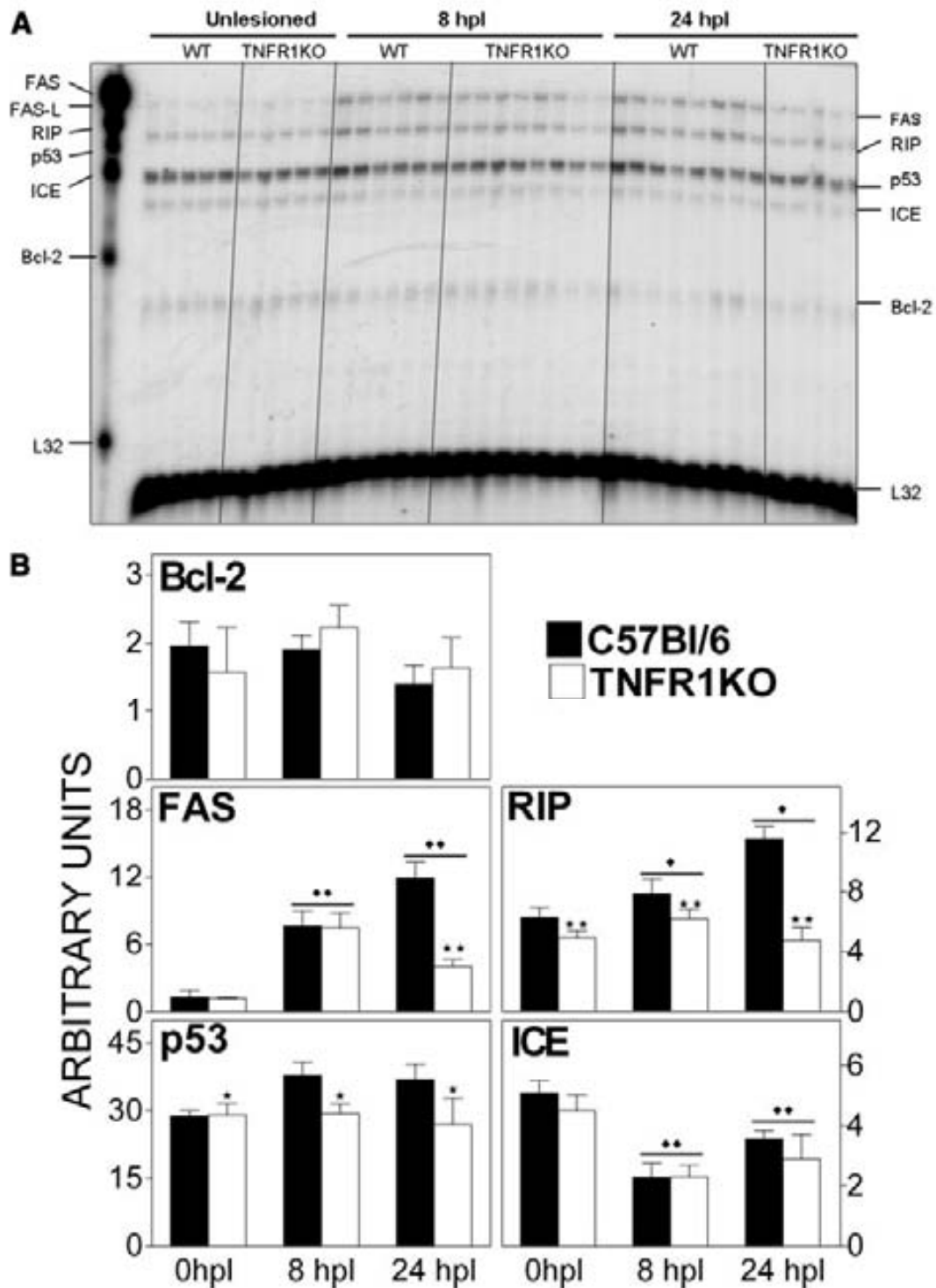


Fig. 6. Analysis of cell death response gene expression (see Fig. 4 legend for details). mRNA levels were analyzed by RPA (A) and were quantized and normalized with L32 mRNA levels (B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. unlesioned mice; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. wild type mice.

The Fas and Fas-ligand system has been extensively described as a prototypic inducer of the extrinsic cell death pathway. Accordingly, Fas expression was induced at 8 hr after brain injury, but no differences between strains were observed at this point. However, at 24 hpl, although mRNA levels continued increasing in WT animals, a decreased expression was noted in TNFR1 KO mice, suggesting that, whereas TNFR1 might not be involved in primary stages of Fas induction, it is necessary in the reinforcement of its response. These RIP and FAS results are consistent with the caspase-3 and TUNEL results (see above), which altogether suggest an oxidative stress-independent, important role of TNFR1 signaling for controlling apoptosis during the cryolesion model.

Interleukin-converting enzyme (ICE) expression was reduced after cryolesion, but no involvement of TNFR1 was observed. Neither antiapoptotic gene Bcl-2 nor proapoptotic gene p53 was altered by cryolesion at any time point studied, except for a slight, but not significant, increase in p53 expression observed in WT mice; nevertheless, such a tendency was not observed in the TNFR1 KO mice, and indeed two-way ANOVA detected a slight but significant reduction of p53 mRNA levels.

TNFR1 Regulates MMP/TIMP Expression After Cryolesion

MMP3, -9, -12, and -14 were induced by cryolesion (Fig. 7a,b). MMP3 levels were below the detection limit in unlesioned mice but were up-regulated at 8 hpl, increasing even further at 24 hpl. TNFR1 KO mice showed lower induction of MMP3 compared with WT mice after cryolesion. MMP12 was down-regulated in TNFR1 KO mice compared with WT mice at all time points analyzed, including unlesioned mice, suggesting a role of TNFR1 in the physiological regulation of this factor. MMP9 and MMP14 were also induced by cryolesion at 24 hpl, but no differences among strains were noted. MMP11 expression was not modified by cryolesion or by TNFR1 absence.

Tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) were also studied (Fig. 8a,b). TIMP-1 mRNA was undetectable in unlesioned animals but was up-regulated by the cryolesion, the highest levels being observed at 24 hpl. TNFR1 null mice showed a reduced induction of this gene. TIMP-3, but not TIMP-2, was altered by cryolesion, showing a slight increase at 8 hpl. Neither TIMP-3 nor TIMP-2 presented differences between genotypes.

Lack of TNFR1 Does Not Affect Neurotrophin Expression

By immunohistochemistry, cells positive for NT-3 were increased by the lesion (not shown), but no differences were observed among strains at 3–7 dpl (Fig. 3). When gene expression of several neurotrophic factors was analyzed, similar results were obtained. Thus, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression, but not that of nerve growth factor (NGF) and glial-derived

neurotrophic factor (GDNF; which nevertheless tended to increase), was increased by the cryolesion, and TNFR1 deficiency did not affect any of these responses (Fig. 9a,b).

DISCUSSION

Roles of TNF- α Receptors in Response to Brain Injury Are Diverse

We have studied the role(s) of a major proinflammatory cytokine, TNF- α , on the response of the brain to traumatic brain injury, one of the main causes of disability and death, especially among young people. To this end, we have used a cryolesion procedure and have taken advantage of transgenic mice in which either the type I or the type II receptor of TNF- α has been knocked out. As stated above, we have used this cryolesion procedure extensively, in studies in which a major role of another cytokine, IL-6, was demonstrated (Penkova et al., 1999, 2000a,b; Molinero et al., 2003; Poulsen et al., 2005). Cytokines often show overlapping effects, and, not surprisingly, IL-6 could not account for all the effects of the inflammatory response caused by cryolesion, suggesting that other factors might be involved in the control of these responses. As also seen in this study, TNF- α is dramatically up-regulated by the cryolesion and thus may be one of the factors underlying the response of the CNS to damage. Our results indeed support this assumption. As expected, cryoinjury produced an inflammatory response, with prototypic inflammatory cell infiltration, establishment of an acute-phase response, glial reactivity, and increased oxidative stress and apoptotic cell death in the border of the lesion. The intensity of many of these responses was lower in mice lacking TNFR1 but not TNFR2, demonstrating a role of TNF- α in the establishment of the inflammatory response and in the activation of proapoptotic pathways signaling through TNFR1.

Several experimental models of ischemia and trauma have demonstrated that an acute and transient up-regulation of brain TNF- α occurs at the site of injury (Dopp et al., 1997; Shohami et al., 1999; Arnett et al., 2001; Raivich et al., 2003; Lamberts et al., 2005). What the physiological function(s) of TNF- α could be remains to be resolved, in that numerous studies show both neuroprotective and neuropathological effects of this cytokine, depending on the type of cell, production of other cytokines, oxidative stress, experimental paradigm, timing, etc. (Muñoz-Fernández and Fresno, 1998; Shohami et al., 1999; Little et al., 2002).

The generation of transgenic mice has been very useful in general for ascertaining the role of a given protein in complex biological systems such as this, and indeed some results have already been gathered for the role of TNF- α in some models of brain injury. Thus, in the pioneering study of Mattson and collaborators with mice deficient in both TNFR1 and TNFR2 (Bruce et al., 1996), it was clearly shown that damage to neurons caused by either focal cerebral ischemia (middle

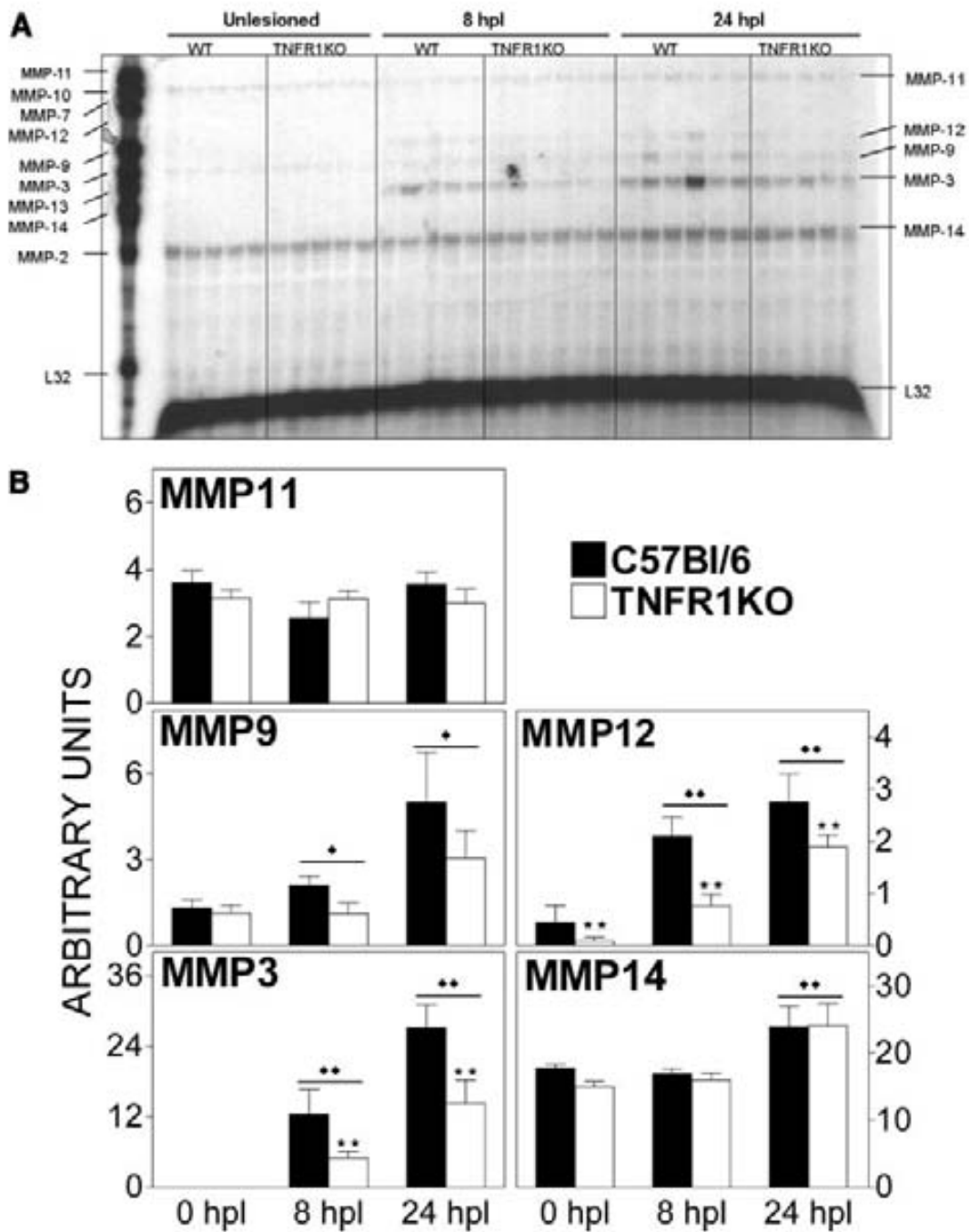


Fig. 7. Analysis of matrix metalloproteinases gene expression (see Fig. 4 legend for details). mRNA levels were analyzed by RPA (A) and were quantitated and normalized with L32 mRNA levels (B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. unlesioned mice; ** $P < 0.01$ vs. wild type mice.

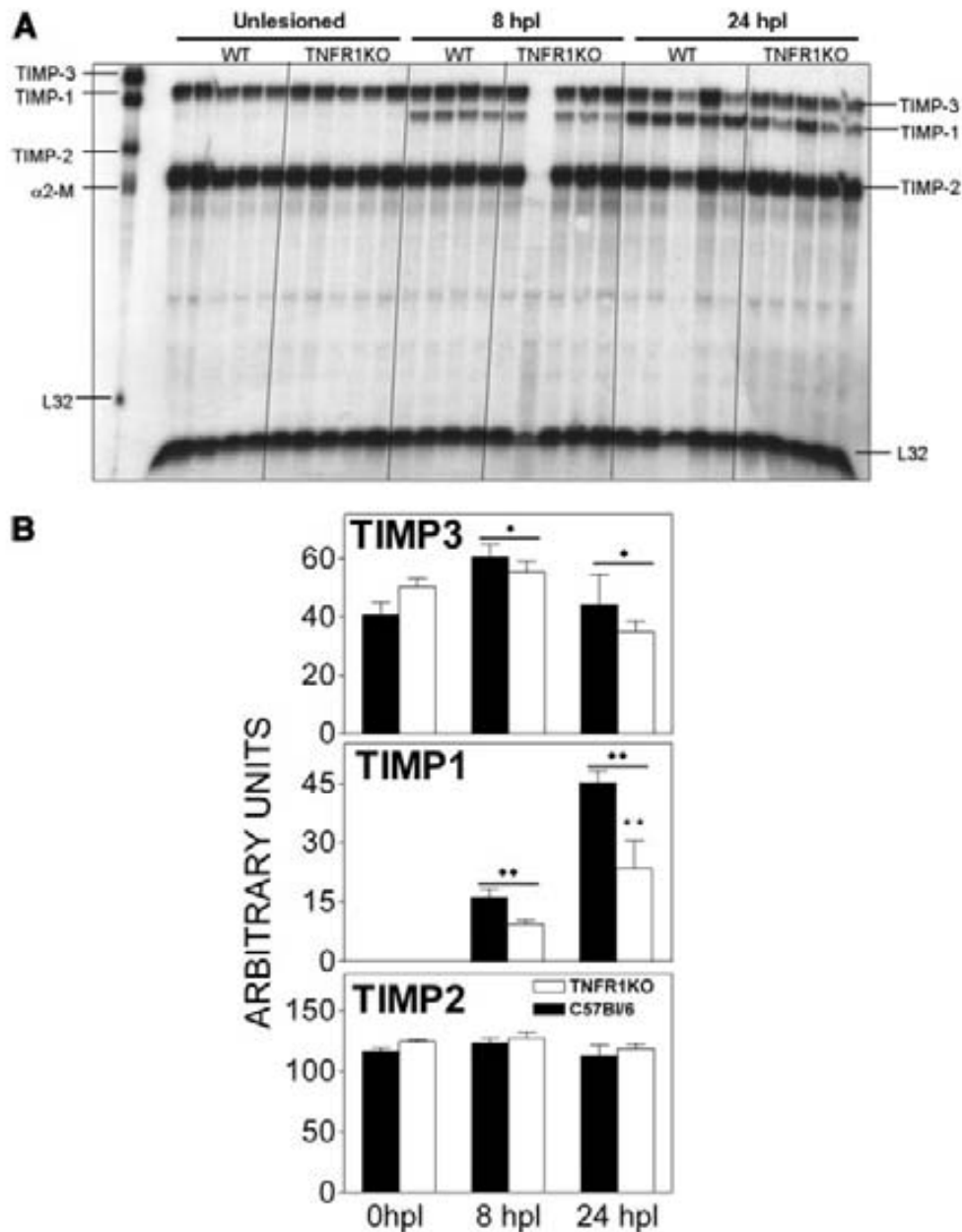


Fig. 8. Analysis of tissue inhibitors of metalloproteinases gene expression (see Fig. 4 legend for details). mRNA levels were analyzed by RPA (A) and were quantitated and normalized with L32 mRNA levels (B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. unlesioned mice; ** $P < 0.01$ vs. wild type mice.

cerebral artery occlusion, MCAO) or kainic acid-induced seizures was exacerbated in the absence of TNF- α signaling, indicating a neuroprotective role of TNF- α in vivo and that microgliosis was blunted, demonstrating an essential role in injury-induced immune response in the CNS. Moreover, in vitro studies also demonstrated a significant role of TNF- α in neuronal

survival per se and in KA-treated cells, as well as in astrocyte proliferation. The same group demonstrated that these neuroprotective effects of TNF- α likely are mediated by TNFR1 but not TNFR2 (Gary et al., 1998). In contrast, both receptors do mediate physiological effects in an animal model of multiple sclerosis, EAE: thus TNFR1 KO mice show a delayed onset of the dis-

712 Quintana et al.

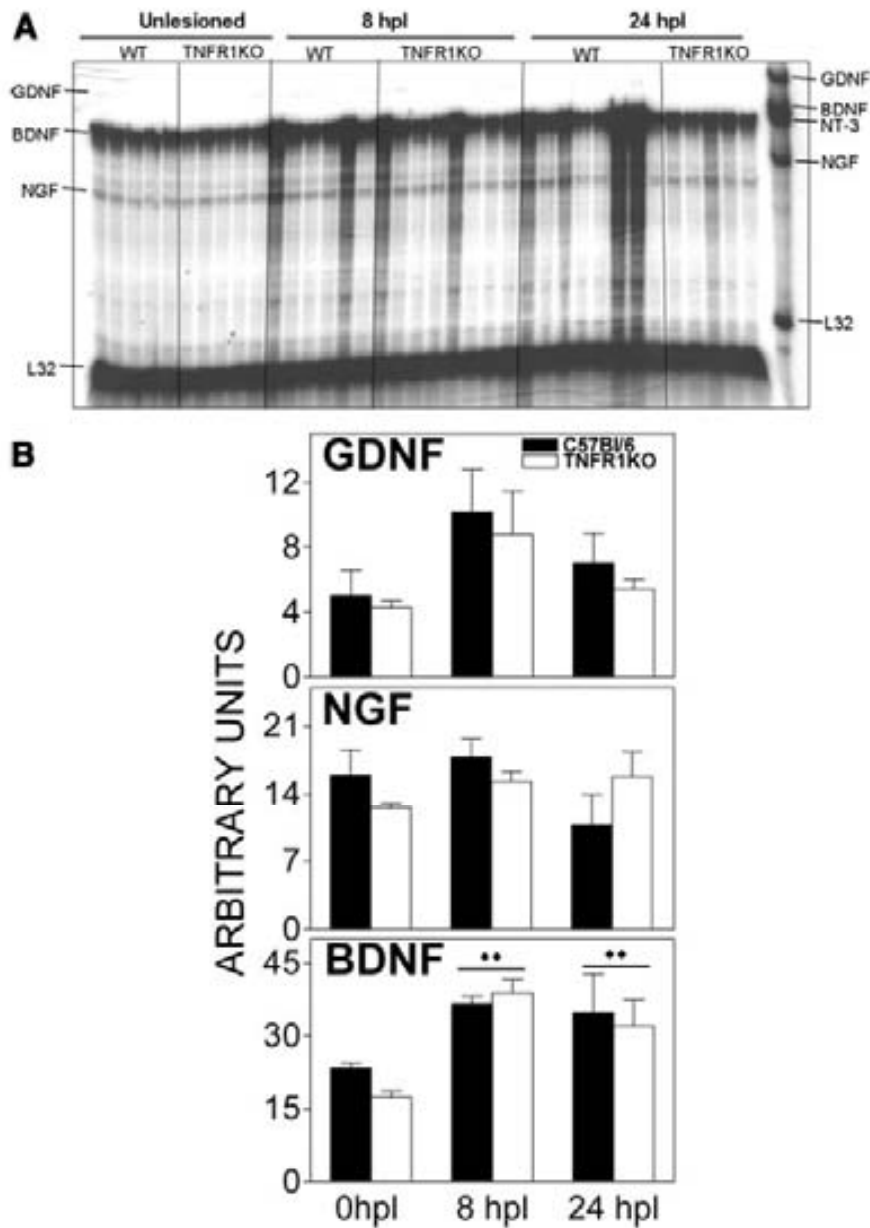


Fig. 9. Analysis of neurotrophine genes expression (see Fig. 4 legend for details). mRNA levels were analyzed by RPA (A) and were quantitated and normalized with L32 mRNA levels (B). ** $P < 0.01$ vs. unlesioned mice.

ease and a less severe course, whereas, in TNFR2 KO mice, EAE was dramatically exacerbated (Eugster et al., 1999). This indicates opposing roles of the two signaling systems in this experimental model of CNS disease. Similar conclusions (with the exception of a more dramatic phenotype of TNFR1 KO mice) were arrived at by Suvannavejh and colleagues (2000).

A thorough analysis of the role of TNF- α in the EAE model indicates that this cytokine is not essential for the inflammation of CNS or for demyelination to develop, but that it is critical for EAE initiation and for modulating the inflammatory cell trafficking (particularly T cells) into the CNS parenchyma (Probert et al., 2000; Probert and Akassoglou, 2001). Interestingly, TNF- α

not only can cause demyelination but also promotes the proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination in the toxin-based cuprizone model (Arnett et al., 2001), again highlighting the dual role of this cytokine.

The apparent neuroprotective role of TNFR2 and the opposite role of TNFR1 has been reinforced by some *in vitro* studies (Yang et al., 2002), but it is clear that this cannot be considered a general feature. For instance, no effect on cells following deletion of either TNFR1 or TNFR2, alone, is observed in the axotomized facial motor nucleus model (Raivich et al., 2002), and a detrimental role of TNFR2 but not of TNFR1 is seen in experimental cerebral malaria (Lucas et al., 1997). A proinflammatory role of TNFR2 at the level of the CNS vascular endothelium, leading to vessel occlusion and secondary multifocal ischemic injury, has also been shown in a "humanized" transmembrane TNF/TNFR2 transgenic mouse model (Akassoglou et al., 2003). In the axotomized facial motor nucleus model, nevertheless, an almost complete prevention of cell death is seen when both TNFRs are not present, suggesting a detrimental role of TNF- α (Raivich et al., 2002), in sharp contrast to the ischemia and KA models discussed above.

TNFR1 but Not TNFR2 Deficiency Decreases the Inflammatory Response and Apoptosis Without Affecting Oxidative Stress

The above-mentioned data gathered with a transgenic approach similar to that of this study clearly show that the roles of TNF- α may depend on the type of injury being caused to the CNS. Our results with the cryolesion model of traumatic brain injury (TBI) could therefore add some insight in this regard, in that, in the few studies carried out with other TBI models, conflicting results still persist. Thus, in the cortical impact model of TBI, an exacerbation of damage (lesion volume and BBB disruption) was observed in mice lacking both TNFR1 and TNFR2 7 days after injury, which might be related to a decreased NF- κ B activation and subsequent lower induction of its target genes, such as manganese superoxide dismutase (MnSOD; Sullivan et al., 1999). Similar conclusions were reached with a model of traumatic spinal cord injury by Kim and colleagues (2001), who in addition reported increased cell death and poorer neurological outcome for up to 4 weeks after injury in mice deficient in either TNFR1 or TNFR2. In contrast, for TNF KO mice subjected to cortical impact TBI, it has been reported that there is a less impaired neurological motor function in the acute post-traumatic period (2 dpl) and the opposite at later times (up to 4 weeks), suggesting a deleterious role of TNF- α in the acute posttraumatic period and a beneficial one in the long term (Scherbel et al., 1999). Our study extended up to 7 days postinjury, and the results suggest a detrimental role of TNF- α by signaling through TNFR1 during this time period, judging by the apoptosis observed at the border of the lesion. The reasons

underlying this effect remain to be fully established, but a number of possibilities can be discussed.

First, the results clearly demonstrate that the inflammatory response was decreased in the TNFR1 KO mice. This was already obvious by the general reduction in the immunostaining for markers of astrocyte reactivity (GFAP) and microglia/macrophage recruitment and activation (F4/80, IL-1 β) as well as that for T-cell infiltration (CD3) at 3 and 7 dpl. More quantitative results at the gene expression level fully confirmed such a reduction, with significant decreases in the induction of GFAP; host response genes, including the acute-phase response gene EB22/5 (Campbell et al., 1994); and inflammatory cytokines. It is important to note that these results are consistent with and extend those obtained with the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model or kainic acid-induced seizures (Bruce et al., 1996), the axotomized facial motor nucleus (Raivich et al., 1999, 2003), and the EAE model (Probert et al., 2000; Probert and Akassoglou, 2001), regarding the importance of TNF- α in the control of T-cell recruitment and gliosis.

The reduction in the inflammatory cytokines is in addition consistent with the reported lower nuclear factor (NF)- κ B activation during TBI in the absence of TNF- α signaling (Sullivan et al., 1999), insofar as IL-1 α , β , TNF- α , and IL-6 are target genes of this transcription factor. Inflammation and cytokines have repeatedly been reported to be coupled to apoptotic pathways (Rothwell and Hopkins, 1995; Ghirnikar et al., 1998), so the reduction observed in the TNFR1 KO mice likely will be contributing to the reduction of cell death.

Second, a further possibility for the lower damage after injury observed in the TNFR1 KO mice could be a decreased oxidative stress. In TBI as well as in many other CNS injury models, oxidative stress is known to be increased (Braugher and Hall, 1989), and there are some studies that suggest a role of TNF- α , but again the results are contradictory. Thus, in transgenic mice deficient in both TNF- α receptors, a higher oxidative stress was observed in the hippocampus following KA-induced seizures, perhaps because MnSOD up-regulation was blunted (Bruce et al., 1996). Oxidative stress was not measured, but the loss of MnSOD up-regulation also was observed in the cortical impact model (Sullivan et al., 1999). Sullivan et al. suggested that the results were in accordance with the general view of TNF- α and NF- κ B as neuroprotective factors against oxidative insults and also would be consistent with the notion of NF- κ B activation as an antiapoptotic mechanism (Sullivan et al., 1999, and references therein).

Nevertheless, other studies demonstrate potent induction of reactive oxygen species (ROS) by TNF- α in other cells (note that both ROS and TNF- α may activate NF- κ B), which appears to be involved in both necrosis and apoptosis (Trembovler et al., 2003; Kamata et al., 2005, and references therein), so the role of this cytokine in the control of oxidative stress is not straightforward. In our study, oxidative stress was not affected by the absence of TNFR1 (nor TNFR2), so a role of

oxidative stress underlying the decreased cell death observed in the border of the lesion of the TNFR1 KO mice is unclear. A lower level of TNF- α and TNFR1 absence (Trembovler et al., 2003) or decreases of the JNK synthesis or activation by TNF- α (Kamata et al., 2005) are factors to consider.

Third, one very likely explanation for the decreased cell death detected in the TNFR1 KO mice could be that apoptosis-related genes were altered, and indeed this was the case. Thus, RIP, a factor known to be involved in the TNFR1 apoptotic pathway, was not up-regulated by the cryolesion in the TNFR1 KO mice. The Fas system has been extensively described as a prototypic inducer of the extrinsic cell death pathway (Lee et al., 2000), and accordingly Fas expression was induced by the cryolesion, but, again, this up-regulation was significantly decreased in the TNFR1 KO mice. Altogether, these findings strongly suggest that TNFR1 deficiency decreases cell death at the border of the cryolesion at least in part because of a lower up-regulation of apoptosis-related genes.

TNFR1 Deficiency Alters MMP/TIMP but Not Neurotrophin Gene Expression After Cryolesion

Both MMPs and TIMPs play a role in the postinjury environment following a mechanical injury (Muir et al., 2002; Wetzel et al., 2003). Their activity is regulated after cerebral ischemia (Romanic et al., 1998; Gasche et al., 1999; Rosenberg et al., 2001) and edema (Morita-Fujimura et al., 1999). The repertoire of MMPs and TIMPs expressed in neuropathological states is likely to be governed by the type and extent of tissue remodeling (Jaworski, 2000). With the cryolesion model, we found a prominent up-regulation of MMP3, MMP9, and MMP12, which is consistent with results obtained with the cortical impact model of TBI (Wang et al., 2000). MMPs form a protease cascade that bears some similarity to the caspase cascade in terms of amplifying cell death (Cuzner and Opdenakker, 1999). In the present study, significant differences in MMP3 and MMP12 were observed between WT and TNFR1 KO mice, the latter showing a decreased up-regulation of those genes. Interestingly, the same was observed for TIMP-1, which tightly regulates MMP activity, suggesting a coordinated regulation of TIMP-1, MMP3, and MMP12 (and MMP9 to some extent) by TNF- α signaling through TNFR1. With regard to tissue repair, no evident effects of the cryolesion and/or TNFR1 absence on the induction of neurotrophic factors were observed other than a small increase in BDNF mRNA levels. An integrated expression of TNF- α and BDNF in brain cortex has been described (Aloe et al., 1999), but we have been unable to show any role of the lack of TNFR1 in BDNF (or NGF and GDNF) response. However, in that study (Aloe et al., 1999), TNF- α overexpressing animals were used, so it is likely that chronic TNF- α expression may lead to effects different from those following acute TBI. Alternatively, we can-

not rule out the existence of compensatory mechanisms in the TNFR1 KO mice.

The present results show that, in assessing gene expression changes, astrogliosis, and apoptosis overall, TNFR1 but not TNFR2 may be considered an important factor during the early phases of an inflammatory process and in the control of apoptosis induced by a focal freeze injury of the brain cortex. They also suggest that a TNFR1 blockage after injury could prevent an exacerbation of response and thus may be a therapeutic target.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Javier Carrasco, Sergi Florit, Yasmina Manso, and Pilar Tudela for valuable help. These studies were supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología and Feder SAF 2002-01268 and SAF 2005-00671 and Direcció General de Recerca 2001SGR 00203 (J.H.); by NIH grants NS36979 and MH62231 (J.L.C.); and by The Lundbeck Foundation, Kathrine og Vigo Skovgaards Fond, Toyota Fonden, Dir. Ib Henriksens Fond, The Danish Medical Ass. Research Fund, Fru Lily Benthine Lunds Fond, Dagmar Marshalls Fond, Dir. Jacob Madsen's Fond, and Eva og Henry Fränkels Mindefond (M.P.).

REFERENCES

- Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassmann H, Kollias G, Probert L. 2003. Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:709-714.
- Aloe L, Properzi F, Probert L, Akassoglou K, Kassiotis G, Micera A, Fiore M. 1999. Learning abilities, NGF and BDNF brain levels in two lines of TNF-alpha transgenic mice, one characterized by neurological disorders, the other phenotypically normal. *Brain Res* 840:125-137.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. 2001. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4:1116-1122.
- Blüthmann H, Rothe J, Schulze N, Tkachuk M, Koebel P. 1994. Establishment of the role of IL-6 and TNF receptor 1 using gene knockout mice. *J Leukoc Biol* 56:565-570.
- Braughler JM, Hall ED. 1989. Central nervous system trauma and stroke. 1. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 6:289-301.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holsberg FW, Mattson MP. 1996. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2:788-794.
- Campbell IL. 1998. Transgenic mice and cytokine actions in the brain: bridging the gap between structural and functional neuropathology. *Brain Res Brain Res Rev* 26:327-336.
- Campbell IL, Samimi A, Chiang CS. 1994. Expression of the inducible nitric oxide synthase. Correlation with neuropathology and clinical features in mice with lymphocytic choriomeningitis. *J Immunol* 153:3622-3629.
- Carrasco J, Giralt M, Penkowa M, Stalder AK, Campbell IL, Hidalgo J. 2000. Metallothioneins are up-regulated in symptomatic mice with astrocyte-targeted expression of tumor necrosis factor-alpha. *Exp Neurol* 163:46-54.

- Carrasco J, Penkowa M, Giralt M, Camats J, Molinero A, Campbell IL, Palmiter RD, Hidalgo J. 2003. Role of metallothionein-III following central nervous system damage. *Neurobiol Dis* 13:22-36.
- Chan PH, Yang GY, Chen SF, Carlson E, Epstein CJ. 1991. Cold-induced brain edema and infarction are reduced in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Ann Neurol* 29:482-486.
- Chiang C-S, Stalder A, Samimi A, Campbell IL. 1994. Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain. Studies in transgenic mice. *Dev Neurosci* 16:212-221.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Cook JL, Marcheselli V, Alam J, Deininger PL, Bazan NG. 1998. Simultaneous analysis of multiple gene expression patterns as a function of development, injury or senescence. *Brain Res Brain Res Protoc* 3:1-6.
- Culpan D, MacGowan SH, Ford JM, Nicoll JA, Griffin WS, Dewar D, Cairns NJ, Hughes A, Kehoe PG, Wilcock GK. 2003. Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 350:61-65.
- Cuzner ML, Opdenakker G. 1999. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 94:1-14.
- Debatin KM. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53:153-159.
- Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, Merrill JE. 1997. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol* 75:104-112.
- Eissner G, Kolch W, Scheurich P. 2004. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:353-366.
- Ethell DW, Buhler LA. 2003. Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J Clin Immunol* 23:439-446.
- Eugster HP, Frei K, Bachmann R, Bluethmann H, Lassmann H, Fontana A. 1999. Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1. *Eur J Immunol* 29:626-632.
- Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP. 1998. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1283-1287.
- Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Madsen J, Chan PH. 1999. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1020-1028.
- Ghimikar RS, Lee YL, Eng LF. 1998. Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. *Neurochem Res* 23:329-340.
- Giralt M, Penkowa M, Lago N, Molinero A, Hidalgo J. 2002. Metallothionein-1 + 2 protect the CNS after a focal brain injury. *Exp Neurol* 173:114-128.
- Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B. 2000. Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:53-65.
- Hansson E, Ronnback L. 2003. Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J* 17:341-348.
- Hicks RR, Li C, Zhang L, Dhillon HS, Prasad MR, Serogy KB. 1999. Alterations in BDNF and trkB mRNA levels in the cerebral cortex following experimental brain trauma in rats. *J Neurotrauma* 16:501-510.
- Hobbs MV, Weigle WO, Noonan DJ, Torbett BE, McEvilly RJ, Koch RJ, Cardenas GJ, Ernst DN. 1993. Patterns of cytokine gene expression by CD4⁺ T cells from young and old mice. *J Immunol* 150:3602-3614.
- Jaworski DM. 2000. Differential regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA expression in response to intracranial injury. *Glia* 30:199-208.
- Kamata H, Honda S, Maeda S, Hirata H, Karin M. 2005. Reactive oxygen species promote TNF- α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP Kinase phosphatases. *Cell* 120:649-661.
- Kim GM, Xu J, Xu J, Song SK, Yan P, Ku G, Xu XM, Hsu CY. 2001. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor- κ B activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 21:6617-6625.
- Knerlich F, Schilling L, Gortlach C, Wahl M, Ehrenreich H, Siren AL. 1999. Temporal profile of expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 β and interleukin converting enzyme after cryogenic lesion of the rat parietal cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 68:73-87.
- Lambertsen KL, Meldgaard M, Ladeby R, Finsen B. 2005. A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:119-135.
- Lee SJ, Benveniste EN. 1999. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 98:77-88.
- Lee SJ, Zhou T, Choi C, Wang Z, Benveniste EN. 2000. Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. *J Immunol* 164:1277-1285.
- Lee TS, Chau LY. 2002. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8:240-246.
- Little AR, Benkovic SA, Miller DB, O'Callaghan JP. 2002. Chemically induced neuronal damage and gliosis: enhanced expression of the proinflammatory chemokine, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, without a corresponding increase in proinflammatory cytokines (1). *Neuroscience* 115:307-320.
- Lucas R, Juillard P, Decoster E, Redard M, Burger D, Donati Y, Giroud C, Monso-Hinard C, De Kesel T, Beurman WA, Moore MW, Dayer JM, Fiers W, Bluethmann H, Grau GE. 1997. Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. *Eur J Immunol* 27:1719-1725.
- MacEwan DJ. 2002a. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 135:855-875.
- MacEwan DJ. 2002b. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14:477-492.
- McGeer EG, McGeer PL. 2003. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:741-749.
- Molinero A, Penkowa M, Hernandez J, Camats J, Giralt M, Lago N, Carrasco J, Campbell IL, Hidalgo J. 2003. Metallothionein-1 overexpression decreases brain pathology in transgenic mice with astrocyte-targeted expression of interleukin-6. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:315-328.
- Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Kawase M, Murakami K, Kim GW, Chan PH. 1999. Inhibition of interleukin-1 β converting enzyme family proteases (caspases) reduces cold injury-induced brain trauma and DNA fragmentation in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:634-642.
- Muir EM, Adcock KH, Morgenstem DA, Clayton R, von Stillfried N, Rhodes K, Ellis C, Fawcett JW, Rogers JH. 2002. Matrix metalloproteinases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 100:103-117.
- Muñoz-Fernandez MA, Fresno M. 1998. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 56:307-340.
- Murakami K, Kondo T, Yang G, Chen SF, Morita-Fujimura Y, Chan PH. 1999. Cold injury in mice: a model to study mechanisms of brain edema and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 57:289-299.

- Olanow CW. 1993. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci* 16:439-444.
- Pagenstecher A, Stalder AK, Campbell IL. 1997. RNase protection assays for the simultaneous and semiquantitative analysis of multiple murine matrix metalloproteinase (MMP) and MMP inhibitor mRNAs. *J Immunol Methods* 206:1-9.
- Penkowa M, Moos T. 1995. Disruption of the blood-brain interface in neonatal rat neocortex induces a transient expression of metallothionein in reactive astrocytes. *Glia* 13:217-227.
- Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Blüthmann H, Hidalgo J. 1999. Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 25:343-357.
- Penkowa M, Carrasco J, Giral M, Molinero A, Hernandez J, Campbell IL, Hidalgo J. 2000a. Altered central nervous system cytokine-growth factor expression profiles and angiogenesis in metallothionein-I + II deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1174-1189.
- Penkowa M, Giral M, Carrasco J, Hadberg H, Hidalgo J. 2000b. Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 32:271-285.
- Penkowa M, Camats J, Giral M, Molinero A, Hernandez J, Carrasco J, Campbell IL, Hidalgo J. 2003. Metallothionein-I overexpression alters brain inflammation and stimulates brain repair in transgenic mice with astrocyte-targeted interleukin-6 expression. *Glia* 42:287-306.
- Poulsen C, Penkowa M, Borup R, Nielsen FC, Cáceres M, Quintana A, Molinero A, Carrasco J, Giral M, Hidalgo J. 2005. Brain response to traumatic brain injury in wild type and interleukin-6 knockout mice: a microarray analysis. *J Neurochem* 92:417-432.
- Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR. 1998. Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science* 282:1079-1083.
- Probert L, Akassoglou K. 2001. Glial expression of tumor necrosis factor in transgenic animals: how do these models reflect the "normal situation"? *Glia* 36:212-219.
- Probert L, Engster HP, Akassoglou K, Bauer J, Frei K, Lassmann H, Fontana A. 2000. TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease. *Brain* 123:2005-2019.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105.
- Raivich G, Liu ZQ, Kloss CU, Labow M, Blüthmann H, Bohatschek M. 2002. Cytotoxic potential of proinflammatory cytokines: combined deletion of TNF receptors TNFR1 and TNFR2 prevents motoneuron cell death after facial axotomy in adult mouse. *Exp Neurol* 178:186-193.
- Raivich G, Bohatschek M, Werner A, Jones LL, Galiano M, Kloss CU, Zhu XZ, Pfeffer K, Liu ZQ. 2003. Lymphocyte infiltration in the injured brain: role of proinflammatory cytokines. *J Neurosci Res* 72:726-733.
- Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. 1998. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29:1020-1030.
- Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Geating A. 2001. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res* 893:104-112.
- Rothwell N. 2003. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain Behav Immun* 17:152-157.
- Rothwell NJ, Hopkins SJ. 1995. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18:130-136.
- Sayer FT, Oudega M, Hagg T. 2002. Neurotrophins reduce degeneration of injured ascending sensory and corticospinal motor axons in adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 175:282-296.
- Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M, Saatman KE, Trojanowski JQ, Nungebauer E, Marino MW, McIntosh TK. 1999. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8721-8726.
- Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. 1999. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:119-130.
- Stalder A, Pagenstecher A, Kincaid C, Campbell IL. 1999. Analysis of gene expression by multiprobe RNase protection assay. In: Tihon HA, editor. *Neurodegeneration methods and protocols*. Totowa, NJ: Human Press. p 53-66.
- Sullivan PG, Bruce-Keller AJ, Rabechevsky AG, Christakos S, Clair DK, Mattson MP, Scheff SW. 1999. Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury. *J Neurosci* 19:6248-6256.
- Suvannavejh GC, Lee HO, Padilla J, Dal Canto MC, Barrett TA, Miller SD. 2000. Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 205:24-33.
- Trembovler V, Abu-Raya S, Shohami E. 2003. Synergism between tumor necrosis factor- α and H₂O₂ enhances damage in rat PC12 cells. *Neurosci Lett* 353:115-118.
- Wang Q, Cao X, Wang J, Zhang W, Tao Q, Ye T. 2000. Macrophage activation of lymphoma-bearing mice by liposome-mediated intraperitoneal IL-2 and IL-6 gene therapy. *Chin Med J* 113:281-285.
- Wetzel M, Rosenberg GA, Cunningham LA. 2003. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and matrix metalloproteinase-3 regulate neuronal sensitivity to doxorubicin-induced apoptosis. *Eur J Neurosci* 18:1050-1060.
- Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Li R, Shen Y. 2002. Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *J Neurosci* 22:3025-3032.
- Yankner BA. 1996. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16:921-932.

Trabajo 2

Los mecanismos de actuación de los receptores del TNF- α tras lesión son diferentes: TNFR1 sería pro-inflamatorio mientras que TNFR2 está implicado en la activación de múltiples mecanismos implicados en plasticidad sináptica.

Diverging mechanisms for TNF- α receptors in normal mouse brains and in functional recovery after injury: From gene to behavior

Journal of Neuroscience Research 85:2668-85. (2007)

Diverging Mechanisms for TNF- α Receptors in Normal Mouse Brains and in Functional Recovery After Injury: From Gene to Behavior

Albert Quintana,¹ Amalia Molinero,¹ Sergi Florit,¹ Yasmina Manso,¹ Gemma Comes,¹ Javier Carrasco,¹ Mercedes Giralt,¹ Rehannah Borup,² Finn Cilius Nielsen,² Iain L. Campbell,³ Milena Penkowa,⁴ and Juan Hidalgo^{1*}

¹Institute of Neurosciences and Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Animal Physiology Unit, Faculty of Sciences, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain

²Department of Clinical Biochemistry, Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Denmark

³School of Molecular and Microbial Biosciences, University of Sydney, Australia

⁴Section of Neuroprotection, Centre of Inflammation and Metabolism, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Denmark

Cytokines, such as tumour necrosis factor (TNF)- α and lymphotoxin- α , have been described widely to play important roles in the brain in physiologic conditions and after traumatic injury. However, the exact mechanisms involved in their function have not been fully elucidated. We give some insight on their role by using animals lacking either Type 1 receptor (TNFR1KO) or Type 2 (TNFR2KO) and their controls (C57Bl/6). Both TNFR1KO and to a greater extent TNFR2KO mice showed increased exploration/activity neurobehavioral traits in the hole board test, such as rearings, head dippings, and ambulations, compared with wild-type mice, suggesting an inhibitory role of TNFR1/TNFR2 signaling. In contrast, no significant differences were observed in the elevated plus maze test, ruling out a major role of these receptors in the control of anxiety. We next evaluated the response to a freeze injury to the somatosensory cortex. The effect of the cryolesion on motor function was evaluated with the horizontal ladder beam test, and the results showed that both TNFR1KO and TNFR2KO mice made fewer errors, suggesting a detrimental role for TNFR1/TNFR2 signaling for coping with brain damage. Expression of ~22600 genes was analyzed using an Affymetrix chip (MOE430A) at 0 (unlesioned), 1, or 4 days post-lesion in the three strains. The results show a unique and major role of both TNF receptors on the pattern of gene expression elicited by the injury but also in normal conditions, and suggest that blocking of TNFR1/TNFR2 receptors may be beneficial after a traumatic brain injury. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Cytokines are low molecular weight proteins that are involved in many cell communication processes both in physiologic and pathophysiologic situations. Among them, interleukin (IL)-1, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α have classically been considered as key players in

diverse biologic processes. These factors were first suggested as main participants in response to injury (Rothwell and Hopkins, 1995) because they are involved in the establishment and maintenance of the inflammatory response occurring after injury, being produced by or act on various cell types such as lymphocytes, endothelial cells, and macrophage/microglia, producing secondary damaging

Supplementary Material for this article is available online at [http://www.interscience.wiley.com/suppmat/0360-4012/suppmat/\(www.interscience.wiley.com\)](http://www.interscience.wiley.com/suppmat/0360-4012/suppmat/(www.interscience.wiley.com)).

Contract grant sponsor: These studies were supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología; Contract grant number: SAF2005-00671; Contract grant sponsor: European Commission FP6 Integrated Project Exgenesis; Contract grant number: LSHM-CT-2004-005272; Contract grant sponsor: NIH; Contract grant number: NS36979, MH62231; Contract grant sponsors: Lundbeck Foundation, Hørslev-fonden, Novo Nordisk, Danish Medical Research Council, Direktor Ib Henriksens Fond, Danish Medical Association Research Fund-The Wachterhausens Legat, Grosrerer Johan Quentin og Hustrus Legat, Marshalls Fond, Kathrine og Vigo Skovgaard's Fond, Dir. Jacob Madsen Fond, Gerda og Aage Haensch Fond, Eva og Henry Frønkels Mindefond, Scleroseforeningen, Dir. Ejnar Jonasson Fond, Warwara Larsens Fond, Karen A. Tolstrup's Fond, Dansk Parkinsonforening, Fru Lily Benthine Lunds Fond, Hans og Nora Buchards Fond, Holger Rabitz Mindelegat, Ragnhild Ibsens Legat for Medicinsk Forskning, Grosrerer Vald. Foersom og Hustrus Fond, Hestehandler Ole Jacobsens Mindelegat Asa Florida Boldings Mindelegat Fond.

*Correspondence to: Dr. Juan Hidalgo, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain 08193. E-mail: Juan.Hidalgo@uab.es

Received 27 July 2006; Revised 18 September 2006; Accepted 26 September 2006

Published online 27 November 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21126

effects that in turn lead to lymphocyte recruitment and activation and may cause neuronal cell death (Bluethmann et al., 1994; Lee and Benveniste, 1999; Lee and Chau, 2002; Hansson and Ronnback, 2003; Raivich et al., 2003). Their role at a physiologic level is also emerging as an important one, however, with effects being described in the periphery but also in the central nervous system (CNS) (Muñoz-Fernández and Fresno, 1998; Gregersen et al., 2000).

Although being considered as "classic" cytokines and being studied for many years, the exact actions of TNF- α , IL-1, and IL-6 within the brain are far from being elucidated completely. In this regard, TNF- α might be the most elusive cytokine. TNF α is a pleiotropic cytokine that affects synaptic signaling (Stellwagen and Malenka, 2006) and has been suggested to play a role on mouse exploratory activity (Fiore et al., 1998), suggesting physiologic actions of this cytokine from development to learning processes. After CNS injury TNF- α is dramatically upregulated, being involved in the activation, proliferation, and hypertrophy of mononuclear, phagocytic cells, and gliosis, and eventually in the initiation of apoptosis. TNF α exerts its biological functions via interaction with two receptors, 55 kDa Type 1 receptor (TNFR1) and 75 kDa Type 2 receptor (TNFR2) that seems to mediate significantly different functions in several diseases (MacEwan, 2002a,b) as well as in animal models (Rothwell and Hopkins, 1995; Fiore et al., 1998). TNFR1 presents a homologous cytoplasmic domain known as the death domain (DD), shared with other receptors from the same superfamily of death receptors, which includes Fas/APO-1/CD95 (Debatin, 2004). TNFR2, although not possessing a DD sequence, can also lead to apoptosis via adaptor proteins, and has been involved in the control of cell proliferation and the elimination of auto reactive effector cells in a EAE paradigm (Suvannavejth et al., 2000). The related cytokine, lymphotoxin- α (known formerly as TNF- β), also signals through TNFR1 (Bossen et al., 2006).

Depending on the model used and on the timing studied, the effect of TNF α varies, showing beneficial and detrimental effects. This has given rise to the concept of a dual role, suggesting TNF α might be detrimental during the first stages after an injury but beneficial for the recovery (Shohami et al., 1999). It is interesting to note that this concept of a dual role is also being applied to the inflammation. It remains unclear what role that inflammation may have. Inflammation may be considered as a protective mechanism that isolates the injured area, destroys affected cells, and repairs the extra-cellular matrix; however, chronic presence of inflammatory mediators may be followed by increased oxidative stress and cell death (Shohami et al., 1997; Muñoz-Fernández and Fresno, 1998; Hicks et al., 1999; Sayer et al., 2002; Allan and Rothwell, 2003). It is important to elucidate this concept as inflammation is common to many CNS pathologies, including stroke, seizures, trauma, ischemia (Olanow, 1993; Gilks et al., 1998; Penkowa et al., 1999a; Carrasco et al., 2000), and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases (Yankner, 1996; Campbell, 1998).

Among all these CNS insults, traumatic brain injury (TBI) is one of the leading causes of disability and death in the world, especially among young people (Prins and Hovda 2003), thus making it vital to understand the mechanisms involved. The study of the sequence of inflammatory cascade activation and the role of each mediator in the regulation of this process may provide some insight into when and why the damaging role of inflammation overrides the protective role. Cryolesion of the parietal cortex is an established experimental model (Cook et al., 1998) that features a standardized focal BBB disruption, massive brain edema, gliosis, recruitment of inflammatory cells, necrotic and apoptotic death, and upregulation of a number of genes attempting to increase neuronal survival and promoting the regeneration of brain parenchyma. We described recently that TNFR1 but not TNFR2 was involved in the induction of inflammation-related genes up to 24 hr post-lesion after cryolesion, showing a detrimental effect at 3 or 7 days post-lesion (dpl) (Quintana et al., 2005). We confirm and extend those results by taking advantage of the Affymetrix microarray technology analyzing the expression of ~22,600 genes to clarify the downstream signaling pathways of TNFR1 and TNFR2 receptors.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Breeding pairs of homozygous TNFR1 and TNFR2 null mice (TNFR1 and TNFR2KO, respectively) were provided by Horst Bluethmann (Hoffmann-la Roche, Basel, Switzerland), and maintained on the inbred C57BL/6 genetic background. Control wild-type (WT) mice (C57BL/6) were used in all experiments. All mice were kept under constant temperature and with free access to food and water. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of Comissió d'Experimentació animal del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

Elevated Plus-Maze test

The elevated plus-maze test (Pellow and File, 1986) was adapted to fit mice size and consisted of four white wooden arms (20 cm) at right angles to each other, connected to a central square. The apparatus is elevated 50 cm above the floor. Two of the opposite arms present high walls (enclosed arms, 15 cm high) and the other two are the open arms that have a 0.5-cm ridge to provide an additional grip. Each arm is divided into three equal sections. Mice were placed facing a closed arm and the subject was considered to be in a given arm when all four paws were inside. A black curtain surrounded the plus-maze to minimize external influences and a 40 W white bulb was placed 1.20 m above the center of the apparatus. The procedure lasted 5 min. The time spent in open and closed arms, latency to the first open arm entry, number of entries (with all four paws), ambulations in each type of arm (number of sections entered within a given arm), rearings, defecations, and time spent in open/enclosed arms were measured.

2670 Quintana et al.

Hole Board Test

The hole-board (File and Wardill, 1975), adapted to mice size, consisted of a white rectangular box (40 cm × 40 cm × 20 cm) with a floor divided into 16 equal squares, containing four empty holes (diameter = 3 cm). Each animal was placed initially in the periphery of the apparatus facing the wall. A black curtain surrounded the plus-maze to minimize external influences and a 40 W white bulb was placed 1.20 m above the centre of the apparatus. The procedure lasted for 5 min. The number of central and peripheral ambulations (with all four paws into the above mentioned squares), defecations, rearings, latency, and number of holes explored were measured.

Horizontal Ladder Beam Test

The horizontal ladder beam (Columbus Instruments, Columbus, OH) is designed for a specific test of gait errors in small subjects (rats or mice). It consists of an elevated (50 cm), narrow ladder (length = 125.5 cm), mounted in a horizontal position. At one end there is a dark hide box of 30.5 cm length. Subjects are placed on the far end of the ladder and normally make their way directly across the ladder to the security of the opaque hide. During the experiment, room lights are switched off and a 40 W light is placed in the far end of the ladder.

Subjects are preconditioned by using a shocker set at 3 mA. With the shock on continuously, any slip between the ladder rungs to touch the lower plate results in an aversive shock. There is a 2.5-cm separation between rungs. Preconditioning takes place during four consecutive days, with three trials of 2 min each. After preconditioning, the subjects are then tested by a sensor. In sensor mode, each slip or gait error that causes a touch on the lower plate is registered as a count on the front panel counter and rear panel output. Animals only carry out one trial during this period. The test was carried out before the lesion (Day 5) and at 4 days post-lesion (dpl).

Cryolesion Procedure

Adult mice (3–4 months age) were lesioned under 1.5% isoflurane anesthesia (1 L/m oxygen flow). The skull over the right frontoparietal cortex was exposed and a focal cryo injury was carried out as described previously (Penkowa et al., 1999a) using a 0.4-cm diameter dry ice pellet. Animals were allowed to recover and returned to the animal room, and were subsequently sacrificed at different time points after cryolesion: 1 dpl or 4 dpl for microarray studies, and 2 days post-lesion (dpl), 3 dpl, or 6 dpl for RNase protection assay studies (RPA). An independent experiment was carried out to check whether the operation itself (SHAM animals) had any consequence in brain gene expression. Animals were sacrificed at different time points after surgery (1, 2, or 3 days after surgery) and compared with naive animals. Another set of animals were sacrificed at 8 hr post-lesion (hpl) or 24 hpl for *in situ* hybridization (ISH) studies.

In all cases, the ipsilateral cortex were dissected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for microarray and RPA analyses. We used the whole ipsilateral cortex rather than attempting to use the damaged area only. This was done because cryolesion produces a large lesion but to determine

the limits of the lesion by eye when carrying out the dissection is not straight forward. To eliminate the risk of incurring significant errors from animal to animal the entire cortex was removed. We acknowledge, nevertheless, that this causes a diluting effect that decreases sensitivity in the assay and may cause the loss of significant changes in low-expression genes. For ISH, the whole brain was submerged in chilled isopentane before freezing in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Gene Expression and DNA Microarray Analysis

Total RNA was isolated from each hemisphere cortex sample using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and further purified with RNeasy1 kit (Qiagen, Albertslund, Denmark). Purified RNA (5 μg) was used to synthesize double-stranded cDNA using Superscript Choice System (Invitrogen) with an oligo-dT primer containing a T7 RNA polymerase promoter (GenSet, Evry, France). The cDNA was used as a template for an *in vitro* transcription reaction to synthesize biotin-labeled antisense cRNA (BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit; Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY). After fragmentation at 94°C for 35 min in fragmentation buffer (40 mM Tris, 30 mM MgOAc, 10 mM KOAc), the labeled cRNA was hybridized for 16 hr to Affymetrix MOE430A arrays (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) that contains ~22,600 mouse probe sets. The arrays were washed and stained with phycoerythrin streptavidin using the Fluidics Station 400 (Affymetrix Inc.). The arrays were scanned in the Gene Array 2500 scanner (Affymetrix Inc.), as described in the GeneChip (Affymetrix Inc.) protocol, to generate fluorescent images.

The image files were imported into the software package DNA-Chip Analyzer (dChip) developed by Li and Wong (2001) (available at <http://www.dchip.org>). All the array files were normalized to the array with the median overall brightness using the multi array invariant-set normalization method, which is based on probe values belonging to non-differentially expressed genes between the array being normalized and the baseline array (the invariant set). Expression values for each probe set were calculated according to the perfect match/mismatch difference model.

Gene Filtering

A number of analysis methods for filtering the genes being up- or downregulated in the different conditions were examined. We used a conservative strategy for the initial filtering followed by a standard statistical assay, two-way ANOVA with strain, and cryolesion as main factors (see Results). Hierarchical clustering of the genes differentially expressed according to the ANOVA was carried out using the dChip software. Functional classification in gene-ontology categories of the genes belonging to each of the clusters identified was done with the DAVID program Version 2.1 (Dennis et al., 2003). All gene-ontology categories with three or more genes and a Fisher exact probability of <0.05 were selected.

RNase Protection Assay

Total RNA of injured ipsilateral cortex was isolated following standard methodology, using commercial TriPure

Isolation Reagent Kit (Roche). The construction and characterization of the multi-probe set for host-response (iNOS, Mac1, A20, ICAM 1, EB22/5, GFAP) was described elsewhere (Chiang et al., 1994).

For the synthesis of a radiolabeled antisense RNA probe set, the final reaction mixture contained 120 μ Ci, UTP (3,000 Ci/nmol, Amersham) UTP (73 pmol), GTP, ATP, CTP (2.5 mmol each), DTT (100 nmol), transcription buffer (1X), RNasin (20 U), T7 polymerase (10 U) (all from Promega, Madison, WI), and an equimolar pool of EcoRI-linearized templates (150 ng total). Dried probe was then dissolved (2.2×10^5 cpm/ μ l) in hybridization buffer and added to 10 μ g of total RNA from brain. Samples were overlaid with mineral oil, heated to 96°C, and then incubated at 56°C for 12–16 hr. Single-stranded RNA was digested with RNase A and T1. Hybridized RNA remained RNase-protected. RNA duplexes were purified, precipitated, and resolved on 5% acrylamide/7 M urea TBE sequencing gel. Dried gels were placed on Hyperfilm MP film (Amersham, UK) with Kodak MS intensifying screens (Kodak, Rochester, NY), and films were exposed at -70°C for 1–7 days depending on the probe set and the relative expression of the gene to quantify. The intensity of the bands was measured densitometrically (only for low-expression genes) or by phosphor imaging and normalized with L32 mRNA levels.

Metallothionein 1 mRNA In Situ Hybridization

Serial coronal cryostat sections (20- μ m thick) were cut from the frozen brains with a cryostat (Reichert-Jung 2800 Frigocut E, Germany) and mounted on slides coated with poly L-lysine, which were then maintained at -80°C until the day of the analysis. *Mt1* was measured using the cDNA provided generously by Dr. R.D. Palmiter (University of Washington, Seattle, WA). Preparation of sense and antisense probes and the in situ hybridization procedure were carried out as described previously (Carrasco et al., 1998). Autoradiography was carried out exposing the film (Hyperfilm-MP, Amersham, UK) to the slides for 3 days. All sections were prepared simultaneously and exposed to the same autoradiographic film. *Mt1* levels were semi-quantitatively determined in three sections of each brain area per animal by measuring the optical densities and the number of pixels in defined areas with a Leica Q 500MC system (Leica, Germany). The *Mt1* values shown are expressed in arbitrary units (number of pixels \times optical density).

Microautoradiographies were obtained by exposing the sections to an autoradiographic emulsion (Amersham, UK) and developed according to manufacturer's instruction. Cells were counterstained with thionine.

Statistical Analysis

Results were evaluated with one-way or two-way ANOVA depending on the experiment after checking the homogeneity of variances. When appropriated, post-hoc comparisons were carried out with SNK. All data in the text and figures are given as the arithmetic mean (\pm SEM) whenever possible.

RESULTS

Impairment of TNFR1 and TNFR2 Signaling Affects Exploratory/Activity Neurobiologic Traits But Not Anxiety in Mice

The hole board test mainly evaluates general locomotor activity and exploratory behavior of mice. The number of quadrants explored (ambulations) by mice is a mixed index of locomotor and exploratory activities, whereas the number of rearings and head dippings as well as the latency of each head dip serves as a more precise assessment for exploratory behavior. Although not being designed as an anxiety/fearfulness test, this can somewhat be assessed taking into account the number of inner quadrant ambulations (where the protection of walls is lost) and the number of defecations during the test.

Animals lacking either TNFR1 or TNFR2 (to a greater extent) presented an overall increase in the number of ambulations, suggesting an increase in locomotor/exploratory activity (Fig. 1, top). This increase was due exclusively to a higher activity in outer quadrants, whereas the number of inner ambulations was not significantly different, suggesting that anxiety may not be affected by signaling through these receptors. In agreement with this, the number of defecations did not differ between strains. A more significant role of TNFR2 in exploratory behavior was also shown by the increased number of head dippings (and the same tendency for their length) and rearings observed in the TNFR2KO mice compared with TNFR1KO or WT mice, indicating different roles for each receptor in these behavioral traits.

As stated previously, the hole board test was not designed to test anxiety, although it likely had an influence on the results. This trait was evaluated further by means of the elevated plus maze test (Fig. 1, middle). The time an animal spends in the open arms or the number of ambulations in the open arms is used as an inverse index of anxiety in mice. Although there was some tendency for decreased time spent in the open arms for both KO strains, this did not reach statistical significance. Further supporting the hypothesis that anxiety/fearfulness is not affected by TNFR deficiency, defecations did not differ from WT mice.

Locomotor Impairment Caused by a Focal Brain Injury Is Reduced in Animals Lacking TNF Receptors

Putative clinical symptoms elicited by the cryolesion of the cortex were evaluated with the horizontal ladder beam. Interestingly, a difference between WT and TNFR1 or TNFR2KO mice showed up during the training phase: WT mice scored worse than both KO strains from the very beginning (not shown), possibly, at least in part, because of the differences in locomotor activity described above. Therefore, before lesioning, emphasis was put into achieving a comparable baseline for all strains, which was obvious after 4 days of training (not shown) and on Day 5, when the mice were tested in the ladder beam before being cryolesioned (Fig. 1, bottom).

2672 Quintana et al.

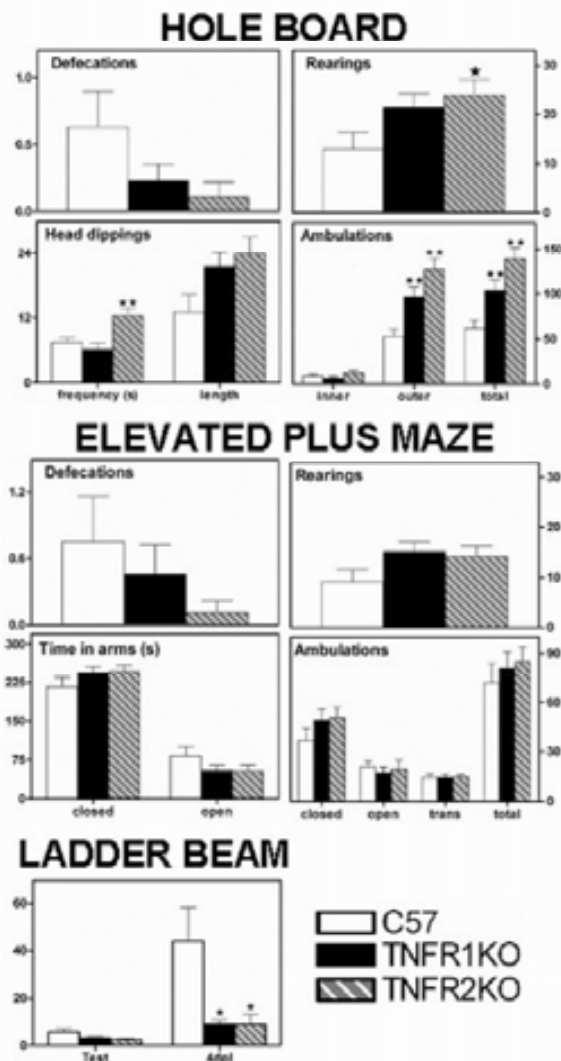


Fig. 1. Hole board (top), elevated plus maze (middle) and horizontal ladder beam (bottom) results obtained in wild-type (C57), TNFR1 knockout mice (TNFR1KO), and TNFR2 knock-out mice (TNFR2KO). For the two first tests, $n = 8$, $n = 13$, and $n = 9$ for WT, TNFR1KO, and TNFR2KO, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. respective WT group. For the horizontal ladder beam, $n = 5$, $n = 7$ and $n = 4$. * $P < 0.05$ vs. respective control group. In this test an effect of the lesion was observed in all strains ($P < 0.05$). Results are mean \pm SEM.

As expected, cryo injury of the cortex increased significantly the number of errors recorded in all strains at 4dpl, but this number was higher in the WT mice than in the two KO strains (Fig. 1, bottom). These results suggest strongly a detrimental role for TNFR1/TNFR2 in the recovery of the lesion.

Analysis of Global Gene Expression by Microarrays

Taking into consideration the results shown above, we decided to look for gene expression changes occurring in the brain due to the cryolesion that may be responsible for the beneficial effects observed in animals lacking TNF receptors. To this end, we took advantage of a valuable tool such as microarray chips to assess the expression of as many as $\sim 22,600$ genes at the same time. Unlesioned animals were also included.

As described in a previous study (Poulsen et al., 2005) using dChip software (<http://www.dchip.org> for more details) we generated a combined gene list by comparing the genes up- and downregulated at each time point for each strain with the unlesioned WT mice. The used criteria to identify the genes were: 1.5-fold change (50% increase or decrease) and an absolute change in expression values of 100 expression units. With this procedure a list of 555 IDs (corresponding to 477 genes) was produced. Because several animals per group were analyzed we identified which among these genes were statistically significantly affected. To this end, the expression values were exported to a standard statistical software, SPSSx (SPSS, Chicago, IL), where a conventional two-way ANOVA was carried out (timings of lesion and strain as main factors, $P < 0.05$). Although comparing to similar published array analysis the number of animals has been elevated ($n = 3$ for each time point, except for C57 4 dpl $n = 2$, a total of 26 mice), it is still not high enough to ensure that ANOVA is able to pick up all affected genes. In many occasions a given gene only changed its expression in a single timing, thus making it difficult to obtain statistical significance between strains when analyzing all groups together, as needed for this experimental design. On the other hand, ANOVA is able to identify genes changing only moderately but in different time points.

The use of ANOVA reduced the number of genes to 419. As we have described recently (Poulsen et al., 2005), cryolesion had a huge impact on gene expression, both at 1 and 4 dpl. Of 419 genes, 258 were affected by cryolesion only, 80 genes were found to be affected by strain only, and 81 were affected by both factors (Suppl. Table 1). The pattern of expression of these 419 genes was analyzed using the high-level analysis "Hierarchical clustering" utility of dChip, which clusters the genes according to their pattern of expression (not shown because of its large size that makes it impossible to read the gene names). For the sake of clarity this large hierarchical clustering has been split into six smaller ones: genes mainly upregulated by the cryolesion at 1 dpl (Fig. 2), at 1–4 dpl (Fig. 3), or at 4 dpl (Fig. 4); genes that in contrast were downregulated either at 1 dpl (Fig. 5) or at 4 dpl (Fig. 6); and those only affected by either TNFR1 or TNFR2 deficiency (Fig. 7). In all cases, each row represents a gene and each column represents the mean value for each strain and timing. The relative gene expression is color-coded, being red, white and blue colors expression levels above mean, mean or lower than mean expression of a gene across all samples, respectively. Color intensity correlates with the difference in relative expression.

Taking advantage of the NIH-based DAVID software (DAVID v2.1, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Dennis et al.,

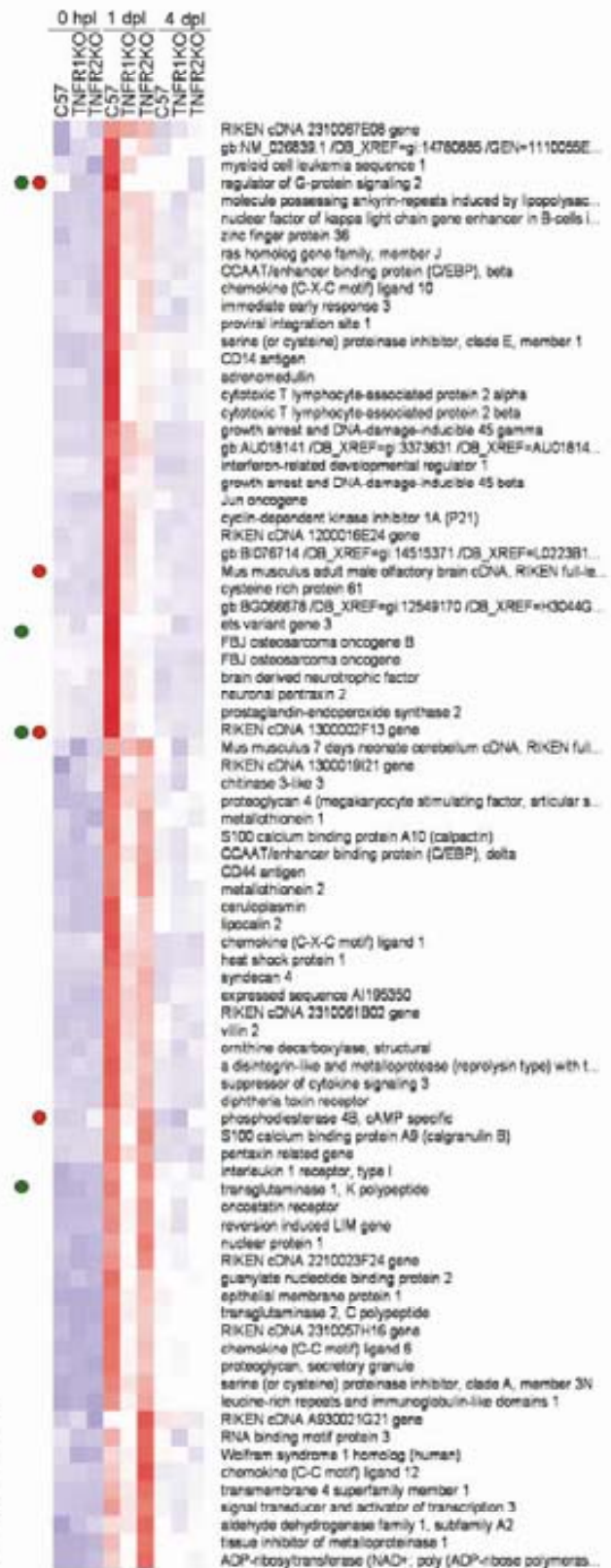


Fig. 2. Hierarchical clustering of the subset of genes (including genes of unknown function) identified to be significantly ($P < 0.05$) affected by cryolesion and mainly upregulated at 1 dpl (names can also be found in Suppl. Table I). Green dots: Significant ($P < 0.05$) effect of TNFR1 deficiency vs. WT. Red dots: Significant ($P < 0.05$) effect of TNFR2 deficiency vs. WT. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

2003) a functional classification for all the genes selected in our array was carried out (Suppl. Table II). This approach confirmed that many of the genes upregulated by cryolesion can be classified as genes involved in responses to stimulus, to wounding, or to inflammation, whereas many of the genes downregulated at 1 dpl can be classified as genes involved in neuronal differentiation and those downregulated at 4 dpl are involved mainly in microtubule stability. This classification enables a better understanding of the different responses elicited by cryolesion, showing that in agreement with previous results, this model is able to elicit an inflammatory response at the gene level (Poulsen et al., 2005; Quintana et al., 2005; Penkowa et al., 2006).

It is obvious that it is not possible to undertake a thorough discussion for all these genes, and only some of them will be discussed as representative of the overall response. Instead of discussing the response to the lesion itself, we have focused on analyzing the specific changes derived of either TNFR1 or TNFR2 deficiency. Full information is provided in Figures 2–7 and Supplementary Tables 1 and 2.

Impairment of TNF Signaling Affects Early Transcription Factor Activation

The first stages of the response to cryolesion involve the activation of many cell signaling and transcription factors. This activation depends on the diverse stimuli that the cell is receiving and will dictate the fate of the cells surrounding the affected area. *NFκB*, *C/EBP*, *c-jun*, and *c-fos* were found among the genes promptly upregulated by cryolesion (Fig. 2). Although not reaching statistical significance, all these factors tended to be downregulated in animals lacking any of TNF receptors. *C-fos* and *c-jun* can dimerize to constitute AP-1, which is also induced by *NFκB*. *Gadd45β* and *Gadd45γ*, which are genes downstream *NFκB* pathway presented a lower expression both in TNFR1KO and TNFR2KO mice compared with wild-type mice (Fig. 2). These results would suggest a reduced *NFκB* activation, which can be considered a consequence of TNF impairment. TNF has been described extensively to be a major activator of *NFκB* pathway. This is in agreement with our previous work (Quintana et al., 2005) where we described many *NFκB* activated genes to present a lower induction in TNFR1KO mice after cryolesion. Although many animals were used (for microarray standards), the number may still not be high enough for statistical purposes alone, therefore further effort has been placed to confirm array results by other means.

TNFR1, But Not TNFR2, Is Involved in Early Inflammatory Response

In our previous work (Quintana et al., 2005) we described from a histopathological view that only animals

lacking TNFR1 presented fewer inflammatory related markers both at 3 and 7 dpl, and a simplified gene expression analysis allowed us to observe that this was visible up to 24 hpl, leading us to propose the TNFR1 pathway as the one involved in early inflammatory response. Nevertheless, TNFR2KO mice were not evaluated in that regard. We extend the gene expression analysis up to 4 dpl in both TNFR1 and TNFR2KO mice, and by using global gene expression analyses by Affymetrix microarrays. In agreement with our previous study, TNFR1KO mice showed a reduced inflammatory response at 1 dpl, as many inflammation-related genes downstream proinflammatory cytokines signalling pathways, such as *interleukin-1 receptor*, *interleukin-6 driven transcription factor signal transducer and activator of transcription-3 (stat-3)*, or the silencer of cytokine signaling 3 (*socs3*) were downregulated in TNFR1KO compared with TNFR2KO or WT mice (Fig. 2). Expression of chemokines such as *α3*, *α6*, *α10*, and *α12* followed the same pattern (Figs. 2–4), and so did genes involved in the inflammatory response such as *metallothionein 1 and 2* (Fig. 2), which are anti-inflammatory factors induced as a result of tissue injury, glial fibrillary acidic protein (*gfap*) (Fig. 3), or tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (*timp1*) expression at 1 dpl (Fig. 2). However, no apparent changes were found in expression of these genes at 4 dpl between strains (Fig. 4), suggesting that the role of TNFR1 in inflammatory response is limited to the first phases whereas other factors may compensate its action at latter stages.

Gene Expression Is Widely Affected by TNFR2 Deficiency

A great number of genes were found to be affected by TNFR2 deficiency in unlesioned mice, and remained basically unchanged after the lesion. Most of them are found in Figures 6 and 7. Diverse physiologically important genes were strikingly downregulated in TNFR2KO mice, such as the beta subunit of cAMP protein kinase (*pkacb*), phospholipase c (*plc*), and calcineurin B, Type I (*Cnbl1*), which may play a role in learning and memory processes. Another important group of genes are involved in microtubule formation and stabilization, contributing to neuronal development, maintenance and even cell survival: these include microtubule-associated protein 1B (*map1B*), microtubule-associated protein 2 (*map2*), and kinesin family member 5C (*Kif5c*).

TNFR2 deficiency also downregulated the expression of genes involved in synaptic formation and stabilization and the control of membrane excitability, such as synaptotagmin (*sytl*), dynamin-1 like (*dpl1*), SH3-domain GRB2-like 2 (*Sh3gl2*), and potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1 (*kcna1f*) (Leicher et al., 1996). Other interesting genes downregulated in TNFR2KO mice are related to the thyroid-hormone pathway, including thyrotroph embryonic factor (*tef*), the thyroid-hormone receptor alpha gene (*thra*), and the PFTAIRE protein kinase 1 (*pfik1*). This family of

Fig. 3. Hierarchical clustering of the subset of genes (including genes of unknown function) identified to be significantly ($P < 0.05$) affected by cryolesion and mainly upregulated at 1–4 dpl. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

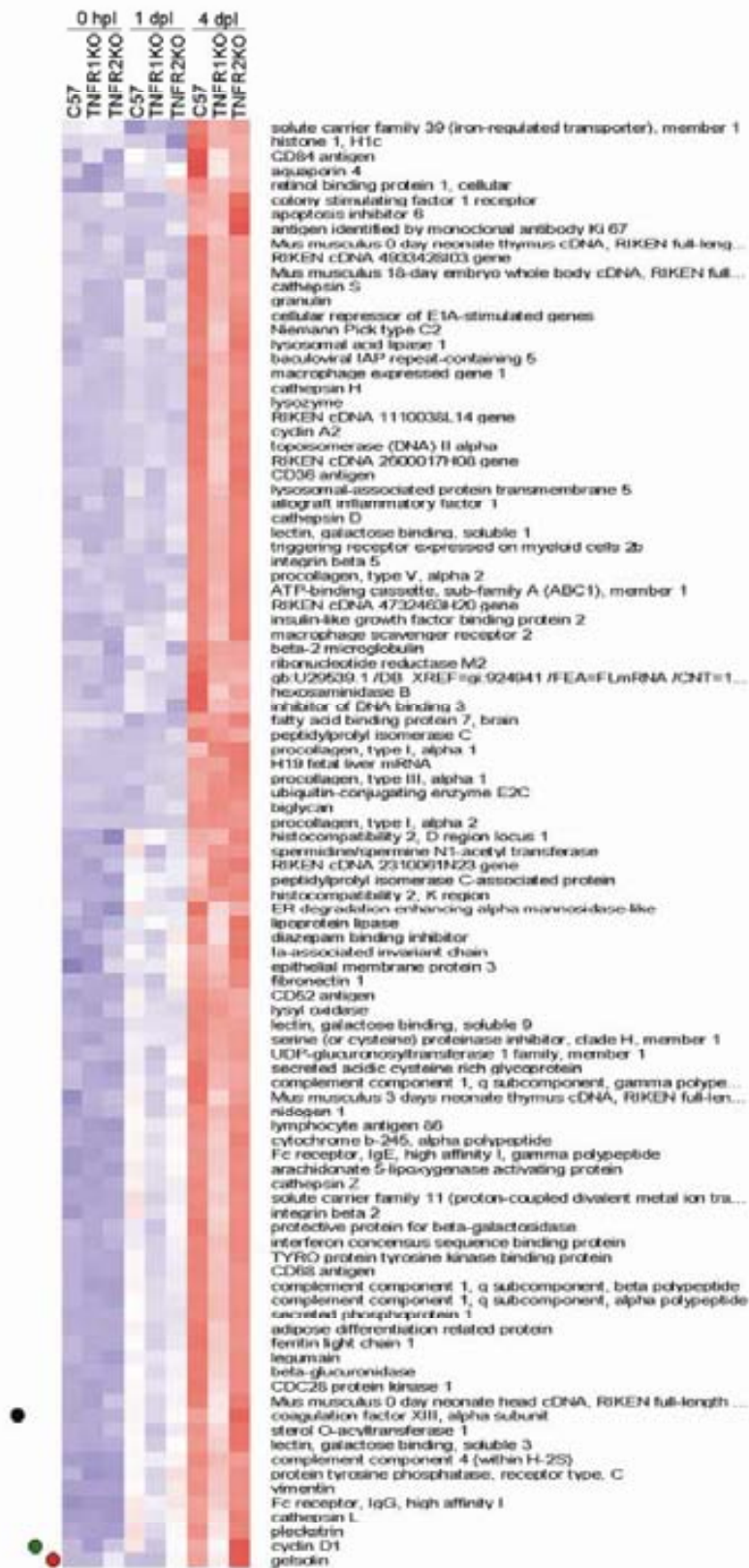


Fig. 4. Hierarchical clustering of the subset of genes (including genes of unknown function) identified to be significantly ($P < 0.05$) affected by cryolesion and mainly upregulated at 4 dpl. Green dots: Significant ($P < 0.05$) effect of TNFR1 deficiency vs. WT. Red dots: Significant ($P < 0.05$) effect of TNFR2 deficiency vs. WT. Black dots: Significantly ($P < 0.05$) different TNFR1KO vs. TNFR2KO. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

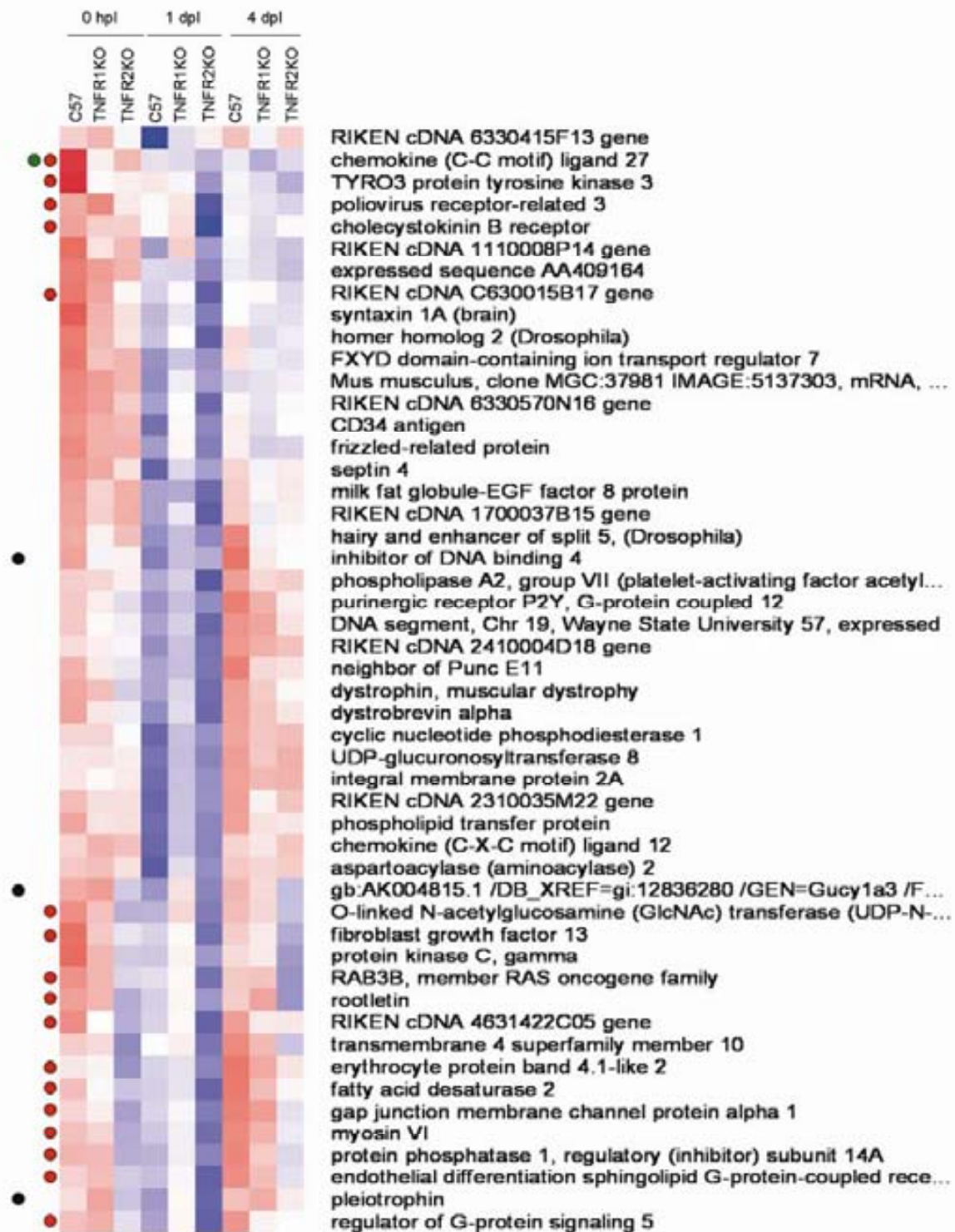


Fig. 5. Hierarchical clustering of the subset of genes (including genes of unknown function) identified to be significantly ($P < 0.05$) affected by cryolesion and mainly downregulated at 1 dpl. Green dots: Significant ($P < 0.05$) effect of TNFR1 deficiency vs. WT. Red dots: Significant ($P < 0.05$) effect of TNFR2 deficiency vs. WT. Black dots: Significantly ($P < 0.05$) different TNFR1KO vs. TNFR2KO. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

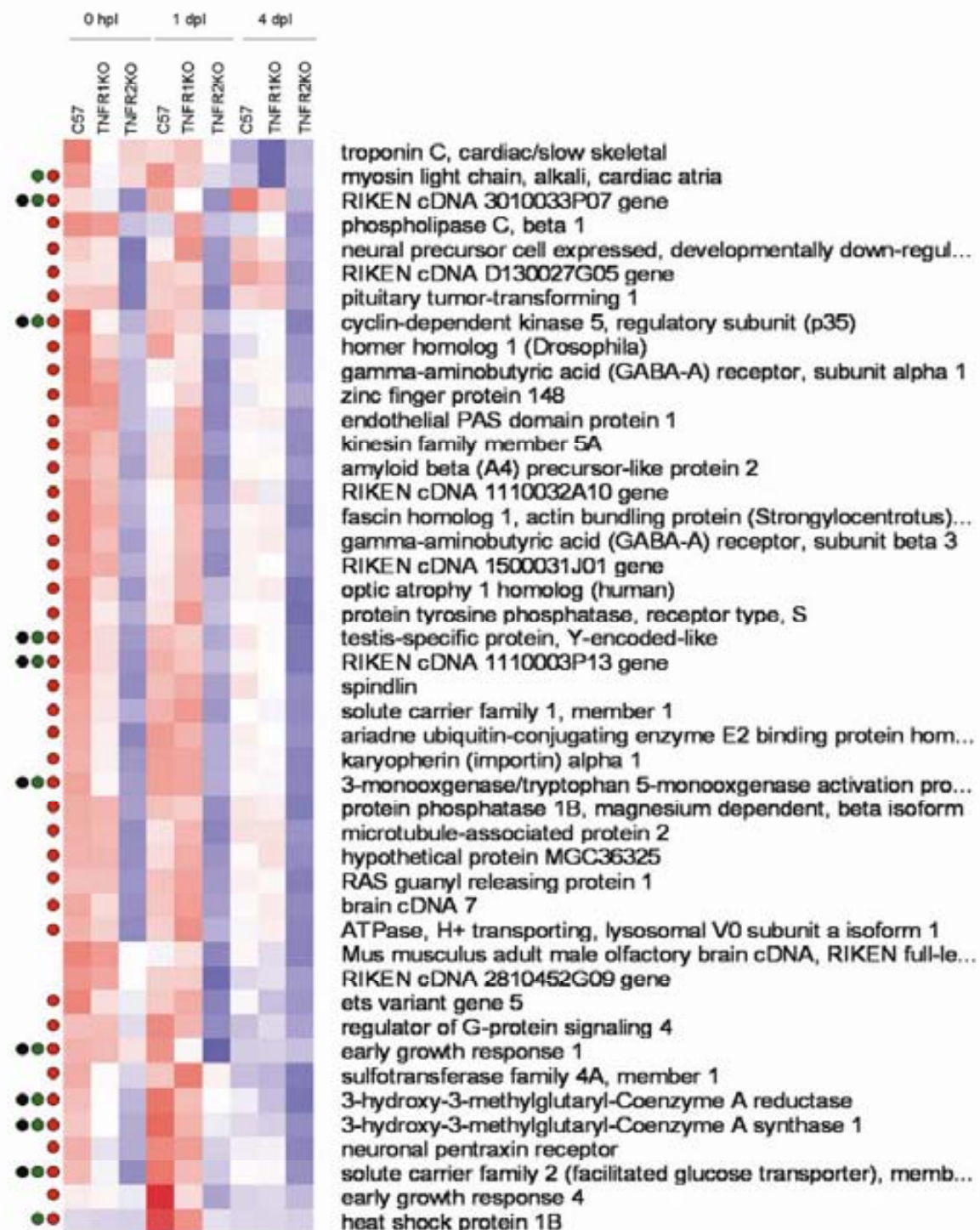


Fig. 6. Hierarchical clustering of the subset of genes (including genes of unknown function) identified to be significantly ($P < 0.05$) affected by cryolesion and mainly downregulated at 4 dpi. Green dots: Significant ($P < 0.05$) effect of TNFR1 deficiency vs. WT. Red dots: Significant ($P < 0.05$) effect of TNFR2 deficiency vs. WT. Black dots: Significantly ($P < 0.05$) different TNFR1KO vs. TNFR2KO. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

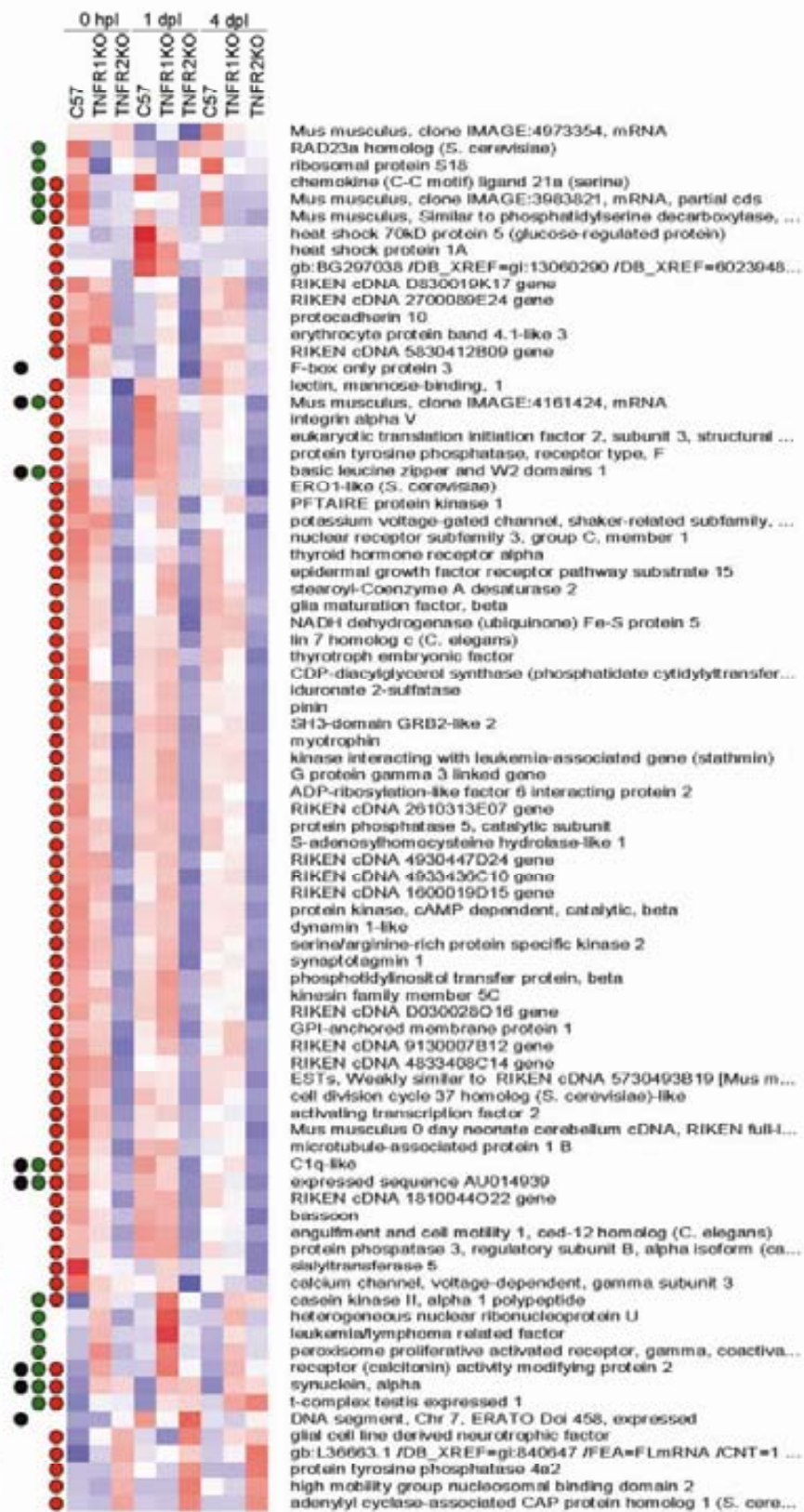


Fig. 7. Hierarchical clustering of the subset of genes (including genes of unknown function) identified to be significantly ($P < 0.05$) affected by TNFR deficiencies. Green dots: Significant ($P < 0.05$) effect of TNFR1 deficiency vs. WT. Red dots: Significant ($P < 0.05$) effect of TNFR2 deficiency vs. WT. Black dots: Significantly ($P < 0.05$) different TNFR1KO vs. TNFR2KO. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

2680 Quintana et al.

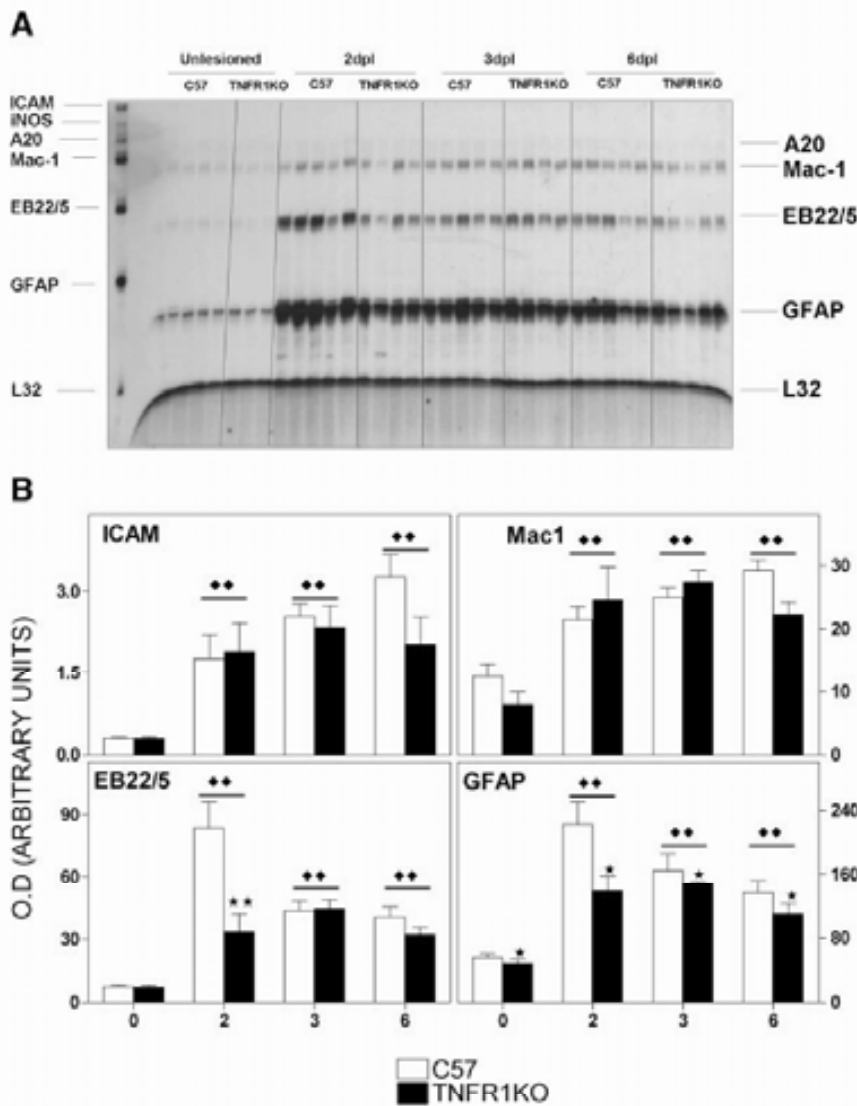


Fig. 8. Analysis of host response gene expression. Wild-type (C57Bl/6) and TNFR1knockout (TNFR1 KO) mice were subjected to a cryolesion of the left cortex and sacrificed after 2, 3, or 6 days after the lesion (2 dpi, 3 dpi, and 6 dpi, respectively). Unlesioned mice from both strains were also killed (0 dpi). **A**: mRNA levels of several host response genes were analyzed by RNAse protection assay (RPA). **B**: mRNA levels were quantitated by phosphor imaging and normalized with L32 mRNA levels. Results (arbitrary units; mean \pm SEM; $n = 3-5$) were evaluated using two-way ANOVA using cryolesion and strain as the main factors. \blacklozenge , $P < 0.01$ vs. unlesioned mice; $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ vs. wild-type mice. Image shown is an autoradiographic film. Quantification was done by phosphor imaging.

genes has been described to be important factors in neuronal and oligodendrocyte development.

TNFR2 deficiency increased the expression of genes important for neuronal development and maturation but also for neuronal survival after an injury, such as glial cell line derived neurotrophic factor (*gdnf*).

Microarray Results Are Confirmed by Other Approaches

There are is little doubt that microarray results are reliable, yet it is always important to confirm their results independently. We have done this by means of ribonuclease protection assay (RPA) and in situ hybridization. By means of RPA, we confirmed that *gfap* gene expression was induced by the cryolesion at 2-6 dpi and that its

expression (along with another inflammation-related gene such as the acute phase gene *ebb22/5*) was remarkably reduced at 2 dpi in TNFR1KO mice (Fig. 8A,B) but not in TNFR2KO mice (Fig. 9A,B). *gfap* expression judged by RPA was essentially similar in the three strains at 3-6 dpi, which is in accordance with the microarray results.

No differences were found for Mac1 or ICAM expression at any of the time points studied other than the effect of the cryolesion itself, although remarkably at 6 dpi the two KO strains showed opposite tendencies (Figs. 8, 9).

It is noteworthy that no differences were observed between naive and SHAM animals regarding the expression of analyzed genes (Fig. 10) or in the horizontal ladder beam behavioral test (not shown).

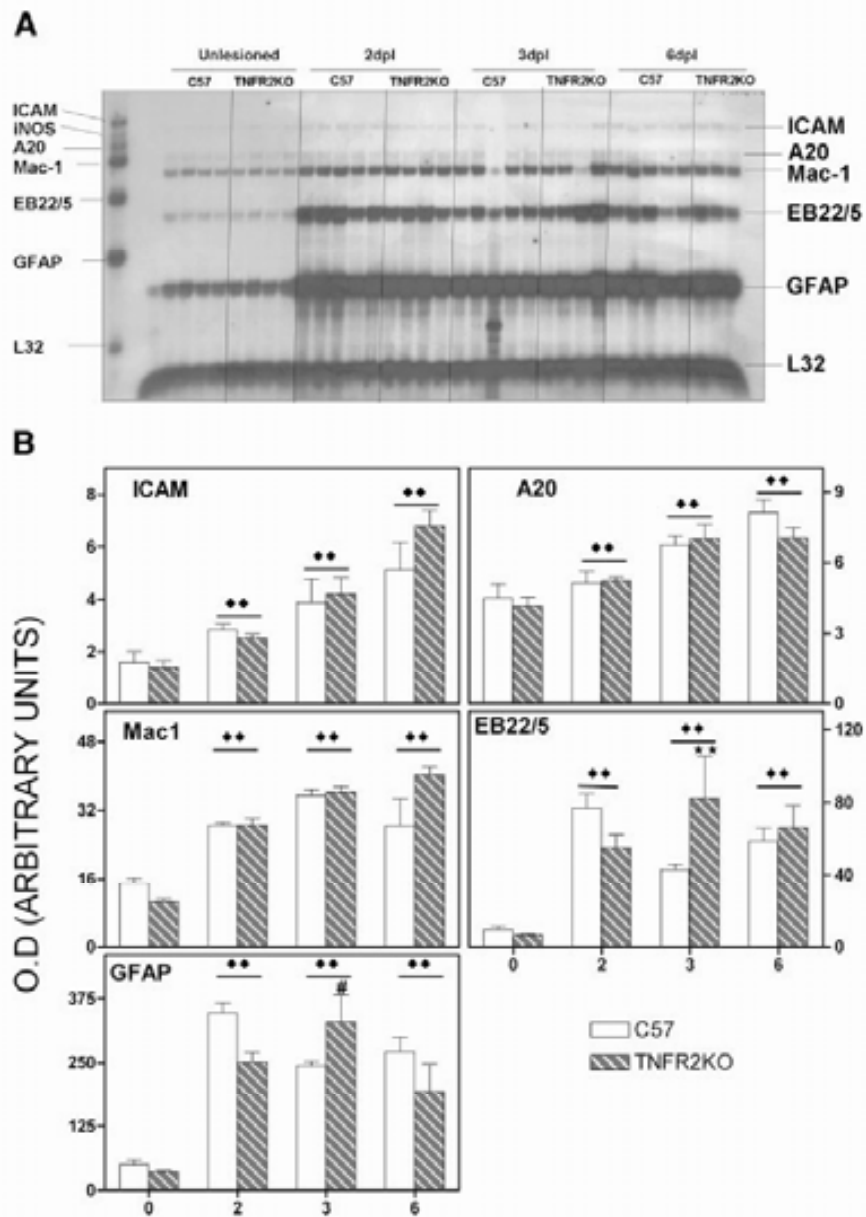


Fig. 9. Analysis of host response gene expression. Wild-type (C57BL/6) and TNFR2knockout (TNFR2KO) mice were subjected to a cryolesion of the left cortex and killed after 2, 3, or 6 days after the lesion (2 dpi, 3 dpi, and 6 dpi, respectively). Unlesioned mice from both strains were also killed (0 dpi). **A:** mRNA levels of several host response genes were analyzed by RNase protection assay (RPA). **B:** mRNA levels were quantitated by phosphor imaging and normalized with L32 mRNA levels. Results (arbitrary units; mean \pm SEM; $n = 3-5$) were evaluated using two-way ANOVA using cryolesion and strain as the main factors. \blacklozenge , $P < 0.01$ vs. unlesioned mice; \blacksquare , $P < 0.01$ vs. wild-type mice. $\#P = 0.058$ vs. wild-type mice. Image shown is an autoradiographic film. Quantification was done by phosphor imaging.

We also confirm by in situ hybridization that TNFR1 but not TNFR2 deficiency decreases *metallothionein-1* expression (Fig. 11).

DISCUSSION

TNFR1/TNFR2 Signaling Is Involved in Locomotor Activity and Exploratory Behavior

Although the role of TNF α in different injuries in the CNS has been extensively described (Muñoz-Fernández

and Fresno, 1998), much less work has been carried out in describing the effect of TNF α signaling in animal behavior. Taking advantage of mice knocked-out either for TNFR2 or TNFR1 we first studied the behavioral pattern of these animals before any insult to the CNS. For this purpose we used two very well established behavioral tests such as the hole-board and the elevated plus maze. The nature of each test is different. The hole board is a test that evaluates exploratory behavior and locomotor activity (File and Wardill, 1975). The elevated plus maze is

2682 Quintana et al.

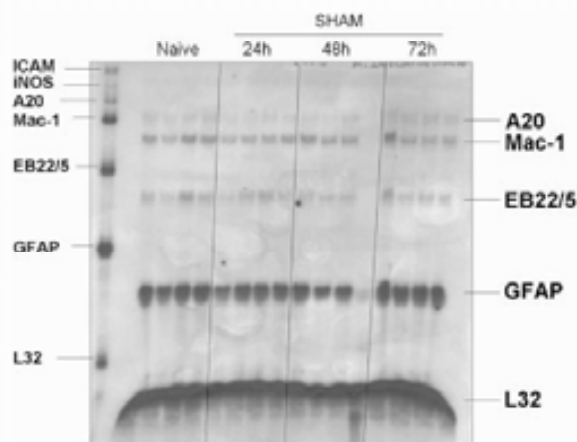


Fig. 10. Comparison of host response gene expression in naive and SHAM-operated animals sacrificed at 1, 2, or 3 days after surgery. No effect of the surgery is observed at any time point studied on gene expression ($n = 4$ for all groups).

basically a test for anxiety (Pellow and File, 1986). It must be kept in mind, however, that any behavior observed in mice carrying out these tests is never exclusively due to one factor or the other, but to a mix of different components.

Lack of either TNFR1 or TNFR2 alone was capable of increasing the locomotor/exploratory activity of mice, as observed by the increase in the number of total ambulations, which was due to an increase in the number of outer quadrant ambulations. In agreement with these results, TNF- α overexpressing mice presented a decreased locomotor activity (Fiore et al., 1998). However, inner quadrant ambulations did not differ to WT mice. This fact, together with a lack of effect of TNFR deficiencies on the number of defecations, does not support a role of these receptors in the control of anxiety. In accordance, no differences between the three strains were observed with a more sensitive anxiety test, the elevated plus maze. Thus, unlike other pro-inflammatory cytokines like IL-6 (Armario et al., 1998) or IL-2 (Pawlak et al., 2003), TNF- α does not seem to play a role in anxiety behavior. Because lymphotoxin- α may signal through the TNFR1 (Bossen et al., 2006), these results also may apply to this cytokine.

Lack of TNFR2 increases exploratory activity, as shown by the increased number of head dippings and rearings in the hole board test, suggesting a different behavioral pattern in these mice. The microarray results show clearly a remarkable effect of TNFR2 deficiency on the expression of many genes involved in development stages as well as synaptic activity (Suppl. Tables I and II). This suggests that TNFR2 signaling may have an effect on development affecting gene expression and causing the differences observed in the behavioral tests analyzed. However, activational effects of TNFR2 cannot be ruled out. It is noteworthy to mention that TNF- α has been described recently in playing a role in synaptic scaling

(Stellwagen and Malenka, 2006), so it may well fit with our hypothesis.

TNF Receptors Signaling Significantly Affects the Response to Brain Injury

Traumatic brain injury is one of the main causes of disability and death, especially among young people. To study the role of TNFR1 and TNFR2 in the response elicited by the injury, we studied TNFR1KO and TNFR2KO mice as well as wild-type mice in the cryolesion model. This model of injury of the cortex has been used extensively in our lab, and has allowed us to demonstrate a role for IL-6 (Penkowa et al., 1999b, 2003; Poulsen et al., 2005) as well as preliminary roles for TNF receptors (Quintana et al., 2005). In the latter study, we described that TNFR1, but not TNFR2, was involved in the establishment of the inflammatory response to a cryolesion of the cortex, suggesting a detrimental role for TNFR1 but not TNFR2 after an injury. The role of TNF- α /lymphotoxin- α and their receptors remain conflicting, however, with many studies showing both neuroprotective and neuropathologic effects depending on the type of cell, production of other cytokines, oxidative stress, experimental paradigm, timing, etc. A neuroprotective role in the CNS has been described in mice lacking both TNF receptors in ischemia and kainic acid-induced seizures (Bruce et al., 1996; Gary et al., 1998). In contrast, opposing roles have been described for both receptors in a multiple sclerosis animal paradigm, having TNFR1 a detrimental effect and the opposite for TNFR2 (Eugster et al., 1999; Suvannavejth et al., 2000). However, no effect on damage after deletion of either TNFR1 or TNFR2 alone, is observed in the axotomized facial motor nucleus model (Raivich et al., 2002), but if both receptors are missing an almost complete prevention of cell death is seen (Raivich et al., 2002). It is clear that further analyses of these mice are needed.

The clinical effect of a lesion to the cortex was observed readily in the horizontal ladder beam. Thus, the cryolesion increased the number of errors made by mice of all strains. Confirming our previous neuropathologic results (Quintana et al., 2005), TNFR1KO animals performed better in this test, suggesting a decreased brain damage from 4–6 days after the lesion. This in principle fits well with the general description of TNFR1 signaling pathway as an inflammatory pathway. However, to our surprise, animals lacking receptor 2 also presented a better outcome in the horizontal ladder beam, suggesting that both receptors may be considered detrimental pathways during brain injury despite enormous differences in inflammation-related gene expression and neuropathology compared with WT mice (Quintana et al., 2005). To give insight into the roles of TNFR1 and TNFR2 signaling pathways, we have studied the expression of more than 20,000 genes by means of microarray technology at 0, 1, or 4 dpl.

We were able to identify many genes that were affected by cryolesion, by strain, or by both (Figs. 2–7,

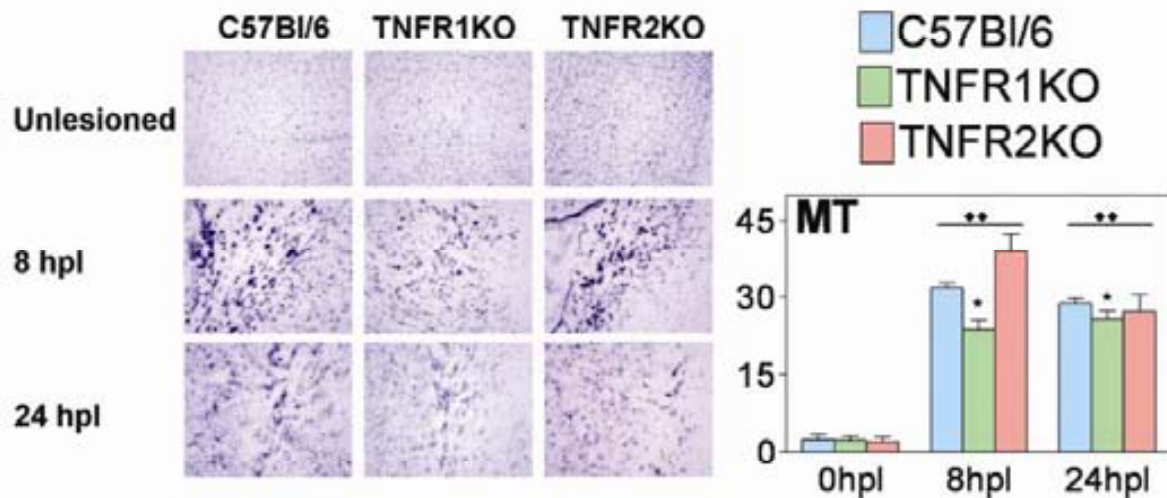


Fig. 11. Analysis of *metallothionein 1* gene expression by in situ hybridization. Wild-type (C57Bl/6), TNFR1knockout (TNFR1KO), and TNFR2knockout (TNFR2KO) mice were subjected to a cryolesion of the left cortex and sacrificed 8 or 24 hr after the lesion (8 hpl and 24 hpl, respectively). Unlesioned mice from all strains were also sacrificed (0 hpl). *Mt1* mRNA levels were analyzed. Autoradiographies from six slides/animal were quantified (arbitrary units; mean \pm SEM;

$n = 3$) and evaluated using two-way ANOVA using cryolesion and strain as the main factors. $\blacklozenge\blacklozenge$, $P < 0.01$ vs. unlesioned mice; $\ast P < 0.05$ vs. wild-type mice. Microautoradiographies were obtained as described in Materials and Methods and shown here for the sake of clarity. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

Suppl. Tables I, II). Transcription factors such as *c/ebp*, *c-jun*, and *c-fos* tended to be downregulated in animals lacking any of the TNF receptors. Of special relevance is *NFkB*, as it is considered a key factor in TNF- α signaling. Decreased *NFkB* signaling in TNF-deficient animals has been suggested in many studies (Sullivan et al., 1999; Kim et al., 2001; Quintana et al., 2005), although the final outcome varied depending on the downstream genes induced by this factor. *NFkB* can induce both inflammatory and anti-inflammatory genes (Hallenbeck, 2002), so depending on this balance the final outcome can be positive or negative. Further evidence of decreased *NFkB* activity may be the lower expression observed for *c-jun*, *c-fos*, *Gadd45B*, and *Gadd45 γ* , which are in the *NFkB* downstream pathway.

When looking for inflammatory-related genes, microarray confirmed our previous results (Quintana et al., 2005). Only TNFR1KO animals presented a tendency for lower gene expression of genes involved in pro-inflammatory cytokine signaling at 1 dpl, namely *interleukin 1 receptor 1* that is responsible for the effects of the proinflammatory cytokine IL-1 (Rothwell and Hopkins, 1995), signal transducer, and activator of transcription-3 (*stat-3*), a main effector of the IL-6 cascade, or the silencer of cytokine signaling 3 (*socs-3*), involved in the regulation of cytokine signaling. Gene expression for the chemokines *cd3*, *cd6*, *cd10*, and *cd12*, which play important roles in attracting immune cells (Wang et al., 2002), was also decreased. All these effects are consistent to what is known of the phenotype of these mice. The anti-inflammatory, antioxidant proteins *metallothionein-1* and *-2* were found to be reduced in TNFR1KO mice at 1 dpl. These

proteins have been described extensively as anti-inflammatory and anti-apoptotic factors by our group (Hidalgo et al., 2002; Penkowa, 2006), and have been described to be induced by IL-6 via STAT-3 signaling in liver (Lee et al., 1999). *Timp1*, a gene that counteracts the negative effects of matrix metalloproteinases was also downregulated at 1 dpl and so was glial fibrillary acidic acid expression that expression was decreased only in TNFR1KO mice at 1 dpl. However, there were no differences between strains at 4 dpl.

We confirmed these results by looking at gene expression of selected genes such as *gfap* and *metallothionein-1* by other means such as RPA or in situ hybridization, techniques more sensitive than microarray. TNFR1KO mice showed a reduced *gfap* expression, an effect more obvious at 2 dpl than later, and also *metallothionein-1* expression was decreased in TNFR1 but not TNFR2KO mice. These results are in line with those obtained in the microarray analyses. The expression of the acute phase-gene *eb22/5* (Campbell et al., 1994) was also decreased at 2 dpl in the TNFR1 KO mice, an effect compatible with the overall decreased inflammatory response of these mice. We were able to confirm the role of TNFR1 in early stages of inflammatory response, which likely underlies, at least in part, the observed lower functional and neuropathologic damage, in agreement with previous results suggesting a detrimental role for TNFR1 (Eugster et al., 1999; Suvannavejh et al., 2000; Quintana et al., 2005) in different paradigms.

As discussed above, it was totally unexpected that the TNFR2KO would manifest lower symptoms of brain

2684 Quintana et al.

damage as shown by the functional test horizontal ladder beam. These mice do not differ from wild-type regarding inflammation and prototypical proinflammatory gene expression, as the TNFR1 KO mice do. It is obvious that the mechanisms underlying such a better functional performance differ dramatically in both KO mouse models. Hence, the microarrays study proved to be a valuable and unique tool for elucidating this differential action between both receptors. It was striking to observe the large number of genes that were constitutively affected in TNFR2KO mice in comparison to either WT or TNFR1 KO mice. As stated briefly in the Results section, many of these genes are involved in development, memory processes, synaptic plasticity, and microtubule stabilization. It is impossible to discuss all genes identified, and thus the reader is invited to see Figures 2–7 as well as the Supplementary Tables. Further studies are warranted for a complete understanding of the contribution of each TNF receptor in brain physiology.

Traumatic brain injury is one of the leading causes of transient and permanent disabilities, and thus it is essential to gain insight into the mechanisms involved. Microarray technology provides a powerful tool in this regard, which has been used successfully in a number of models of brain injury by microarrays (Read et al., 2001; Tang et al., 2002; Long et al., 2003; Rao et al., 2003; Roth et al., 2003; Natale et al., 2003, 2004; Dhodda et al., 2004; Kury et al., 2004; Lu et al., 2004; Faden et al., 2005). See also Dash et al. (2004) and Gebicke-Haerter (2005) for a review. Although this is a significantly well-known scenario, the comparison of wild-type animals with genetically modified ones add a further layer of complexity to the analyses that provides great insight. Our group has described previously the effect of cryolesion in animals lacking interleukin 6 (Poulsen et al., 2005) or metallothioneins 1 and 2 (Penkowa et al., 2006), and in this study we have analyzed the role(s) of the TNF receptors with the same approach. This opens new venues for understanding the importance of this major cytokine in brain physiology.

ACKNOWLEDGMENTS

These studies were supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología and Feder SAF2005-00671 and European Commission FP6 Integrated Project Exgenesis (Ref. LSHM-CT-2004-005272) (J.H.); by NIH grants NS36979 and MH62231 (I.L.C.); and by the Asta Florida Boldings Mindelgat Fond (M.P.).

REFERENCES

- Allan SM, Rothwell NJ. 2003. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:1669–1677.
- Armario A, Hernández J, Blaethmann H, Hidalgo J. 1998. IL-6 deficiency leads to increased emotionality in mice: evidence in transgenic mice carrying a null mutation for IL-6. *J Neuroimmunol* 92:160–169.
- Blaethmann H, Rothe J, Schultze N, Tkachuk M, Koebel P. 1994. Establishment of the role of IL-6 and TNF receptor using gene knock-out mice. *J Leukoc Biol* 56:565–570.
- Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer JL, Gaide O, Hertig S, Ambrose C, Tschopp J, Schneider P. 2006. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J Biol Chem* 281:13964–13971.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holsberg FW, Mattson MP. 1996. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2:788–794.
- Campbell IL. 1998. Transgenic mice and cytokine actions in the brain: bridging the gap between structural and functional neuropathology. *Brain Res Rev* 26:327–336.
- Campbell IL, Hobbs MV, Kemper P, Oldstone MBA. 1994. Cerebral expression of multiple cytokine genes in mice with lymphocytic choriomeningitis. *J Immunol* 152:716–723.
- Carrasco J, Hernández J, González B, Campbell IL, Hidalgo J. 1998. Localization of metallothionein-I and -III expression in the CNS of transgenic mice with astrocyte-targeted expression of interleukin 6. *Exp Neurol* 153:184–194.
- Carrasco J, Penkowa M, Hadberg H, Molinero A, Hidalgo J. 2000. Enhanced seizures and hippocampal neurodegeneration following kainic acid induced seizures in metallothionein-III deficient mice. *Eur J Neurosci* 12:2311–2322.
- Cook JL, Marcheselli V, Alam J, Deininger PL, Bazan NG. 1998. Temporal changes in gene expression following cryogenic rat brain injury. *Mol Brain Res* 55:9–19.
- Chiang C-S, Stalder A, Samimi A, Campbell IL. 1994. Reactive gliosis as a consequence of interleukin 6 expression in the brain: studies in transgenic mice. *Dev Neurosci* 16:212–221.
- Dash PK, Kobori N, Moore AN. 2004. A molecular description of brain trauma pathophysiology using microarray technology: an overview. *Neurochem Res* 29:1275–1286.
- Debatin KM. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53:153–159.
- Dennis GJ, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA. 2003. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol* 4:P3.
- Dhodda VK, Saslor KA, Bowen KK, Vemuganti R. 2004. Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *J Neurochem* 89:73–89.
- Eugster HP, Frei K, Bachmann R, Bluethmann H, Lassmann H, Fontana A. 1999. Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1. *Eur J Immunol* 29:626–632.
- Faden AI, Movsesyan VA, Knoblich SM, Ahmed F, Cernak I. 2005. Neuroprotective effects of novel small peptides in vitro and after brain injury. *Neuropharmacology* 49:410–424.
- File SE, Wardill AG. 1975. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44:53–59.
- Fiore M, Alleva E, Probert L, Kollias G, Angelucci F, Aloe L. 1998. Exploratory and displacement behavior in transgenic mice expressing high levels of brain TNF-alpha. *Physiol Behav* 63:571–576.
- Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP. 1998. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1283–1287.
- Gebicke-Haerter PJ. 2005. Microarrays and expression profiling in microglia research and in inflammatory brain disorders. *J Neurosci Res* 81:327–341.
- Gilks CB, Price K, Wright JL, Churg A. 1998. Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke. *Am J Pathol* 152:269–278.
- Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B. 2000. Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:53–65.
- Hallenbeck JM. 2002. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 8:1363–1368.
- Hansson E, Ronnback L. 2003. Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J* 17:341–348.

- Hicks RR, Li C, Zhang L, Dhillon HS, Prasad MR, Seroogy KB. 1999. Alterations in BDNF and trkB mRNA levels in the cerebral cortex following experimental brain trauma in rats. *J Neurotrauma* 16:501-510.
- Hidalgo J, Penkowa M, Giral M, Carrasco J, Molinero A. 2002. Metallothionein expression and oxidative stress in the brain. *Methods Enzymol* 348:238-249.
- Kim GM, Xu J, Xu J, Song SK, Yan P, Ku G, Xu XM, Hsu CY. 2001. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 21:6617-6625.
- Kury P, Schroeter M, Jander S. 2004. Transcriptional response to circumscribed cortical brain ischemia: spatiotemporal patterns in ischemic vs. remote non-ischemic cortex. *Eur J Neurosci* 19:1708-1720.
- Lee DK, Carrasco J, Hidalgo J, Andrews GK. 1999. Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem J* 337:59-65.
- Lee SJ, Benveniste EN. 1999. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 98:77-88.
- Lee TS, Chau LY. 2002. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8:240-246.
- Leicher T, Roeper J, Weber K, Wang X, Pongs O. 1996. Structural and functional characterization of human potassium channel subunit $\beta 1$ (KCNA1B). *Neuropharmacology* 35:787-795.
- Li C, Wong WH. 2001. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:31-36.
- Long Y, Zou L, Liu H, Lu H, Yuan X, Robertson CS, Yang K. 2003. Altered expression of randomly selected genes in mouse hippocampus after traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 71:710-720.
- Lu XC, Williams AJ, Yao C, Berti R, Hartings JA, Whipple R, Vahay MT, Polavarapu RG, Woller KL, Tortella FC, Dave JR. 2004. Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion. *J Neurosci Res* 77:843-857.
- MacEwan DJ. 2002a. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 135:855-875.
- MacEwan DJ. 2002b. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14:477-492.
- Muñoz-Fernández MA, Fresno M. 1998. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 56:307-340.
- Natale JE, Ahmed F, Cernak I, Stoica B, Faden AI. 2003. Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 20:907-927.
- Natale JE, Knight JB, Cheng Y, Rome JE, Gallo V. 2004. Metallothionein I and II mitigate age dependent secondary brain injury. *J Neurosci Res* 78:303-314.
- Olanow C. 1993. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci* 16:439-444.
- Pawlak CR, Ho YJ, Schwarting RK, Bauhofer A. 2003. Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behavior in the rat. *Neurosci Lett* 341:205-208.
- Pellow S, File SE. 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24:525-529.
- Penkowa M. 2006. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *FEBS J* 273:1857-1870.
- Penkowa M, Cáceres M, Borup R, Nielsen FC, Poulsen CB, Quintana A, Molinero A, Carrasco J, Florit S, Giral M, Hidalgo J. 2006. Novel roles for Metallothionein-I+II (MT-I+II) in defense responses, neurogenesis and tissue restoration after traumatic brain injury: insights from global gene expression profiling in wildtype and MT-I+II knockout mice. *J Neurosci Res* 84:1452-1474.
- Penkowa M, Carrasco J, Giral M, Moos T, Hidalgo J. 1999a. CNS wound healing is severely depressed in metallothionein I- and II-deficient mice. *J Neurosci* 19:2535-2545.
- Penkowa M, Giral M, Lago N, Camas J, Carrasco J, Hernández J, Molinero A, Campbell IL, Hidalgo J. 2003. Astrocyte-targeted expression of IL-6 protects the CNS against a focal brain injury. *Exp Neurol* 181:130-148.
- Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Blaethmann H, Hidalgo J. 1999b. Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 25:343-357.
- Poulsen CB, Penkowa M, Borup R, Nielsen FC, Cáceres M, Quintana A, Molinero A, Carrasco J, Giral M, Hidalgo J. 2005. Brain response to traumatic brain injury in wild-type and interleukin-6 knockout mice: a microarray analysis. *J Neurochem* 92:417-432.
- Prins ML, Hovda DA. 2003. Developing experimental models to address traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 20:123-137.
- Quintana A, Giral M, Rojas S, Penkowa M, Campbell IL, Hidalgo J, Molinero A. 2005. Differential role of tumor necrosis factor receptors in mouse brain inflammatory responses in cryolesion brain injury. *J Neurosci Res* 82:701-716.
- Raivich G, Bohatschek M, Werner A, Jones LL, Galiano M, Kloss CU, Zhu XZ, Pfeffer K, Liu ZQ. 2003. Lymphocyte infiltration in the injured brain: role of proinflammatory cytokines. *J Neurosci Res* 72:726-733.
- Raivich G, Liu ZQ, Kloss CU, Lahow M, Blaethmann H, Bohatschek M. 2002. Cytotoxic potential of proinflammatory cytokines: combined deletion of TNF receptors TNFR1 and TNFR2 prevents motoneuron cell death after facial axotomy in adult mouse. *Exp Neurol* 178:186-193.
- Rao VLR, Dhodda VK, Song G, Bowen KK, Dempsey RJ. 2003. Traumatic brain injury-induced acute gene expression changes in rat cerebral cortex identified by GeneChip analysis. *J Neurosci Res* 71:208-219.
- Read SJ, Parsons AA, Harrison DC, Philpott K, Kabnick K, O'Brien S, Clark S, Brawner M, Bates S, Gloger I, Legos JJ, Barone FC. 2001. Stroke genomics: approaches to identify, validate, and understand ischemic stroke gene expression. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:755-778.
- Roth A, Gill R, Certa U. 2003. Temporal and spatial gene expression patterns after experimental stroke in a rat model and characterization of PC4, a potential regulator of transcription. *Mol Cell Neurosci* 22:353-364.
- Rothwell NJ, Hopkins SJ. 1995. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18:130-136.
- Sayer FT, Oudega M, Hagg T. 2002. Neurotrophins reduce degeneration of injured ascending sensory and corticospinal motor axons in adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 175:282-296.
- Shohami E, Bait-Yannal E, Horowitz M, Kohen R. 1997. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1007-1019.
- Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. 1999. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:119-130.
- Stellwagen D, Malenka RC. 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440:1054-1059.
- Sullivan PG, Bruce-Keller AJ, Rabchevsky AG, Christakos S, Clair DK, Mattson MP, Scheff SW. 1999. Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury. *J Neurosci* 19:6248-6256.
- Suvannavejh GC, Lee HO, Padilla J, Dal Canto MC, Barrett TA, Miller SD. 2000. Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 205:24-33.
- Tang Y, Lu A, Aronow BJ, Wagner KR, Sharp FR. 2002. Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia. *Eur J Neurosci* 15:1937-1952.
- Wang J, Asensio VC, Campbell IL. 2002. Cytokines and chemokines as mediators of protection and injury in the central nervous system assessed in transgenic mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 265:23-48.
- Yankner BA. 1996. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16:921-932.

Trabajo 3

La deficiencia de interleuquina-6 reduce la respuesta inflamatoria después de criolesión pero incrementa el daño oxidativo y la apoptosis.

Brain response to traumatic brain injury in wild-type and interleukin-6 knockout mice: a microarray analysis.

Journal of Neurochemistry 92:417-432 (2005)

Brain response to traumatic brain injury in wild-type and interleukin-6 knockout mice: a microarray analysis

Christian Bjørn Poulsen,* Milena Penkowa,† Reannah Borup,‡ Finn Cilius Nielsen,‡ Mario Cáceres,§ Albert Quintana,¶ Amalia Molinero,¶ Javier Carrasco,¶ Mercedes Giralt¶ and Juan Hidalgo¶

*Department of Pathology, Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark

†Department of Medical Anatomy, The Panum Institute, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

‡Department of Clinical Biochemistry, Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark

§Department of Human Genetics, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia 30322, USA

¶Institute of Neurosciences and Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Animal Physiology Unit, Faculty of Sciences, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

Abstract

Traumatic injury to the brain is one of the leading causes of injury-related death or disability. Brain response to injury is orchestrated by cytokines, such as interleukin (IL)-6, but the full repertoire of responses involved is not well known. We here report the results obtained with microarrays in wild-type and IL-6 knockout mice subjected to a cryolesion of the somatosensory cortex and killed at 0, 1, 4, 8 and 16 days post-lesion. Overall gene expression was analyzed by using Affymetrix genechips/oligonucleotide arrays with ~12 400 probe sets corresponding to ~10 000 different murine genes (MG_U74Av2). A robust, conventional statistical method (two-way ANOVA) was employed to select the genes significantly affected. An orderly pattern of gene responses was clearly

detected, with genes being up- or down-regulated at specific timings consistent with the processes involved in the initial tissue injury and later regeneration of the parenchyma. IL-6 deficiency showed a dramatic effect in the expression of many genes, especially in the 1 day post-lesion timing, which presumably underlies the poor capacity of IL-6 knockout mice to cope with brain damage. The results highlight the importance of IL-6 controlling the response of the brain to injury as well as the suitability of microarrays for identifying specific targets worthy of further study.

Keywords: affymetrix, interleukin-6 deficiency, microarray, mouse, traumatic brain injury.

J. Neurochem. (2005) **92**, 417–432.

Traumatic brain injury is one of the leading causes of injury-related death and disability, especially in young people (see Prins and Hovda 2003 for review). The general response of the brain to traumatic injury has been well described pathophysiologically: blood–brain barrier disruption, infiltration and activation of inflammatory cells, death of local neurons and glial cells caused by ischemia and hypoxia along with release of excitatory amino acids, gliosis, recruitment of endothelial cells, angiogenesis, compensatory responses in the surroundings of the most severely affected areas and formation of a glial scar are well-known phenomena. It is generally accepted that these series of responses are orchestrated by a number of cytokines, chemokines and growth factors in a complex manner (for reviews see Giulian *et al.* 1989; Eddleston and Mucke 1993; Mattson and Scheff 1994;

Hopkins and Rothwell 1995; Perry *et al.* 1995; Rothwell and Hopkins 1995; Merrill and Benveniste 1996; Ridet *et al.* 1997; McIntosh *et al.* 1998; Muñoz-Fernández and Fresno 1998; Stichel and Verner Müller 1998; Hughes *et al.* 1999; Horner and Gage 2000; Allan and Rothwell 2001; Aloisi 2001; Dong and Benveniste 2001).

Received July 12, 2004; revised manuscript received August 31, 2004; accepted September 23, 2004.

Address correspondence and reprint requests to Dr Juan Hidalgo, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain 08193.

E-mail: Juan.Hidalgo@uab.es

Abbreviations used: dpl, day post-lesion; IL, interleukin; KO, knockout; WT, wild-type.

Interleukin (IL)-6 is probably one of the essential cytokines for a normal brain function not only during injury but also in normal conditions. For instance, we have demonstrated that IL-6-deficient mice display altered emotional behavior with clear signs of increased emotionality (Annario *et al.* 1998), a result recently confirmed by Butterweck *et al.* (2003). These genetically modified mice also demonstrate that central IL-6 appears to control thermogenesis (Chai *et al.* 1996), body weight (Wallenius *et al.* 2002; Jansson *et al.* 2003) and susceptibility to convulsant stimuli (Penkowa *et al.* 2001; De Sarro *et al.* 2004). In response to injury, a number of reports show a compromised inflammatory response, gliosis, specific neuronal survival and specific neuronal fiber growth in IL-6 knockout (KO) mice to various degrees depending on the injury model (Klein *et al.* 1997; Mendel *et al.* 1998; Penkowa *et al.* 1999b, 2001; Clark *et al.* 2000; Ladenheim *et al.* 2000; Sugiura *et al.* 2000; Galiano *et al.* 2001; Swartz *et al.* 2001; Bolin *et al.* 2002; Parish *et al.* 2002; Cardenas and Bolin 2003; Pavelko *et al.* 2003). The mechanisms through which IL-6 mediates these effects are poorly known. Thus, the main aim of the present study was to gain insight in this regard by examining the overall gene expression patterns in the cortex of normal and IL-6 KO mice subjected to a cryolesion using current microarray technology, an approach likely to have a large impact in neurobiology (Insel *et al.* 2004; Mimics and Pevsner 2004).

Materials and methods

Experimental design

Breeding pairs of IL-6 KO mice in C57B6 genetic background were provided by Dr Horst Bluethman (Roche Center for Medical Genomics, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). The control mice used were of the same strain. Both strains are maintained in the installations of Harlan Ibérica, S.L., (Sant Felú de Codines, Spain).

Wild-type (WT) and IL-6 KO mice ($n = 3$ for each timing) were subjected to a cryolesion of the somatosensory cortex as previously described (Penkowa and Moos 1995; Penkowa *et al.* 1999b) and killed at four time points after cryolesion (1, 4, 8 and 16 days). The ipsilateral cortex was immediately dissected and frozen in liquid nitrogen, being stored afterwards at -80°C . Unlesioned control and IL-6 KO mice ($n = 2$) were also killed. In total therefore we used 28 mice.

Gene expression and DNA microarray analysis

Total RNA was isolated from each hemisphere cortex sample using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and further purified with RNeasy1 kit (Qiagen, Albertslund, Denmark). Purified RNA (5 μg) was used to synthesize double-stranded cDNA using Superscript Choice System (Invitrogen) with an oligo-dT primer containing a T7 RNA polymerase promoter (GenSet, Evry, France). The cDNA was used as a template for an *in vitro* transcription reaction to synthesize biotin-labeled antisense cRNA (BioArrayTM High Yield RNA Transcript Labeling Kit; Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, USA). After fragmentation at 94°C for 35 min

in fragmentation buffer (40 mM Tris, 30 mM MgOAc, 10 mM KOAc), the labeled cRNA was hybridized for 16 h to Affymetrix MG-U74Av2 arrays (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) which contain $\sim 12\,400$ mouse probe sets corresponding half to Expressed Sequence Tags (ESTs) and half to characterized genes. The arrays were washed and stained with phycoerythrin streptavidin using the Fluidics Station 400 (Affymetrix Inc.). The arrays were scanned in the GeneArray 2500 scanner (Affymetrix Inc.), as described in the GeneChip (Affymetrix Inc.) protocol, to generate fluorescent images.

The image files were imported into the software package DNA-Chip Analyzer (dChip) developed by Li and Wong (2001), which is freeware available at <http://www.dchip.org>. All the array files were normalized to the array with the median overall brightness using the multiarray invariant-set normalization method, which is based on probe values belonging to non-differentially expressed genes between the array being normalized and the baseline array (the invariant set). Expression values for each probe set were calculated according to the perfect match/mismatch difference model.

Gene filtering

A number of analysis methods for filtering the genes being up- or down-regulated in the different conditions were examined but finally we used a conservative strategy for the initial filtering followed by a standard statistical assay, two-way ANOVA with strain and cryolesion as main factors (see Results). Hierarchical clustering of the genes differentially expressed according to the ANOVA was carried out using the dChip software. Functional classification in gene-ontology categories of the genes belonging to each of the clusters identified was done with the EASE program Version 2.0 (Hosack *et al.* 2003). All gene-ontology categories with three or more genes and a Fisher exact probability of less than 0.05 were selected.

Results and discussion

Strategy for gene selection

Using dChip, we generated a combined gene list by comparing the genes up- and down-regulated at each time point for both WT and IL-6 KO with the unlesioned WT mice. The criteria to identify the genes were: 1.5-fold change (a 50% increase or decrease) and an absolute change in expression values of 100 expression units. This procedure produced a list of 440 genes. For identifying genes statistically significantly affected, the expression values were exported to a standard statistical software, SPSSx (SPSS, Chicago, IL, USA), where a conventional two-way ANOVA was performed ($p < 0.05$). This further analysis of the data reduced the list to 371 genes. This is not a dramatic reduction, which strongly suggests that the filtering criterion applied (1.5-fold change) is already quite restrictive. When looking at the specific effect of each factor (strain or cryolesion), 264 genes were significantly affected by the cryolesion only, 50 genes were significantly affected by the strain only and 50 were affected by both factors; seven genes showed only a significant interaction of both factors.

Despite having obtained these separate lists of genes generated by two-way ANOVA, we decided not to present the results this way, although the statistical results will be considered through the paper. The reason for this is that, although we used three mice per strain and timing, incurring significant costs, it is still too reduced a number of mice to expect two-way ANOVA to find all those genes significantly affected by IL-6 deficiency at any of the time points studied. On many occasions a given gene only changed its expression in a single timing, thus making it difficult to obtain statistical significance between WT and IL-6 KO mice when analyzing all groups together as is imperative for this experimental design. However, at the same time, ANOVA identified many genes changing relatively moderately but in several timings which would otherwise not be detected. In order to show the data in a more conservative but realistic way, we proceeded as follows. The pattern of expression of the 371 genes identified to be significantly affected by the two-way ANOVA (strain, cryolesion or both and/or interaction between factors) was analyzed using the high-level analysis 'Hierarchical clustering' utility of dChip (see Fig. 1). In the clustering picture each row represents a gene and each column represents the mean value of the two (unlesioned) or three (lesioned) mice for each strain and timing. The color scale on the bottom represents the relative expression level, the red, white and blue colors corresponding to expression levels above mean, mean and lower than mean expression of a gene across all samples, respectively (see <http://www.dchip.org> for further details). This high-level analysis detects clusters of genes which behave similarly, i.e. those genes which are down-regulated by the cryolesion, those which are up-regulated at 1 day post-lesion (dpl), 4 dpl, etc. and by looking at Fig. 1 it is obvious that a number of clusters are readily identified and that both cryolesion and IL-6 deficiency show clear-cut effects. In order to show and discuss in some detail the genes affected, this hierarchical clustering has been split into six parts (Figs 2–7). In Table S1 we provide the Affymetrix probe set numbers and the corresponding full names of the genes for each figure, arranged alphabetically.

Patterns of gene expression: functional analysis

Considering the number of genes significantly affected in this experimental paradigm it becomes obvious that they cannot be discussed one by one in detail. Thus, we carried out a functional analysis using Gene Ontology as described previously (Hosack *et al.* 2003) to identify the categories over-represented among the genes belonging to each of the Fig. 1 clusters (Table S2). For this study we will focus rather on those genes affected by IL-6 deficiency and only comment briefly on those genes up- or down-regulated by the cryolesion itself with the exception of 1 dpl, when an early wave of gene expression is elicited which presumably conditions subsequent gene expression. It is, however,

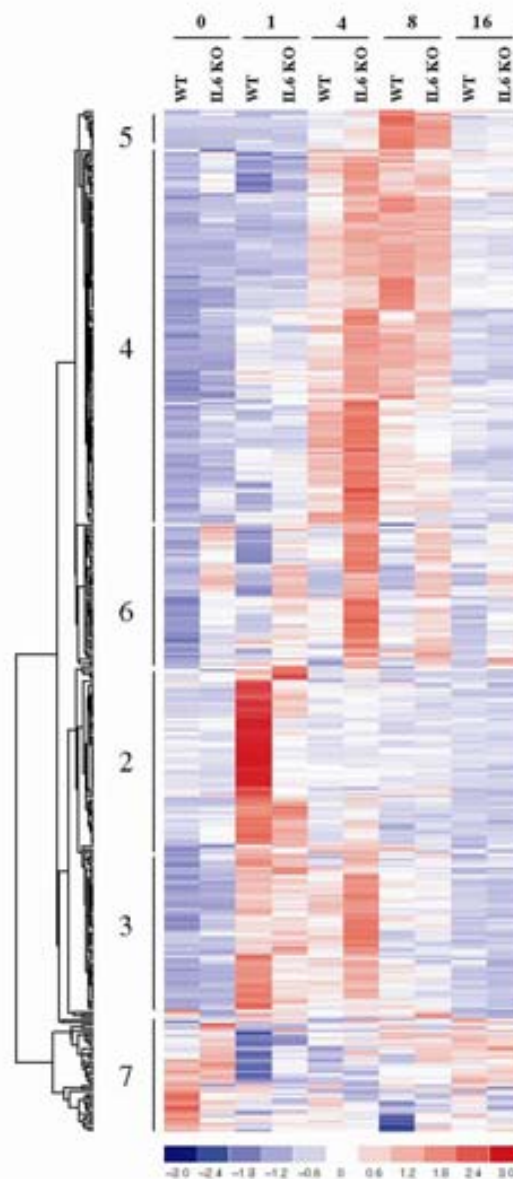


Fig. 1 Hierarchical clustering of the 371 genes (including redundant probe sets and genes of unknown function) identified to be significantly affected by the two-way ANOVA (strain, cryolesion or both and/or interaction between factors). Each row represents a gene and each column represents the mean value of the two (unlesioned) or three (lesioned) mice for each strain and timing. The clustering was split into several parts as shown in order to show the name of the genes (see Figs 2–7). IL, interleukin; KO, knockout; WT, wild-type.

essential to realize that the results compare exceptionally well with previous microarray results for other brain injury models (Tang *et al.* 2002; Natale *et al.* 2003; Kury *et al.*

420 C. B. Poulsen *et al.*



Fig. 2 Hierarchical clustering of a subset of genes whose expression changes basically at 1 day post-lesion. Arrows, green and pink dots indicate a significant effect of the cryolesion, interleukin (IL)-6 deficiency or the interaction, respectively. KO, knockout; WT, wild-type.

2004), thereby validating our results. The present study, however, is the largest in terms of independent animals studied and timings examined, with the additional value of comparing WT and IL-6 KO mice.

Genes up-regulated at 1 day post-lesion

Figure 2 shows genes dramatically up-regulated at 1 dpl. As could be expected, many of these genes were related to cell signaling and transcription factors, often related to cytokine/growth factors as well as inflammatory and neuroprotective factors and lipid metabolism enzymes. Interestingly, IL-6 deficiency tended to decrease this up-regulation in many cases, many of them not reported previously.

The Janus kinase-signal transducer and activator of transcription factor signaling pathway, activated by many cytokines including IL-6 and growth factors, has been implicated in a variety of cellular functions (Ihle 1996). After binding of these cytokines to their receptors, the receptor dimerizes and tyrosine phosphorylation of the

receptor-associated Janus Activated Kinases (JAKs) occurs, followed by activation of the STATs, including STAT1-6. Phosphorylated STATs form dimers and translocate to the nucleus to activate the transcription of many target genes including a family of inhibitory proteins, cytokine-inducible SH2-containing protein [also known as suppressor of cytokine signaling (SOCS)] (Chen *et al.* 2000), which then turns off the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription factor signaling pathway. In the liver, IL-6 deficiency decreases SOCS3 expression (Hong *et al.* 2002) and thus our observation of a reduced SOCS3 up-regulation by cryolesion in the IL-6 KO mice was not unexpected and readily confirms the effect of IL-6 deficiency and thus the reliability of the experiment.

One of the genes up-regulated by the cryolesion was nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor alpha (I κ B α), which is important in the control of the transcription factor NF- κ B. This up-regulation was also evident at 4 and 8 dpl, although to a lesser extent. The

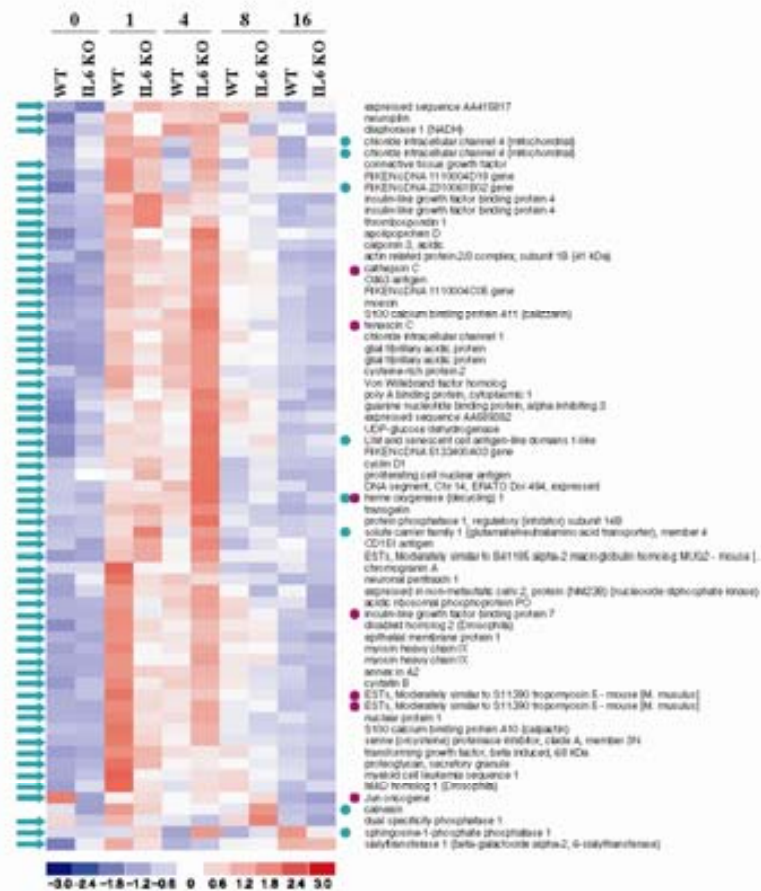


Fig. 3 Hierarchical clustering of a subset of genes whose expression changes basically at 1–4 days post-lesion. Arrows, green and pink dots indicate a significant effect of the cryolesion, interleukin (IL)-6 deficiency or the interaction, respectively. KO, knockout; WT, wild-type.

NF- κ B/Rel family of transcription factors plays a prominent role in the control of immune response, inflammation, cell proliferation and apoptosis (Karin and Lin 2002). In most cells, the NF- κ B transcription factor is sequestered in the cytoplasm by interaction with inhibitory proteins, the I κ Bs. Combined I κ B α /I κ B β deficiency in mice leads to neonatal death, elevated κ B binding activity, overexpression of NF- κ B target genes and disruption of lymphocyte production (Goudeau *et al.* 2003). Thus, an up-regulation of this gene might be of adaptive nature in this context of a massive brain injury. In IL-6 KO mice, the up-regulation of I κ B α was decreased at all times compared with WT mice, which could contribute to the poor response of these mice to brain injury because of improper control of NF- κ B target genes. For instance, CD14 is up-regulated in the CNS of EAE mice, associated with an increase in NF- κ B activity and transcriptional activation of genes encoding numerous proinflammatory molecules (Zekki *et al.* 2002), and is needed for mounting a normal inflammatory response (Yang *et al.* 2002). Thus, it is consistent that cryolesion dramatically increased CD14 expression and, furthermore, that such

up-regulation was significantly decreased by IL-6 deficiency, as IL-6 KO mice show a compromised inflammatory response in the brain (Penkowa *et al.* 1999b, 2000).

The immediate early gene FBJ osteosarcoma oncogene, best known as *c-fos*, encodes a transcription factor which forms heterodimers with Jun family proteins, the so-called AP-1 complexes, which regulate transcription by binding to the AP-1 sequence found in many cellular genes. *c-fos*, *c-jun* and Jun B are all induced by brain injury (Haas *et al.* 1999). It has been suggested that *c-fos* is essential in regulating neuronal cell survival versus death regulating, among other genes, several members of the neurotrophin family such as nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor (Cui *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2002). Neurotrophins constitute a family of highly conserved growth factors which regulate the generation and maintenance of diverse neuronal populations as well as axonal guidance, synaptic plasticity and protection against injury (Blesch *et al.* 1998; Schinder and Poo 2000; Huang and Reichardt 2001). Early growth response 1 (EGR-1, also known as nerve growth factor I-A, *krox24*, *zif268* and *tis 8*) is an activity-dependent inducible



Fig. 4 Hierarchical clustering of a subset of genes whose expression changes basically at 4–8 days post-lesion. Arrows, green and pink dots indicate a significant effect of the cryolesion, interleukin (IL)-6 deficiency or the interaction, respectively. KO, knockout; WT, wild-type.

immediate early gene required for consolidation of new memories as well as for reconsolidation of recognition memory after reactivation (Bozon *et al.* 2003); this transcription factor has also been suggested to be involved in diverse biological functions such as cell growth,

differentiation and apoptosis (Pignatelli *et al.* 2003). IL-6 induces immediate early activation of *junB* and *EGR-1* in M1 myeloid leukemia cells (Lotem and Sachs 1998). Our results are in line with these studies, as cryolesion induced *c-fos*, *c-jun* B and *EGR-1* and IL-6 deficiency tended to decrease their up-regulation. This was also the case with brain-derived neurotrophic factor. In line with our results, IL-6 appears to regulate brain-derived neurotrophic factor after nerve injury (Murphy *et al.* 2000).

CCAAT/enhancer binding protein is a transcription factor with a number of functions including consolidation of new memory (Taubenfeld *et al.* 2001) and potentiation of neuronal apoptosis via activation of the calcium-dependent phosphatase, calcineurin, induced by NMDA receptor-mediated calcium influx (Marshall *et al.* 2003). CCAAT/enhancer binding protein appears to be regulated by IL-6 (Kannaraju *et al.* 2004) and thus our results are in agreement with the expected induction by cryolesion and a reduction in the IL-6 KO mice, despite showing more apoptosis which calls for other pro- and/or anti-apoptotic genes to be involved. One such gene is *Gadd45 γ* (growth arrest and DNA damage inducible; CR6) which, together with *Gadd45 α* and *Gadd45 β* (*MyD118*), constitutes a family of evolutionarily conserved, small, acidic, nuclear proteins which have been implicated in terminal differentiation, growth suppression and apoptosis, are induced by brain damage (Chen *et al.* 1998) and may exert neuroprotective actions (Torp *et al.* 1998). *Gadd45 γ* is activated transcriptionally by at least two kinds of agents: DNA damaging agents or cytokines, such as IL-6, IL-2 and granulocyte colony-stimulating factor, and IL-6 induction appears to be mediated by CCAAT/enhancer binding protein (Jung *et al.* 2000). In accordance with this, *Gadd45 γ* was up-regulated by cryolesion and was significantly reduced by IL-6 deficiency; *Gadd45 β* expression followed a similar pattern. Another major gene probably underlying the increased apoptosis observed in the IL-6 KO mice is cyclin-dependent kinase inhibitor *p21(Cip1/WAF1)*, which was less induced in IL-6 KO compared with WT mice; a *p53*-mediated increase in this protein is thought to be the major mediator of cell cycle arrest after DNA damage (Tanaka *et al.* 2002). Nevertheless, these genes play a complex role which may be affected by the timing after DNA damage and repair (see Liu *et al.* 2001 for review).

Other neuroprotective factors up-regulated by cryolesion were also clearly reduced in IL-6 KO mice. These include, among others, heparin-binding epidermal growth factor-like (Kawahara *et al.* 1999; Jin *et al.* 2004), *Hsp105* (Yamagishi *et al.* 2002), *Hsp70* (Dhodda *et al.* 2004; Giffard and Yenari 2004; Kury *et al.* 2004), *PACAP* (Gomariz *et al.* 2001), inhibin beta-A (activin) (Michel *et al.* 2003), metallothionein-I and -II (Lee *et al.* 1999; Penkowa *et al.* 1999a,b; Giralt *et al.* 2002), neuronal pentraxin 2 (Tsui *et al.* 1996), interferon-related developmental regulator 1 (Roth *et al.* 2003), activating transcription factor 3 (Nakagomi *et al.*

Fig. 5 Hierarchical clustering of a subset of genes whose expression changes basically at 8 days post-lesion. Arrows, green and pink dots indicate a significant effect of the cryolesion, interleukin (IL)-6 deficiency or the interaction, respectively. KO, knockout; WT, wild-type.

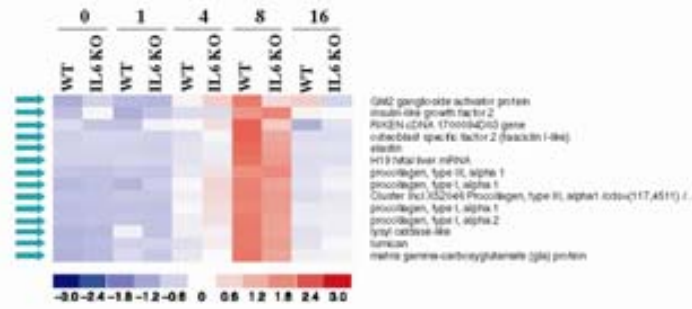
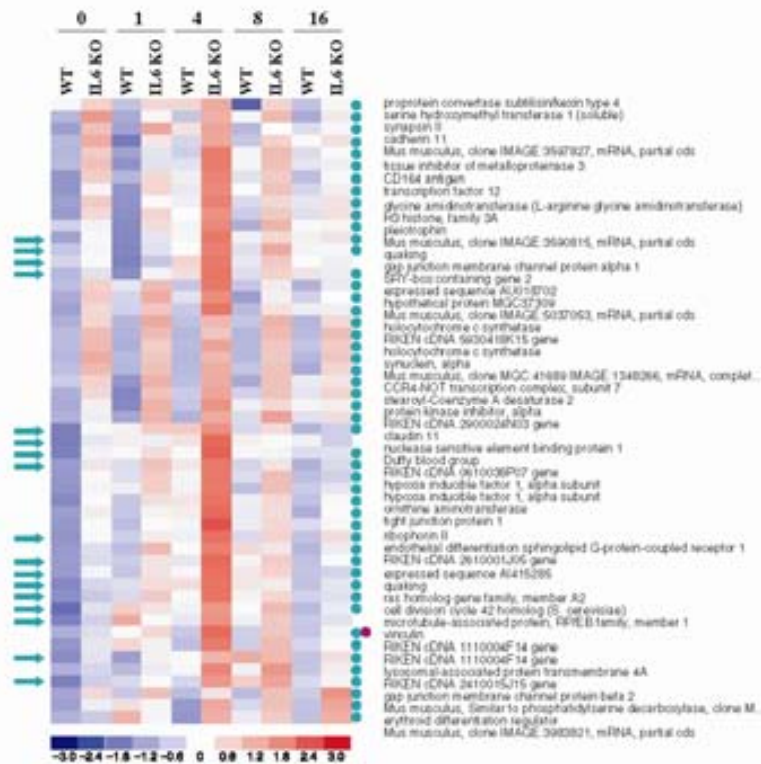


Fig. 6 Hierarchical clustering of a subset of genes whose expression is basically affected by interleukin (IL)-6 deficiency. Arrows, green and pink dots indicate a significant effect of the cryolesion, IL-6 deficiency or the interaction, respectively. KO, knockout; WT, wild-type.



2003), regulator of G-protein signaling 2 (Kobori *et al.* 2002) and adaptor protein neuronal immediate early gene Homer 1 (Potschka *et al.* 2002).

Ischemia induces secretogranin II (Kim *et al.* 2002) and we also observed a clear up-regulation after cryolesion. This calcium-binding protein accomplishes important functions in neuronal vesicles (Vik-Mo *et al.* 2003) and we here show that IL-6 is involved in its control.

Some genes were suggestive of a delayed response in the IL-6 KO mice, such as cysteine-rich protein 61 (CCN1, intermediate early gene, insulin-like growth factor binding protein 10), which is essential for embryonic angiogenesis (Mo *et al.* 2002) and has been shown to be up-regulated by

ischemic stroke (Schwarz *et al.* 2002). Other examples are: A kinase (PRKA) anchor protein 12 (gravin, Srcs5, SSeCKS, Tsga12), which is an src-suppressed C-kinase substrate which regulates blood-brain barrier (BBB) differentiation by modulating both brain angiogenesis and tight junction formation (Lee *et al.* 2003); chemokine (C-C motif) ligand 2 (monocyte chemoattractant protein-1), which is recognized as mediating extravasation of mononuclear leukocytes into the brain during a variety of neuroinflammatory conditions and could also alter BBB integrity during CNS inflammation (Song and Pachter 2004); the chemokine receptor carbon catabolite repression 4-like (Baranzini *et al.* 2000); lamin A, which is a type V intermediate filament with functions which

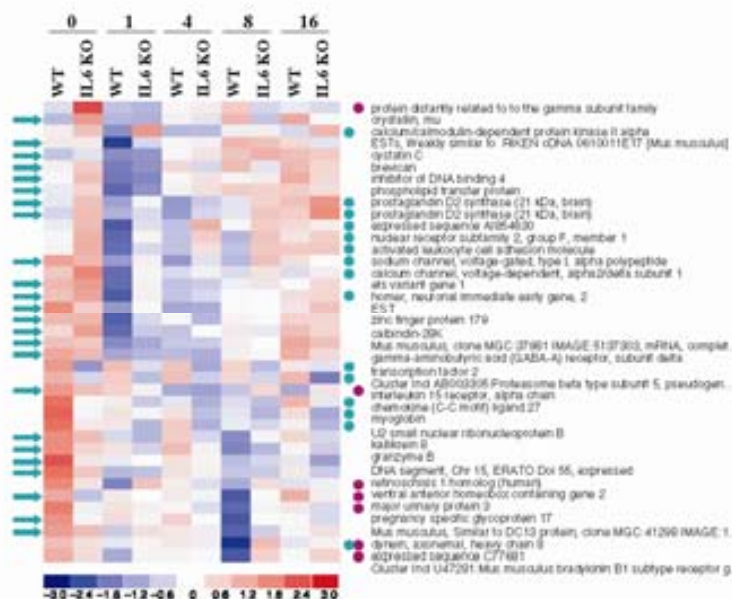
424 C. B. Povlsen *et al.*

Fig. 7 Hierarchical clustering of a subset of genes whose expression basically is down-regulated by the cyclolesion. Arrows, green and pink dots indicate a significant effect of the cyclolesion, interleukin (IL)-6 deficiency or the interaction, respectively. KO, knock-out; WT, wild-type.

range from the maintenance of nuclear shape to regulation of gene expression, DNA replication, chromatin organization and a number of other nuclear functions (Goldman *et al.* 2004); the nuclear carrier karyopherin (importin) beta 3; and the epithelial cell actin-binding protein villin 2, which severs actin *in vitro* and *in vivo* (Kumar *et al.* 2004).

Genes up-regulated at 1–4 days post-lesion

Figure 3 shows those genes mostly expressed at 1–4 dpl. A different pattern of genes affected emerged, with few transcription factors being present while genes involved in cell adhesion/extracellular matrix (ECM) and cytoskeleton were abundant. These genes probably represent a second wave of gene expression which is followed by other waves (see below). The IL-6 KO mice revealed that IL-6 is also important in the control of some of these genes.

The majority of genes of these clusters were suggestive of a delayed response in the IL-6 KO mice with two additional features, namely, in one cluster (the largest), the expression at 1 dpl was similar in both genotypes but was higher at 4 dpl in the IL-6 KO mice, while, in the other cluster, the expression was higher at 1 dpl in the WT mice. To the former group belong genes such as the multiligand-multifunctional glycoprotein apolipoprotein D, which could be linked to the redistribution of lipids in growth and maintenance of neuronal membranes after injury (Rassart *et al.* 2000); cytoskeletal proteins, like calponin 3, subunit 1B of the actin-related protein 2/3 complex, moesin, glial fibrillary acidic protein or transgelin; or genes important in the control of the cell cycle, like cyclin D1 and proliferating cell nuclear antigen. Statistical significance for IL-6 deficiency was obtained for some genes, which are representative of the

overall response: cathepsin C, a dipeptidyl peptidase I already known to be induced by brain injury (Lu *et al.* 2003); tenascin-C, a multifunctional extracellular matrix glycoprotein controlled by intracellular signals which are generated by multiple soluble factors, integrins and mechanical forces (Jones and Jones 2000) and which is important for neurite growth and guidance, synaptic plasticity and learning (Strekalova *et al.* 2002); LIM and senescent cell antigen-like domains 1 (PINCH, Lim 11), a five LIM domain protein involved in the regulation of integrin-mediated cell adhesion (Braun *et al.* 2003); heme oxygenase (decycling) 1, one of the three mammalian heme oxygenase isoforms, a stress-responsive protein induced by various oxidative agents which is involved in heme catabolism, which leads to the generation of biliverdin, free iron and carbon monoxide, molecular species implicated in the cytoprotective defense response against oxidative injury (Otterbein and Choi 2000); and solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4 (Slc1a4, ASCT1), which mediates preferred transport of neutral amino acids in glial cells which serves trophic surviving signals to neurons (Furuya *et al.* 2000).

Regarding the second large cluster, significantly affected genes were insulin-like growth factor binding protein 7 and a tropomyosin 5-like gene but the same tendency was observed, among others, in the cytoskeleton proteins myosin heavy chain IX and calpactin and the membrane/extracellular matrix proteins annexin A2, epithelial membrane protein 1 and the secretory granule-related chromogranin A and proteoglycan.

An important gene affected by IL-6 deficiency and injury was chloride intracellular channel 4 (mtCLIC/CLIC4), which

is a CLIC-type chloride channel in cytoplasm and mitochondria which can be regulated by p53 and tumor necrosis factor alpha. DNA damage or overexpression of p53 up-regulates mtCLIC which induces apoptosis independently of Bax (Fernandez-Salas *et al.* 2002). CLIC4 associates with the Ran, NTF2 and Importin-alpha nuclear import complexes for nuclear transport after injury, a mechanism underlying induction of apoptosis (Suh *et al.* 2004). IL-6 KO mice show prolonged mtCLIC expression compared with WT mice, which could underlie their increased apoptosis.

Genes up-regulated at 4–8 days post-lesion

Figure 4 shows the genes up-regulated mostly at 4–8 dpl. This was the largest group of genes readily identified as being affected by the cryolesion. According to the functional gene-ontology classification (Table S2) many of these genes are related to the cellular response to damage, tissue reconstruction and immune response, as expected. The hierarchical clustering analyses readily identify genes responding more at 4 than at 8 dpl and vice versa and those being affected by IL-6 deficiency, although again the use of only three mice per group precludes the achievement of more statistical significances. We will be discussing briefly only those genes affected by IL-6 deficiency, which remarkably caused a larger up-regulation in most cases.

Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate, upon phosphorylation by protein kinase C (PKC), decreases several of its physiological functions including membrane interaction, actin binding, calmodulin binding and protease susceptibility and has been shown to be an essential protein for CNS development (Stumpo *et al.* 1995).

SH3-binding domain glutamic acid-rich protein-like is predicted to belong to the thioredoxin-like protein superfamily which comprises a growing number of redox-active proteins including thioredoxin (Mazzocco *et al.* 2002). Peroxiredoxin 5 (also called antioxidant protein 2, AOP2 or peroxiredoxin 6) is an important antioxidant protein (Wang *et al.* 2003). In both cases the expression was higher in the IL-6 KO mice, which suggests physiological responses to the increased oxidative stress known to occur in these mice (Penkowa *et al.* 2000).

Integral membrane protein 2A is a membrane protein which has been involved in chondrogenesis and osteogenesis (Tuckermann *et al.* 2000) and in T cell regulation (Kirchner and Bevan 1999).

ATP-binding cassette subfamily A (ABC1) is a member of the superfamily of ATP-binding cassette transporters. ABC1 functions as a cholesterol efflux pump in the cellular lipid removal pathway and may be related to Alzheimer disease (AD) (Katzov *et al.* 2004).

RIKEN cDNA 2610001E17 gene, also known as steroid-sensitive protein 1 (Urb, Ssg1), has been described in reproductive tissues and suggested to be involved in mammary carcinogenesis (Marcantonio *et al.* 2001).

Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta) is a major protein controlling cell–cell recognition and in the interaction with extracellular matrix components and has been suggested to be of the utmost importance in the CNS (Mercado *et al.* 2004). The expression of this gene was significantly increased by the cryolesion and further increased in IL-6 KO mice. Interestingly, a ligand of this receptor, fibronectin, was also up-regulated and tended to be increased in IL-6 KO mice. It is also remarkable that, in NIH 3T3 cells, it has been described that CD151 plays a key role in selectively strengthening alpha6beta1 integrin-mediated adhesion to laminin-1 (Lammerding *et al.* 2003); moreover, in the CNS it has been shown that the neurite outgrowth induced by tenascin-C is mediated by neuronal alpha7beta1 integrin (Mercado *et al.* 2004). Both CD151 and tenascin-C tended to be more up-regulated in IL-6 KO mice (see Fig. 3). All these data suggest a clear amplification mechanism of this cellular pathway being established during injury which would normally be inhibited by IL-6.

Cathepsins are widely expressed cysteine proteases implicated in both intracellular proteolysis and extracellular matrix remodeling and cathepsins B and L, at least, play a pivotal role in maintenance of the CNS (Felbor *et al.* 2002). While cathepsin C was already significantly up-regulated at 1 dpl (see Fig. 3), many other cathepsins (H, B, D, S, L and Z) showed a delayed response. IL-6 deficiency showed different effects on cathepsin B depending on the probe set in the chip. Results in other tissues suggest a stimulatory effect of IL-6 (Tsujiyama *et al.* 1996), which does indeed happen with one of the probe sets (162271_f_at).

Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1 (Hsp47), a collagen-binding chaperone (Koide *et al.* 2000), and procollagen, type IV, alpha 1 followed a similar pattern of expression, IL-6 deficiency causing a stronger response at 4 dpl and a weaker response at 8 dpl compared with WT mice. Indeed, the same tendency was observed for other collagen genes, namely procollagen, type XVIII, alpha 1 and procollagen, type V, alpha 2. Guanine nucleotide-binding protein, alpha 13, shown to be involved in the regulation of cell movement in response to specific ligands as well as in developmental angiogenesis (Offermanns *et al.* 1997), also followed a similar pattern of expression.

Genes up-regulated at 8 days post-lesion

As could be expected, at this timing only a few genes were up-regulated, basically related to the matrix extracellular media and, somewhat surprisingly, insulin-like growth factor 2. IL-6 deficiency did not significantly affect any gene at this timing.

Genes affected by interleukin-6 deficiency at most timings

The hierarchical clustering identified a number of genes which were up-regulated compared with WT mice at most, if not all, timings analyzed; some of these genes did respond to the cryolesion, basically at 4 dpl, while others did not. These

genes are therefore likely to underlie aspects of the phenotype of the IL-6 KO occurring in normal conditions and are shown in Fig. 6. A brief discussion of these genes follows, which highlights the heterogeneous nature of their functions which can, nevertheless, be grouped in a few categories.

Genes relating to protein synthesis and metabolism at various levels were different in the IL-6 KO mice. These included enzymes involved in amino acid metabolism (serine hydroxymethyl transferase 1, glycine amidinotransferase, ornithine aminotransferase, phosphatidylserine decarboxylase-like), proteases (proprotein convertase subtilisin/kexin type 4) and protein glycosylation (expressed sequence AU018702, ribophorin I, ribophorin II). Another gene altered was RIKEN cDNA 0610038P07 gene (signal sequence receptor, gamma, Ssr3, TRAPG) which is one of the four proteins of the 'translocon-associated protein', a component of the translocation site (translocon) at which nascent polypeptides pass through the endoplasmic reticulum membrane (Hartmann *et al.* 1993).

Some genes related to mRNA metabolism were also affected, such as the subunit Cnot7 of the carbon catabolite repression 4-NOT complex of proteins (Denis and Chen 2003); Quaking, which shows RNA binding and signal transduction capabilities and is necessary in embryogenesis and myelination (Ebersole *et al.* 1996); and hypothetical protein MGC37309 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3), which has been shown to have a role in cytoplasmic trafficking of RNA in oligodendrocytes (Ma *et al.* 2002).

A number of transcription factors were also higher in IL-6 KO mice: transcription factor 12, involved in oligodendrocyte development (Riemenschneider *et al.* 2004); sex-determining region Y-box 2 (SOX2), expressed in embryonic stem cells and neural stem cells (Miyagi *et al.* 2004) and suggested to be a repressor of neuronal differentiation (Ohba *et al.* 2004); interestingly, nuclease-sensitive element binding protein 1 (Ybx1), which could be a functional antagonist of Ybx1 (Ohba *et al.* 2004), followed a similar pattern of expression. Chromatin structure is essential for the control of gene transcription and histones are major proteins in this regard. H3.3A is a replacement histone of the main histone H3 which can be synthesized in the absence of DNA replication (Bramlage *et al.* 1997) and was found to be increased by IL-6 deficiency.

There were many genes potentially controlling brain cytoarchitecture and function which were affected by IL-6 deficiency: cadherin 11, which belongs to one of the major classes of adhesion receptors which are important for the organization of embryonic tissues including CNS (Marthiens *et al.* 2002); the cell adhesion glycoprotein CD164 has been identified on primitive hematopoietic precursor cells and/or their associated stromal/endothelial elements (Watt and Chan 2000); tight junction protein 1 (zonula occludens-1 protein) has been suggested to be a regulatory and/or scaffolding factor at gap junctions which form electrical synapses between neurons (Li *et al.* 2004); gap junction membrane

channel protein alpha 1 (connexin 43) and gap junction membrane channel protein beta 2 (connexin 26), known to exert neuroprotective properties (Nakase *et al.* 2004); and claudin 11 (oligodendrocyte-specific protein) is responsible for the formation of tight junction intramembranous strands in CNS myelin and between Sertoli cells (Gow *et al.* 1999); Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1 (Eb1) is a microtubule-associated protein which could be involved in neurite outgrowth (Morrison *et al.* 2002); RIKEN cDNA 1110004F14 gene, integrin alpha V (CD51) plays a role in maintaining the association between cerebral microvessels and CNS parenchymal cells (McCarty *et al.* 2002); Duffy blood group (FY) is a seven transmembrane receptor for C-X-C and C-C chemokines which is present in the endothelial cells of microvasculature of non-erythroid tissues including normal brain (Hesselgesser and Horuk 1999); endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 (Ipb1, S1P1) is involved in angiogenesis as well as neurogenesis (Harada *et al.* 2004); tissue inhibitor of metalloproteinase 3 contributes to the control of the activity of matrix metalloproteinases and thus of the proteolytic remodeling of the brain microvascular system, a key step during leukocyte migration into the brain perivascular tissue; the inhibitory role of IL-6 observed in this study is consistent with previous findings (Bugno *et al.* 1999). Remarkably, the expression pattern of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 was similar (see Fig. 4).

Expressed sequence AI415285 is a Rab31-like protein, thus related to small G protein superfamily GTPases, which are involved in intracellular trafficking, secretion and vesicular transport. Another member of this superfamily of proteins is ras homolog gene family, member A (RhoA), which followed the same pattern of responses as Rab-31 for both the cryolesion and IL-6 deficiency; RhoA can inhibit neurite elongation and branching during development and regeneration (Neumann *et al.* 2002). Another member of this superfamily is cell division cycle 42 homolog (Cdc42), which instead promotes neurite branching (Leemhuis *et al.* 2004). Vinculin physically couples integrins to the cytoskeleton, mechanically stabilizes cell shape and supports rac-dependent lamellipodia formation and seems to contribute to neuronal cone growth control at least in part by interacting with Rho and Cdc42 proteins (Renaudin *et al.* 1999).

Other genes which were likely to be important were the synaptic vesicle protein synapsin II; pleiotrophin (also known as heparin-binding neurotrophic factor); holo-cytochrome *c* synthetase, essential for function of cytochrome *c* in the mitochondrial respiratory chain and linked to brain development and male survival (Prakash *et al.* 2002); alpha-synuclein, which has been linked to the genesis of the idiopathic form of Parkinson's disease, forms a strong complex with the dopamine transporter (Wersinger *et al.* 2003); protein kinase inhibitor, alpha is an inhibitor of protein kinase A (PKA) which has been suggested to be

involved in the control of synaptic plasticity, learning and memory (de Lecea *et al.* 1998); hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (MOP1), which exerts neuroprotective roles (Bernaudin *et al.* 2002); stearoyl-coenzyme A desaturase 2, an endoplasmic reticulum-bound enzyme involved in lipid metabolism; lysosomal-associated protein transmembrane 4A, involved in the transport of nucleosides and other small molecules (Hogue *et al.* 2002); and erythroid differentiation regulator, a novel protein involved in hemoglobin synthesis which is likely to participate in other processes such as cell survival and growth control (Dorner *et al.* 2004).

Genes down-regulated by the cryolesion

All the genes discussed above were up-regulated by the cryolesion. As could be expected, the hierarchical clustering also identified genes which were down-regulated and, again, IL-6 deficiency made a difference for some of them. These genes are shown in Fig. 7.

A group of genes which was remarkably affected was related to ion channels: protein distantly related to the gamma subunit family (Pr1), a voltage-dependent calcium channel gamma subunit-like protein (Khugbauer *et al.* 2000); sodium channel, voltage-gated, type I, alpha polypeptide (Scn1a); calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1 (Cacna2d1); and GABA-A receptor, subunit delta (Gabbrd). IL-6 deficiency affected all but the latter.

Several factors involved in the control of gene transcription or associated with signal transduction were also different in IL-6 KO compared with WT mice: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha (CaMK II), which has been shown to control glutamatergic synapses and learning (Wang *et al.* 2003); expressed sequence A1854630, ephrin receptor A5, involved in axon guidance (Feldheim *et al.* 2004); and nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1 (COUP-TF1), important for oligodendrocyte differentiation and myelination (Yamaguchi *et al.* 2004), were all higher in the IL-6 KO mice; other transcription factors were, in contrast, lower in IL-6 KO mice: transcription factor 2 (hepatocyte nuclear factor-1 beta), not shown previously in the brain; IL-15 receptor, alpha chain, important for angiogenesis in addition to the control of the immune system (Angiolillo *et al.* 1997); chemokine (C-C motif) ligand 27 (Ccl27) which, by alternate splicing, can produce a secretable form which interacts with its cognate receptor, CC chemokine receptor 10, and a non-secreted form which is targeted to the nucleus, PESKY, which is found in the brain and appears to be able to modulate transcription and alter cell morphology (Nibbs and Graham 2003); and ventral anterior homeobox-containing gene 2, a transcription factor which has been shown to specify positional identity along the dorsal-ventral axis of the retina and influence retinotectal mapping (Schulte *et al.* 1999). U2 small nuclear ribonucleoprotein B, which is involved in the mRNA splicing process (Meister *et al.* 2001), was less expressed in IL-6 KO mice.

Homer, neuronal immediate early gene 2 (cupidin) was down-regulated by the cryolesion and the expression levels were higher in the IL-6 KO mice; this is in contrast to the related protein Homer 1 (see Fig. 2). Homer 2 may serve as a post-synaptic scaffold protein which links metabotropic glutamate receptor (mGluR) signaling with actin cytoskeleton and Rho family proteins such as Cdc42 (Shiraishi *et al.* 1999).

Myoglobin binds to and facilitates the intracellular diffusion of O₂ from capillary blood to myocyte mitochondria and may scavenge intracellular NO (Sun *et al.* 2003) but, surprisingly, the cryolesion decreased its expression and, moreover, IL-6 deficiency further decreased it. This could contribute to the outcome observed in these mice regarding oxidative stress, to which could further be added the increased levels of prostaglandin D2 synthase.

Concluding remarks

Traumatic brain injury is one of the leading causes of transient and permanent disabilities. This study demonstrates a large number of genes involved in the responses of the brain to damage. Many of them have also been shown in other models of brain injury (Tang *et al.* 2002; Natale *et al.* 2003; Kury *et al.* 2004), thereby validating our results and underscoring a quite consistent pattern of response of the brain to injury. Due to the large number of animals used we detected a higher number of genes involved in this response. Previous studies, including ours, have shown that IL-6-deficient mice have a clear phenotype in normal and injury conditions regarding brain functions (see Introduction) and the present study has identified, for the first time, many potential genes which could be underlying such a phenotype.

Acknowledgements

These studies were supported by The Lundbeck Foundation, Hørslev-fonden, Novo Nordisk, The Danish Medical Research Council, Direktor Ib Henriksens Fond, The Danish Medical Association Research Fund-The Wachterhansens Legat, Grosserer Johan Quentin og Hustrus Legat, Marshalls Fond, Kathrine og Vigo Skovgaards Fond, Dir. Jacob Madsen's Fond, Gerda og Aage Haensch's Fond, Eva og Henry Frønkels Mindefond, Scleroseforeningen, Dir. Ejnar Jonasson's Fond, Warwar Larsens Fond, Karen A. Tolstrups Fond, Dansk Parkinsonforening, Fru Lily Benthine Lunds Fond, Hans og Nora Buchards Fond, Holger Rabitz Mindelegat, Ragnild Ibsens Legat for Medicinsk Forskning, Grosserer Vald. Foersom og Hustrus Fond, Hestehandler Ole Jacobsens Mindelegat, Asta Florida Boldings Mindelegat's Fond and Ministerio de Ciencia y Tecnología and Feder SAF2002-01268 and Direcció General de Recerca 2001SGR 00203.

Supplementary Material

The following material is available from:

<http://www.blackwellpublishing.com/products/journals/suppmat/JNC/JNC2877/JNC2877sm.htm>

428 C. B. Poulsen *et al.*

Table S1. Affymetrix probe set numbers and gene names are shown for each figure; names are arranged alphabetically.

Table S2. Functional classification in gene-ontology (GO) categories of the genes belonging to each of the clusters identified in Figure 1.

References

- Allan S. M. and Rothwell N. J. (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 734–744.
- Aloisi F. (2001) Immune function of microglia. *Glia* **36**, 165–179.
- Angiolillo A. L., Kanegane H., Spadari C., Reaman G. H. and Tosato G. (1997) Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 231–237.
- Armario A., Hernández J., Bhaethmann H. and Hidalgo J. (1998) IL-6 deficiency leads to increased emotionality in mice: evidence in transgenic mice carrying a null mutation for IL-6. *J. Neuroimmunol.* **92**, 160–169.
- Baranzini S. E., Elfstrom C., Chang S. Y., Butunoi C., Murray R., Higuichi R. and Oksenberg J. R. (2000) Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J. Immunol.* **165**, 6576–6582.
- Bernaudin M., Nedelec A. S., Divoux D., MacKenzie E. T., Petit E. and Schumacher-Bard P. (2002) Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 393–403.
- Blesch A., Grill R. J. and Tuszynski M. H. (1998) Neurotrophin gene therapy in CNS models of trauma and degeneration. *Prog. Brain Res.* **117**, 473–484.
- Bolin L. M., Strycharzka-Orczyk I., Murray R., Langston J. W. and Di Monte D. (2002) Increased vulnerability of dopaminergic neurons in MPTP-lesioned interleukin-6 deficient mice. *J. Neurochem.* **83**, 167–175.
- Bozon B., Davis S. and Laroche S. (2003) A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* **40**, 695–701.
- Bramlage B., Kosciessa U. and Doenecke D. (1997) Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation* **62**, 13–20.
- Braun A., Bordoy R., Stanchi F., Moser M., Kostka G. G., Ehler E., Brandau O. and Fassler R. (2003) PINCH2 is a new five LIM domain protein, homologous to PINCH and localized to focal adhesions. *Exp. Cell Res.* **284**, 239–250.
- Bugno M., Witek B., Bereta J., Bereta M., Edwards D. R. and Kordula T. (1999) Reprogramming of TIMP-1 and TIMP-3 expression profiles in brain microvascular endothelial cells and astrocytes in response to proinflammatory cytokines. *FEBS Lett.* **448**, 9–14.
- Butterweck V., Prinz S. and Schwaninger M. (2003) The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice. *Behav. Brain Res.* **144**, 49–56.
- Cardenas H. and Bolin L. M. (2003) Compromised reactive microglia in MPTP-lesioned IL-6 KO mice. *Brain Res.* **985**, 89–97.
- Chai Z., Gatti S., Toriatti C., Poli V. and Bartfai T. (1996) Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J. Exp. Med.* **183**, 311–316.
- Chen J., Uchimura K., Stetter R. A., Zhu R. L., Nakayama M., Jin K., Graham S. H. and Simon R. P. (1998) Transient global ischemia triggers expression of the DNA damage-inducible gene GADD45 in the rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 646–657.
- Chen X. P., Losman J. A. and Rothman P. (2000) SOCS proteins, regulators of intracellular signaling. *Immunity* **13**, 287–290.
- Clark W. M., Rinker L. G., Lessov N. S., Hazel K., Hill J. K., Stenzel-Poore M. and Eckenstein F. (2000) Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke* **31**, 1715–1720.
- Cui J.-K., Hsu C. Y. and Liu P. K. (1999) Suppression of postischemic hippocampal nerve growth factor expression by a c-fos antisense oligodeoxynucleotide. *J. Neurosci.* **19**, 1335–1344.
- Denis C. L. and Chen J. (2003) The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **73**, 221–250.
- De Sarro G., Russo E., Ferreri G., Giuseppe B., Flocco M. A., Di Paola E. D. and De Sarro A. (2004) Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin-6 mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **77**, 761–766.
- Dhoda V. K., Sailor K. A., Bowen K. K. and Vemaganti R. (2004) Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *J. Neurochem.* **89**, 73–89.
- Dong Y. and Benveniste E. N. (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* **36**, 180–190.
- Dorner P., Spitzer E., Frankenberger M. and Krenner E. (2004) Erythroid differentiation regulator (EDR), a novel, highly conserved factor; I. Induction of haemoglobin synthesis in erythroleukaemic cells. *Cytokine* **26**, 231–242.
- Ebersole T. A., Chen Q., Justice M. J. and Artzt K. (1996) The quaking gene product necessary in embryogenesis and myelination combines features of RNA binding and signal transduction proteins. *Nat. Genet.* **12**, 260–265.
- Eddleston M. and Mucke L. (1993) Molecular profile of reactive astrocytes — Implications for their role in neurological disease. *Neuroscience* **1**, 15–36.
- Felbor U., Kessler B., Mothes W., Goebel H. H., Ploegh H. L., Bronson R. T. and Olsen B. R. (2002) Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 7883–7888.
- Feldheim D. A., Nakamoto M., Osterfield M., Gale N. W., DeChiara T. M., Rohatgi R., Yancopoulos G. D. and Flanagan J. G. (2004) Loss-of-function analysis of EphA receptors in retinotectal mapping. *J. Neurosci.* **24**, 2542–2550.
- Fernandez-Salas E., Suh K. S., Speransky V. V. *et al.* (2002) mtCLIC/CLIC4, an organelle chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53. *Mol. Cell Biol.* **22**, 3610–3620.
- Furuya S., Tabata T., Mitoma J., Yamada K., Yamasaki M., Makino A., Yamamoto T., Watanabe M., Kano M. and Hirabayashi Y. (2000) L-Serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 11 528–11 533.
- Galiano M., Liu Z. Q., Kalla R. *et al.* (2001) Interleukin-6 (IL6) and cellular response to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 327–341.
- Giffard R. G. and Yenari M. A. (2004) Many mechanisms for hsp70 protection from cerebral ischemia. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* **16**, 53–61.
- Giralt M., Penkowa M., Lago N., Molinero A. and Hidalgo J. (2002) Metallothionein-1+2 protect the CNS after a focal brain injury. *Exp. Neurol.* **173**, 114–128.
- Giulian D., Chen J., Ingemann J., George J. and Noponen M. (1989) The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. *J. Neurosci.* **12**, 4416–4429.

- Goldman R. D., Shumaker D. K., Erdos M. R. *et al.* (2004) Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 8963–8968.
- Gomariz R. P., Martínez C., Abad C., Leceta J. and Delgado M. (2001) Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Clin. Pharm. Design* **7**, 89–111.
- Goudeau B., Huetz F., Samson S., Di Santo J. P., Cumano A., Beg A., Israel A. and Memet S. (2003) I κ B α /I κ B β deficiency reveals that a critical NF- κ B dosage is required for lymphocyte survival. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 15 800–15 805.
- Gow A., Southwood C. M., Li J. S., Pariali M., Riordan G. P., Brodie S. E., Darnas J., Bronstein J. M., Kachar B. and Lazzarini R. A. (1999) CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/cludin-11 null mice. *Cell* **99**, 649–659.
- Haas C. A., Frotscher M. and Deller T. (1999) Differential induction of c-Fos, c-Jun and Jun B in the rat central nervous system following unilateral entorhinal cortex lesion. *Neuroscience* **90**, 41–51.
- Harada J., Foley M., Moskowitz M. A. and Waeber C. (2004) Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *J. Neurochem.* **88**, 1026–1039.
- Hartmann E., Gorlich D., Kostka S., Otto A., Kraft R., Knespel S., Burger E., Rapoport T. A. and Prehn S. (1993) A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.* **214**, 375–381.
- Hesselgesser J. and Horuk R. (1999) Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J. Neurobiol.* **5**, 13–26.
- Hogue D. L., Nash C., Ling V. and Hobman T. C. (2002) Lysosome-associated protein transmembrane 4 alpha (LAPTM4 alpha) requires two tandemly arranged tyrosine-based signals for sorting to lysosomes. *Biochem. J.* **365**, 721–730.
- Hong F., Jaruga B., Kim W. H., Radaeva S., El-Assal O. N., Tian Z., Nguyen V. A. and Gao B. (2002) Opposing roles of STAT1 and STAT3 in T cell-mediated hepatitis: regulation by SOCS. *J. Clin. Invest.* **110**, 1503–1513.
- Hopkins S. and Rothwell N. (1995) Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci.* **18**, 83–88.
- Horner P. J. and Gage F. H. (2000) Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* **407**, 963–970.
- Hosack D. A., Dennis G. J., Sherman B. T., Lane H. C. and Lempicki R. A. (2003) Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.* **4**, R70.
- Huang E. J. and Reichardt L. F. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 677–736.
- Hughes P. E., Alexi T., Walton M., Williams C. E., Dragunow M., Clark R. G. and Gluckman P. D. (1999) Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **57**, 421–450.
- Ihle J. N. (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* **84**, 331–334.
- Insel T. R., Volkow N. D., Landis S. C., Li T. K., Battey J. F. and Sieving P. (2004) Limits to growth: why neuroscience needs large-scale science. *Nat. Neurosci.* **7**, 426–427.
- Jansson J. O., Wallenius K., Wernstedt L., Ohlsson C., Dickson S. L. and Wallenius V. (2003) On the site and mechanism of action of the anti-obesity effects of interleukin-6. *Growth Horm. IGF Res.* **13**, S28–S32.
- Jin K., Sun Y., Xie L., Childs J., Mao X. O. and Greenberg D. A. (2004) Post-ischemic administration of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) reduces infarct size and modifies neurogenesis after focal cerebral ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **24**, 399–408.
- Jones P. L. and Jones F. S. (2000) Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol.* **19**, 581–596.
- Jung N., Yi Y. W., Kim D., Shong M., Hong S. S., Lee H. S. and Bae I. (2000) Regulation of Gadd45 expression by C/EBP. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6180–6187.
- Kamaraju A. K., Adjalley S., Zhang P., Chebath J. and Revel M. (2004) C/EBP- δ induction by gp130 signaling. Role in transition to myelin gene expressing phenotype in a melanoma cell line model. *J. Biol. Chem.* **279**, 3852–3861.
- Karin M. and Lin A. (2002) NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* **3**, 221–227.
- Katzov H., Chalmers K., Palmgren J. *et al.* (2004) Genetic variants of ABCA1 modify Alzheimer disease risk and quantitative traits related to beta-amyloid metabolism. *Hum. Mutat.* **23**, 358–367.
- Kawahara N., Mishima K., Higashiyama S., Taniguchi N., Tamura A. and Kirino T. (1999) The gene for heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is stress-inducible: its role in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**, 307–320.
- Kim Y. D., Sohn N. W., Kang C. and Soh Y. (2002) DNA array reveals altered gene expression in response to focal cerebral ischemia. *Brain Res. Bull.* **58**, 491–498.
- Kirchner J. and Bevan M. J. (1999) ITM2A is induced during thymocyte selection and T cell activation and causes downregulation of CD8 when overexpressed in CD4⁺CD8⁺ double positive thymocytes. *J. Exp. Med.* **190**, 217–228.
- Klein M. A., Möller J. C., Jones L. L., Bluthmann H., Kreutzberg G. W. and Raivich G. (1997) Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* **19**, 227–233.
- Klugbauer N., Dai S., Specht V., Lacinova L., Marnis E., Bohn G. and Hofmann F. (2000) A family of gamma-like calcium channel subunits. *FEBS Lett.* **470**, 189–197.
- Kobori N., Clifton G. L. and Dash P. (2002) Altered expression of novel genes in the cerebral cortex following experimental brain injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **104**, 148–158.
- Koide T., Aso A., Yorihuzi T. and Nagata K. (2000) Conformational requirements of collagenous peptides for recognition by the chaperone protein HSP47. *J. Biol. Chem.* **275**, 27 957–27 963.
- Kumar N., Zhao P., Tomar A., Galea C. A. and Khurana S. (2004) Association of villin with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **279**, 3096–3110.
- Kury P., Schroeter M. and Jander S. (2004) Transcriptional response to circumscribed cortical brain ischemia: spatiotemporal patterns in ischemic vs. remote non-ischemic cortex. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1708–1720.
- Ladenheim B., Krasnova I. N., Deng X., Oyler J. M., Poletini A., Moran T. H., Huestis M. A. and Cadet J. L. (2000) Methamphetamine-induced neurotoxicity is attenuated in transgenic mice with a null mutation for interleukin-6. *Mol. Pharmacol.* **58**, 1247–1256.
- Lammerding J., Kazarov A. R., Huang H., Lee R. T. and Hemler M. E. (2003) Tetraspanin CD151 regulates alpha β integrin adhesion strengthening. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 7616–7621.
- de Lecea L., Criado J. R., Rivera S., Wen W., Soriano E., Henriksen S. J., Teylor S. S., Gall C. M. and Sutcliffe J. G. (1998) Endogenous protein kinase A inhibitor (PKA α) modulates synaptic activity. *J. Neurosci. Res.* **53**, 269–278.
- Lee D. K., Carrasco J., Hicalgo J. and Andrews G. K. (1999) Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem. J.* **337**, 59–65.
- Lee S. W., Kim W. J., Choi Y. K., Song H. S., Son M. J., Gelman I. H., Kim Y. J. and Kim K. W. (2003) SSeCKS regulates angiogenesis

430 C. B. Poulsen *et al.*

- and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat. Med.* **9**, 900-906.
- Leemhuis J., Boutillier S., Barth H., Feuerstein T. J., Brock C., Nurnberg B., Aktories K. and Meyer D. K. (2004) Rho GTPases and phosphoinositide 3-kinase organize formation of branched dendrites. *J. Biol. Chem.* **279**, 585-596.
- Li C. and Wong W. H. (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 31-36.
- Li X., Olson C., Lu S., Kamasawa N., Yasumura T., Rash J. E. and Nagy J. I. (2004) Neuronal connexin36 association with zonula occludens-1 protein (ZO-1) in mouse brain and interaction with the first PDZ domain of ZO-1. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2132-2146.
- Liu P. K., Grossman R. G., Hsu C. Y. and Robertson C. S. (2001) Ischemic injury and faulty gene transcripts in the brain. *Trends Neurosci.* **24**, 581-588.
- Lotem J. and Sachs L. (1998) Different mechanisms for suppression of apoptosis by cytokines and calcium mobilizing compounds. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 4601-4606.
- Lu A., Tang Y., Ran R., Clark J. F., Aronow B. J. and Sharp F. R. (2003) Genomics of the perinfarction cortex after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 786-810.
- Ma A. S., Moran-Jones K., Shan J., Munro T. P., Snee M. J., Hoek K. S. and Smith R. (2002) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, a novel RNA trafficking response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 18 010-18 020.
- Marcantonio D., Chalifour L. E., Alaoui-Jamali M. A., Alpert L. and Hayth H. T. (2001) Cloning and characterization of a novel gene that is regulated by estrogen and is associated with mammary gland carcinogenesis. *Endocrinology* **142**, 2409-2418.
- Marshall J., Dolan B. M., Garcia E. P., Sath S., Tang X., Mao Z. and Blair L. A. (2003) Calcium channel and NMDA receptor activities differentially regulate nuclear C/EBP β levels to control neuronal survival. *Neuron* **39**, 625-639.
- Marthens V., Padilla F., Lambert M. and Mege R. M. (2002) Complementary expression and regulation of cadherins 6 and 11 during specific steps of motoneuron differentiation. *Mol. Cell Neurosci.* **20**, 458-475.
- Mattson M. and Scheff S. (1994) Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanisms of action and implications for therapy. *J. Neurotrauma* **11**, 3-33.
- Mazzooco M., Maffei M., Egeo A., Vergano A., Arrigo P., Di Lisi R., Ghiotto F. and Scartezzini P. (2002) The identification of a novel human homologue of the SH3 binding glutamic acid-rich (SH3BGR) gene establishes a new family of highly conserved small proteins related to Thioredoxin Superfamily. *Gene* **291**, 233-239.
- McCarty J. H., Monahan-Earley R. A., Brown L. F. *et al.* (2002) Defective associations between blood vessels and brain parenchyma lead to cerebral hemorrhage in mice lacking α v integrins. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7667-7677.
- McIntosh T., Juhler M. and Wieloch T. (1998) Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* **15**, 731-769.
- Meister G., Hannus S., Plottner O., Baars T., Hartmann E., Fakan S., Lagerbauer B. and Fischer U. (2001) SMNp is an essential pre-mRNA splicing factor required for the formation of the mature spliceosome. *EMBO J.* **20**, 2304-2314.
- Menzel L., Katz A., Kozak N., Ben-Nun A. and Revel M. (1998) Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1727-1737.
- Mercado M. L., Nur-e-Kamal A., Liu H. Y., Gross S. R., Movahed R. and Meiners S. (2004) Neurite outgrowth by the alternatively spliced region of human tenascin-C is mediated by neuronal α 7 β 1 integrin. *J. Neurosci.* **24**, 238-247.
- Merrill J. E. and Benveniste E. N. (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci.* **19**, 331-338.
- Michel U., Gerber J. E., O'Connor A., Bunkowski S., Bruck W., Nau R. and Phillips D. J. (2003) Increased activin levels in cerebrospinal fluid of rabbits with bacterial meningitis are associated with activation of microglia. *J. Neurochem.* **86**, 238-245.
- Mirnics K. and Pevsner J. (2004) Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease. *Nat. Neurosci.* **7**, 434-439.
- Miyagi S., Saito T., Mizutani K. *et al.* (2004) The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. *Mol. Cell Biol.* **24**, 4207-4220.
- Mo F. E., Muntean A. G., Chen C. C., Stolz D. B., Watkins S. C. and Lau L. F. (2002) CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Mol. Cell Biol.* **22**, 8709-8720.
- Morrison E. E., Moncur P. M. and Askham J. M. (2002) EB1 identifies sites of microtubule polymerisation during neurite development. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **98**, 145-152.
- Muñoz-Fernández M. A. and Fresno M. (1998) The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **56**, 307-340.
- Murphy P. G., Borthwick L. A., Altares M., Gauldie J., Kaplan D. and Richardson P. M. (2000) Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1891-1899.
- Nakagomi S., Suzuki Y., Namikawa K., Kiryu-Seo S. and Kiyama H. (2003) Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *J. Neurosci.* **23**, 5187-5196.
- Nakase T., Sohl G., Theis M., Willecke K. and Naus C. C. (2004) Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am. J. Pathol.* **164**, 2067-2075.
- Natale J. E., Ahmed F., Cernak I., Stoica B. and Faden A. I. (2003) Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* **20**, 907-927.
- Neumann H., Schweigreiter R., Yamashita T., Rosenkranz K., Wekerle H. and Barde Y. A. (2002) Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *J. Neurosci.* **22**, 854-862.
- Nibbs R. J. and Graham G. J. (2003) CCL27/PESKY: a novel paradigm for chemokine function. *Expert Opin. Biol. Ther.* **3**, 15-22.
- Offermanns S., Mancino V., Revel J. P. and Simon M. I. (1997) Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of G α 13 deficiency. *Science* **275**, 533-536.
- Ohba H., Chiyoeda T., Endo E., Yano M., Hayakawa Y., Sakaguchi M., Darnell R. B., Okano H. J. and Okano H. (2004) Sox21 is a repressor of neuronal differentiation and is antagonized by YB-1. *Neurosci. Lett.* **358**, 157-160.
- Otterbein L. E. and Choi A. M. K. (2000) Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am. J. Physiol.* **279**, L1029-L1037.
- Parish C. L., Finkelstein D. I., Tripanichkul W., Sato A. R., Drago J. and Home M. K. (2002) The role of interleukin-1, interleukin-6, and glia in inducing growth of neuronal terminal arbors in mice. *J. Neurosci. Res.* **22**, 8034-8041.
- Pavelko K. D., Howe C. L., Drescher K. M., Gamez J. D., Johnson A. J., Wei T., Ramsdoff R. M. and Rodriguez M. (2003) Interleukin-6 protects anterior horn neurons from lethal virus-induced injury. *J. Neurosci. Res.* **23**, 481-492.

- Penkowa M. and Moos T. (1995) Disruption of the blood-brain interface in neonatal rat neocortex induces a transient expression of metallothionein in reactive astrocytes. *Glia* **13**, 217-227.
- Penkowa M., Carrasco J., Giralt M., Moos T. and Hidalgo J. (1999a) CNS wound healing is severely depressed in metallothionein I- and II-deficient mice. *J. Neurosci.* **19**, 2535-2545.
- Penkowa M., Moos T., Carrasco J., Hadberg H., Molinero A., Bluthmann H. and Hidalgo J. (1999b) Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* **25**, 343-357.
- Penkowa M., Giralt M., Carrasco J., Hadberg H. and Hidalgo J. (2000) Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* **32**, 271-285.
- Penkowa M., Molinero A., Carrasco J. and Hidalgo J. (2001) Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* **102**, 805-818.
- Perry V., Bell M., Brown H. and Matyszak M. (1995) Inflammation in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 636-641.
- Pignatelli M., Luna-Medina R., Perez-Rendon A., Santos A. and Perez-Castillo A. (2003) The transcription factor early growth response factor-1 (EGR-1) promotes apoptosis of neuroblastoma cells. *Biochem. J.* **373**, 739-746.
- Potschka H., Krupp E., Ebert U. et al. (2002) Kindling-induced overexpression of Homer 1A and its functional implications for epileptogenesis. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 2157-2165.
- Prakash S. K., Cormier T. A., McCall A. E., Garcia J. J., Sierra R., Haupt B., Zoghbi H. Y. and Van Den Veyver I. B. (2002) Loss of holocholesterol synthetase causes the male lethality of X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3237-3248.
- Prins M. L. and Hovda D. A. (2003) Developing experimental models to address traumatic brain injury in children. *J. Neurotrauma* **20**, 123-137.
- Rassart E., Bedirian A., Do Carmo S., Guinard O., Sirois J., Terrisse L. and Milne R. (2000) Apolipoprotein D. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 185-198.
- Renaudin A., Lehmann M., Girault J. and McKerracher L. (1999) Organization of point contacts in neuronal growth cones. *J. Neurosci. Res.* **55**, 458-471.
- Ridet J. L., Malhotra A. and Gage F. (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* **20**, 570-577.
- Riemenschneider M. J., Koy T. H. and Reifensberger G. (2004) Expression of oligodendrocyte lineage genes in oligodendroglial and astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **107**, 277-282.
- Roth A., Gill R. and Certa U. (2003) Temporal and spatial gene expression patterns after experimental stroke in a rat model and characterization of PC4, a potential regulator of transcription. *Mol. Cell. Neurosci.* **22**, 353-364.
- Rothwell N. J. and Hopkins S. J. (1995) Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* **18**, 130-136.
- Schinder A. F. and Poo M. (2000) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **23**, 639-645.
- Schulte D., Furukawa T., Peters M. A., Kozak C. A. and Cepko C. L. (1999) Misexpression of the Emx-related homeobox genes cVax and mVax2 ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map. *Neuron* **24**, 541-553.
- Schwarz D. A., Barry G., Mackay K. B., Manu F., Naeve G. S., Vana A. M., Verge G., Conlon P. J., Foster A. C. and Maki R. A. (2002) Identification of differentially expressed genes induced by transient ischemic stroke. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **101**, 12-22.
- Shimishi Y., Mizutani A., Bito H., Fujisawa K., Narumiya S., Mikoshiba K. and Furuichi T. (1999) Cupidin, an isoform of Homer/Ves1, interacts with the actin cytoskeleton and activated rho family small GTPases and is expressed in developing mouse cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* **19**, 8389-8400.
- Song L. and Pachter J. S. (2004) Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvasc. Res.* **67**, 78-89.
- Stichel C. and Verner Müller H. (1998) Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Prog. Neurobiol.* **56**, 119-148.
- Strelakova T., Sun M., Sibbe M., Evers M., Dityatev A., Gass P. and Schachner M. (2002) Fibronectin domains of extracellular matrix molecule tenascin-C modulate hippocampal learning and synaptic plasticity. *Mol. Cell Neurosci.* **21**, 173-187.
- Stumpo D. J., Bock C. B., Tuttle J. S. and Blackshear P. J. (1995) MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 944-948.
- Sugira S., Lahav R., Han J., Kou S. Y., Banner L. R., de Pablo F. and Patterson P. H. (2000) Leukaemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 457-466.
- Suh K. S., Mutoh M., Nagashima K. et al. (2004) The organellar chloride channel protein CLIC4/mCLIC translocates to the nucleus in response to cellular stress and accelerates apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 4632-4641.
- Sun Y., Jin K., Peel A., Mao X. O., Xie L. and Greenberg D. A. (2003) Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 3497-3500.
- Swartz K. R., Liu F., Sewell D., Schochet T., Campbell I., Sándor M. and Fabry Z. (2001) Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Res.* **896**, 86-95.
- Tanaka H., Yamashita T., Asada M., Mizutani S., Yoshikawa H. and Tohyama M. (2002) Cytoplasmic p21 (Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J. Cell. Biol.* **158**, 321-329.
- Tang Y., Lu A., Aronow B. J., Wagner K. R. and Sharp F. R. (2002) Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 1937-1952.
- Taubenfeld S. M., Milekic M. H., Monti B. and Alberini C. M. (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat. Neurosci.* **4**, 813-818.
- Torp R., Su J. H., Deng G. and Cotman C. W. (1998) GADD45 is induced in Alzheimer's disease, and protects against apoptosis in vitro. *Neurobiol. Dis.* **5**, 245-252.
- Tsui C. C., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkin N. A., Barnes C. and Worley P. F. (1996) Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. *J. Neurosci.* **15**, 2463-2478.
- Tsujinaka T., Fujita J., Ebisui C. et al. (1996) Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **97**, 244-249.
- Tuckermann J. P., Pittois K., Partridge N. C., Merregaert J. and Angel P. (2000) Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 1257-1265.
- Vik-Mo E. O., Otteidal L., Hoivik E. A., Kleivdal H., Eidet J. and Davanger S. (2003) Sec6 is localized to the plasma membrane of

432 C. B. Poulsen *et al.*

- mature synaptic terminals and is transported with secretogranin II-containing vesicles. *Neuroscience* **119**, 73–85.
- Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson S. L., Ohlsson C. and Jansson J. O. (2002) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat. Med.* **8**, 75–79.
- Wang H., Shimizu E., Tang Y. P. *et al.* (2003) Inducible protein knockout reveals temporal requirement of CaMKII reactivation for memory consolidation in the brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 4287–4292.
- Wang X., Phelan S. A., Forsman-Semb K., Taylor E. F., Petros C., Brown A., Lerner C. P. and Paigen B. (2003) Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **278**, 25 179–25 190.
- Watt S. M. and Chan J. Y. (2000) CD164 — a novel sialomucin on CD34+ cells. *Leuk. Lymph.* **37**, 1–25.
- Wersinger C., Prou D., Vernier P., Niznik H. B. and Sidhu A. (2003) Mutations in the lipid-binding domain of alpha-synuclein confer overlapping, yet distinct, functional properties in the regulation of dopamine transporter activity. *Mol. Cell Neurosci.* **24**, 91–105.
- Yamagishi N., Ishihara K., Saito Y. and Hatayama T. (2002) Hsp105alpha enhances stress-induced apoptosis but not necrosis in mouse embryonal 9 cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **132**, 271–278.
- Yamaguchi H., Zhou C., Lin S. C., Durand B., Tsai S. Y. and Tsai M. J. (2004) The nuclear orphan receptor COUP-TFI is important for differentiation of oligodendrocytes. *Dev. Biol.* **266**, 238–251.
- Yang K. K., Damer B. G., Merkel U., Ryffel B., Schutt C., Golenbock D., Freeman M. W. and Jack R. S. (2002) Neutrophil influx in response to a peritoneal infection with *Salmonella* is delayed in lipopolysaccharide-binding protein or CD14-deficient mice. *J. Immunol.* **169**, 4475–4480.
- Zekki H., Feinstein D. L. and Rivest S. (2002) The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with a profound and sustained transcriptional activation of the genes encoding toll-like receptor 2 and CD14 in the mouse CNS. *Brain Pathol.* **12**, 308–319.
- Zhang J., Zhang D., McQuade J. S., Behbehani M., Tsien J. Z. and Xu M. (2002) c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat. Genet.* **30**, 416–420.